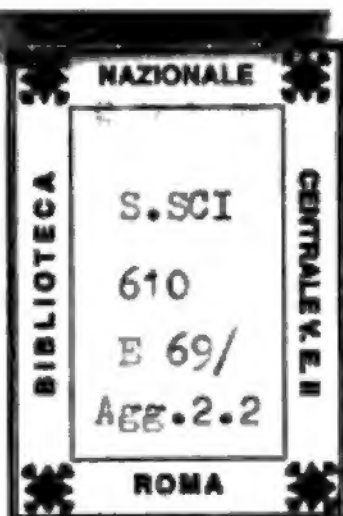
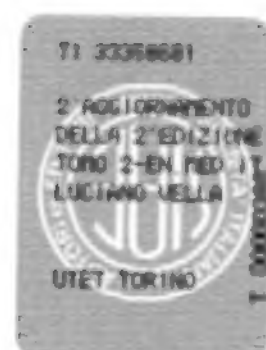


ENCICLOPEDIA
MEDICA
ITALIANA

USES
Edizioni Scientifiche
Firenze





ENCICLOPEDIA --- MEDICA --- ITALIANA ---

II Aggiornamento della
Seconda edizione

Editor: LUCIANO VELLA

USES
Edizioni Scientifiche
Firenze



ENCICLOPEDIA MEDICA ITALIANA

I edizione: Copyright © 1950-1961 by Sansoni Edizioni Scientifiche S.p.A. - Firenze

II edizione: Copyright © 1973-1988 by USES Edizioni Scientifiche S.p.A. - Firenze

Aggiornamento I: Copyright © 1990-1993 by USES Edizioni Scientifiche S.r.l. - Firenze

Aggiornamento II**: Copyright © 1999 by UTET - Torino

Sito Internet Utet: www.utet.com
e-mail: utet@utet.com

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (compresi i microfilm e le copie fotostatiche), sono riservati per tutti i Paesi.

L'Editore potrà concedere a pagamento l'autorizzazione a riprodurre una porzione non superiore a un decimo del presente volume e fino a un massimo di settantacinque pagine.

Le richieste di riproduzione vanno inoltrate all'Associazione Italiana per i Diritti di Riproduzione delle Opere dell'ingegno (AIDRO), via delle Erbe, 2 - 20121 Milano
Tel. e Fax 02/809506

Fotocomposizione: Compedit - Torino

Stampa: La Fotocromo Emiliana - Ozzano Emilia (BO)

ISBN 88-02-05478-9

Comitato Scientifico Consultivo

MASSIMO ALOISI

Professore emerito di Patologia generale, Università di Padova

ETTORE AMBROSIONI

Direttore dell'Istituto di Medicina interna, Università di Bologna

ANTONIO ASCENZI

Professore ordinario f. r. del I Istituto di Anatomia e Istologia patologica, Università « La Sapienza », Roma

CARISSIMO BIAGINI

Direttore dell'Istituto di Radiologia medica, Università « La Sapienza », Roma

GABRIELE BIANCHI PORRO

Primario Divisione di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva, Ospedale L. Sacco, Milano

BRUNO BOLES-CARENINI

Direttore della Clinica oculistica, Università di Torino

ROBERTO G. BURGIO

Professore di Clinica pediatrica, Università di Pavia

LUCIANO CECILIANI

Direttore della Clinica Ortopedica, Università di Pavia

SERGIO CERQUIGLINI

Professore emerito di Fisiologia umana, Università « La Sapienza », Roma

ALBANO DEL FAVERO

Istituto di Medicina interna e Scienze oncologiche, Università di Perugia

SILVIO GARATTINI

Direttore dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche « Mario Negri », Milano

BRUNELLO GHELARDUCCI

Professore Ordinario di Fisiologia umana, Università di Pisa

VITTORIO GRASSI

Direttore della Cattedra di Semeiotica medica, Spedali Civili, Brescia

FRANCESCO INGRAO

Libero docente in Malattie Respiratorie, Università « La Sapienza », Roma

PAOLO LARIZZA

Professore emerito di Clinica medica, Università di Perugia

BRUNO MAGNANI

Direttore dell'Istituto di Malattie dell'Apparato cardiovascolare, Università di Bologna

FRANCO MANDELLI

Titolare Sezione di Ematologia, Dipartimento di Biopatologia Umana, Università « La Sapienza », Roma

CARLO MAURI

Professore emerito di Clinica medica generale e Terapia medica I, Università di Pavia

DAVID MEGIGHIAN

Direttore dell'Istituto di Clinica otorinolaringoiatrica, Università di Padova

NICOLA MONTANARO

Professore Ordinario di Farmacologia, Università di Bologna

GIAN GASTONE NERI SERNERI

Direttore della Clinica medica generale e Terapia medica I, Università di Firenze

PIETRO OMODEO

Dipartimento di Biologia evolutiva, Università di Siena

ADRIANO OSSICINI

Ordinario di Psicologia, Università « La Sapienza », Roma

EMILIANO PANCONESI

Direttore Istituto Clinica dermosifilopatica, Università di Firenze

VITO PATRONO

Libero docente di Patologia medica, Università « La Sapienza », Roma

MICHELE PAVONE MACALUSO

Direttore dell'Istituto di Materie urologiche, Università di Palermo

GIANCARLO REDA

Già Direttore dell'Istituto di Clinica psichiatrica, Università « La Sapienza », Roma

GIUSEPPE REMUZZI

Centro Ricerche Cliniche Malattie Rare « Aldo e Cele Daccò », Bergamo

GIORGIO RIBOTTA

Direttore VI Clinica chirurgica, Università « La Sapienza », Roma

VINCENZO RICCI

Professore di Clinica otorinolaringoiatrica, Università di Verona

MARIO RIZZETTO

Titolare della Cattedra di Gastroenterologia, Università di Torino

SERGIO ROMANI

Già professore ordinario di Radiologia, Università di Padova

UMBERTO SERAFINI

Professore ordinario f. r. di Clinica medica generale e Terapia medica, Università « La Sapienza », Roma

GIORGIO VELLUTI

Professore associato di Fisiologia e Malattie dell'Apparato respiratorio, Università di Modena

Direzione

Prof. LUCIANO VELLA
Direttore scientifico ed Editor

Redazione

Prof. PIETRO D'ARCANGELO
Redattore Capo

Dott. STEFANO CAGLIANO
Prof. AMILCARE CARPI DE RESMINI

Dott. FABRIZIO TOCCACELI
Dott. STEFANO VELLA

Consulenti Redazionali

Prof. GINO AMICONI
Prof. MATILDE ANGELINI ROTA
Prof. PAOLO ASCENZI
Prof. FILIPPO ASÒLE
Prof. MASSIMO BIONDI
Prof. SERGIO BONINI
Prof. DANIELE BRACCHETTI
Prof. PAOLO CAPRA
Dott. LAURA CONTI
Prof. GIULIO COSSU
Dott. LUCIANO DE BIASE
Prof. ENRICO DI SALVO
Dott. PIETRO ESCALAR

Prof. MAURO GALEAZZI
Prof. GIUSEPPE MARIA GANDOLFO
Dott. TEODORO MARUOTTI
Dott. RAFFAELE NUZZI
Prof. GIOVACCHINO PEDICELLI
Prof. PAOLA PIVETTI PEZZI
Prof. RICCARDO PRATESI
Dott. ALBERTO PRIORI
Prof. COSTANTINO SALERNO
Dott. GIUSEPPE SANGIORGI
Prof. FAUSTO SANTEUSANIO
Dott. LOREDANA SARMATI
Prof. GIOVAN BATTISTA SERRA
Prof. MAURIZIO TONATO

Segreteria

MONICA SCATTOLINI
Segretaria di Redazione

STEFANIA FORGIONE

Elenco collaboratori

Matti AAPRO

Divisione di Oncologia Medica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano – FLOXURIDINA.

Neri ACCORNERO

Ordinario di Neurofisiopatologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – INTELLIGENZA ARTIFICIALE.

Patrizia ADUCCI

Professore Straordinario di Fisiologia vegetale, Università «Tor Vergata», Roma – FITORMONI; FITOTOSSINE.

Giancarlo AGNELLI

Professore Associato in Medicina Interna, Università di Perugia – OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE.

Fernando AIUTI

Ordinario di Immunologia Clinica e Allergologia, Università «La Sapienza», Roma – LINFOCTI.

Carlo ALOVISI

Dirigente Medico di I Livello, Ospedale «Maria Vittoria», Torino – LAPAROSCOPIA CHIURGICA GINECOLOGICA.

Giuseppe AMADORI

Professore di ruolo di II fascia di Ematologia, Istituto di Clinica Otorinolaringoiatrica, Università di Padova – MALATTIE AUTOIMMUNI.

Francesco AMALDI

Ordinario di Biologia Molecolare, Facoltà di Scienze MFN, Università «Tor Vergata», Roma – GENI DISCONTINUI.

Maria Antonietta AMENDOLEA

Istituto Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – MALATTIE AUTOIMMUNI.

Gino AMICONI

Ordinario, Dipartimento Scienze Biomediche, Università «La Sapienza», Roma – METEMOGLOBINA; METIONINA.

Massimiliano ANDREAZZOLI

Ricercatore, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Sezione di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa – INDUZIONE EMBRIONALE.

Mario ANDREOLI

Ordinario di Endocrinologia, Università «La Sapienza», Roma – ORMONI.

Gabriella ANGELETTI

Professore Associato in Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università di Perugia – GONADORELINA (LHRH; GnRH), ANALOGHI DELLA.

Mario ANGELICO

Professore Associato di Gastroenterologia, Università «Tor Vergata», Roma – FEGATO E VIE BILIARI.

Matilde ANGELINI ROTA

Professore Associato, Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università «La Sapienza», Roma – INFANTICIDIO; MALATO TERMINALE.

Mariano ANTONELLI

Professore Associato di Pediatria, Direttore del Centro Fibrosi Cistica della Regione Lazio, Università «La Sapienza», Roma – MUCOVISCIDOSI.

Carlo ANTOZZI

Istituto Nazionale Neurologico «Carlo Besta», Divisione Malattie Neuromuscolari, Milano – MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE.

Marco ARGENTA

Medico Chirurgo, Specialista in Neurologia, Dipartimento Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – NEURO-URO-GASTROENTEROLOGIA.

Giuseppe ARMANI

Professore Associato di Igiene, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Pisa – HAEMOPHILUS GENERE; ISOLAMENTO.

Flavio ARMELLINO

Dirigente Medico di I Livello, Ospedale «Maria Vittoria», Torino – LAPAROSCOPIA CHIURGICA GINECOLOGICA.

Orlando ARMIGNACCO

Aiuto di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera «L. Spallanzani»; I.R.C.C.S., Roma – GRAFFIO DI GATTO, MALATTIA DA PAOLO ASCENZI

Ordinario di Chimica Biologica, Facoltà di Scienze M.F.N., Università degli Studi «Roma Tre», Roma – METEMOGLOBINA; METIONINA; MIOGLOBINE; MONOSSIDO D'AZOTO.

Filippo ASÒLE

Professore Associato, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – IPERTENSIONE ARTERIOSA CHIRURGICA; OZONO-OSSIGENO TERAPIA.

Ettore ASTORRI

Professore Associato di Cardiologia, Università di Parma – MIOCARDIO.

Franco AVERSA

Responsabile del Centro Trapianti Midollo Osseo, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica, Università di Perugia – FERRO; MIDOLLO OSSEO.

Andrea BACIGALUPO

Primario Centro Trapianti di Midollo Osseo, Divisione Ematologia II, Ospedale «S. Martino», Genova – MIDOLLO OSSEO.

Angelo BAGGIANI

Ricercatore Universitario, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa – MYCOBACTERIUM GENERE.

Alessandro BALLIO

Professore Emerito, Università «La Sapienza», Roma; già Ordinario di Chimica Biologica – FITORMONI; FITOTOSINE.

Giuliana BARBABIETOLA

Specialista in Ematologia, Università di Perugia – FERRO.

Giuseppe BARBANTI-BRODANO

Ordinario di Microbiologia, Facoltà di Medicina, Università di Ferrara – FLAVIVIRUS; HERPESVIRUS; ORBIVIRUS.

Giuseppina BARSACCHI

Ordinario di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Sezione di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa – INDUZIONE EMBRIONALE.

Dante BASSETTI

Direttore Istituto di Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Università di Genova – MACROLIDI.

Francesco BASSETTI

Aiuto, Istituto Dermatologico «S. Maria e S. Gallicano», Roma – IMPETIGINE.

Andrea BELELLI

Centro Biologia Molecolare, Centro Nazionale delle Ricerche c/o Dipartimento Scienze Biochimiche, Università «La Sapienza», Roma – MONOSSIDO D'AZOTO.

Filiberto BELLI

Divisione di Chirurgia Generale «B», Istituto Nazionale Tumori, Milano – MELANOMA.

Alberto BELLONE

Istituto di Clinica Oculistica, Università di Torino – OCULOPLASTICA CHIRURGICA PALPEBRALE.

Nicoletta BERARDI

Professore Associato di Fondamenti Anatomico Fisiologici dell'Attività Psicica, Dipartimento di Psicologia, Università di Firenze – NEUROPLASTICITÀ.

Stefania BERNARDI

Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università «Tor Vergata», Roma – MANO-PIEDE-BOCCA, MALATTIA.

Giovanni BERLUCCHI

Ordinario di Fisiologia Umana, Università di Verona – LIMBICO SISTEMA.

Laura BERTOLASI

Professore a contratto, Scuola di Specializzazione in Neurologia, Università di Verona; Dirigente di I Livello, Sezione di Neurologia Clinica, Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona – ISAACS, SINDROME DI.

Guido BERTOLINI

Responsabile dell'Unità di Epidemiologia e formazione per la pratica clinica, Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Milano – FORMAZIONE PERMANENTE DEL MEDICO.

Gabriele BIANCHI PORRO

Direttore Cattedra di Gastroenterologia, Polo Universitario «L. Sacco», Milano – HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONE DA; LANSOPRAZOLO; OMEPRAZOLO.

Corrado BIANCHINI

Specialista e Docente in Gastroenterologia e Medicina Tropicale, Dipartimento Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – MALARIA.

Giovanni BIASI

Istituto di Reumatologia, Università di Siena – FIBROMIALGIA.

Caterina BOGETTO

Istituto Clinica Oculistica, Università di Torino – OCCHIO; OCULOPLASTICA CHIRURGICA PALPEBRALE.

Camillo BOGLINO

Primario Divisione Chirurgia Pediatrica, Ospedale Pediatrico «Bambino Gesù», Roma – MEDIASTINO; MEGACOLON; NEFROBLASTOMA; NEUROBLASTOMA.

Martino BOLOGNESI

Professore Ordinario di Chimica Biologica, Facoltà di Scienze M.F.N., Università di Genova – MIOGLOBINE.

Stefano BOMBARDIERI

Responsabile U.O. di Immunologia Clinica, Istituto Patologia Medica, Università di Pisa – IMMUNOCOMPLESSI, MALATTIE DA.

Gianni BONADONNA

Direttore Divisione Oncologia Medica, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano – MAMMELLA.

Ferruccio BONINO

Direttore dell'Unità Operativa Autonoma di Gastroenterologia ed Epatologia, Policlinico di Cisanello, Pisa – LAMIVUDINA.

Claudio BORCHI

Aiuto, Clinica Medica III, Professore a contratto, Università di Bologna – IPERTENSIONE ARTERIOSA.

Gianfranco BORTOLETTI

Professore Associato di Parassitologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Cagliari – MICROSPORIDIOSI; OPTORCHIASI.

Enrico BOSCHETTI

Professore Associato di Cardioangiologia Medica, Università di Perugia – IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE.

Raffaele BOTTIN

Ricercatore Confermato, Clinica ORL, Servizio Foniatria, Università di Padova – NASO E SENI PARANASALI.

Giovanna BOUMIS

Tecnico Amministrativo, Facoltà Medicina e Chirurgia, Università «La Sapienza», Roma – METEMOGLOBINA; METIONINA.

Luigi BOZZAO

Professore Ordinario, Titolare I Cattedra di Neurologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – NUCLEARE MEDICINA.

Roberto BRACAGLIA

Istituto Clinica Chirurgica Generale, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – MAMMELLA.

Maria Luisa BRANDI

Professore Associato di Malattie del Metabolismo, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Sezione di Endocrinologia, Università di Firenze – NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE.

Maurizio BUCCA

Dottore di Ricerca in Psicodinamica e Neurofisiologia nelle discipline Psichiatriche; Dirigente Medico Psichiatra, Dipartimento di Scienze Psichiatriche, Università di Genova – FITTIZI DISTURBI; NEVROSI.

Massimo Gilberto BUCCI

Direttore Clinica Oculistica, C.I. Columbus, Università «Tor Vergata», Roma – GLAUCOMA.

Antonino BUFFONE

Collaboratore Tecnico-Medico, Cattedra Chirurgia d'Urgenza e Pronto Soccorso, Università di Catania – LAPAROSCOPIA.

Federico BUSSOLINO

Ordinario di Chimica Biologica, Università di Torino – FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE.

Luigi CALANDRIELLO

Dottore di Ricerca in Neuroscienze, Dipartimento Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – NERVOSO SISTEMA; NEUROFIBROMATOSI.

Luisella CAMERINO
Specialista in Oculistica, Università di Torino – LENTI E OCCHIALI.

J. Stewart CAMERON
Emeritus Professor of Nephrology, CBE MD BSC FRCP, London – NEFROPATIE MEDICHE.

Corradino CAMPISI
Professore Associato Confermato di Chirurgia Generale, d'Urgenza e Pronto Soccorso; Direttore del Corso di Perfezionamento in Microchirurgia, Università di Genova, Ospedale «S. Martino», Genova – LINFEDEMA.

Maurizio CANIGLIA
Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università «Tor Vergata», Roma – OPPORTUNISTICHE INFEZIONI.

Alessandra CANNETI
Dottoranda in Medicina, Roma – HANTAVIRUS, MALATTIE DA.

Lorella M. T. CANZONIERO
MD, PhD, Research Associate in Neurology, Washington University, St. Louis, Missouri – GLUTAMMATO, ANTAGONISTI DEL.

Vincenzo CARNEVALE
Aiuto, Ospedale «Casa Sollievo della Sofferenza», IRCCS, S. Giovanni Rotondo (Foggia) – KALLMANN-DE MORSIER, SINDROME DI.

Giuseppe CAROLI
Professore Ordinario d'Igiene, Università di Pisa – MYCOBACTERIUM GENERE.

Amilcare CARPI DE RESMINI
Già Direttore Laboratorio di Fisiopatologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma – FINASTERIDE; IMIDAZOLINICI RECETTORI; METADONE.

Natale CASCINELLI
Presidente, W.H.O. Melanom Programme, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano; Direttore Scientifico, Istituto Nazionale Tumori, Milano – MELANOMA.

Enrico CASTINO
Marketing Manager, Knoll Farmaceutici, Muggiò, Milano – OMOCISTEINA.

Andrea CAVAGGIONI
Ordinario di Fisiologia Umana, Nuovo Policlinico, Università di Padova – OLFATTO.

Rino CAVALIERI
Direttore Scientifico dell'I.D.I.; Primario Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma – ITTIOSI.

Antonino CAVALLARI
Ordinario di Chirurgia, Università di Bologna; Direttore, Clinica Chirurgica II, Policlinico «S. Orsola», Bologna – FEGATO E VIE BILIARI.

Tiziana CAVALLARO
Assistente Medico, Sezione di Neurologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona; Dirigente Medico, Azienda Ospedaliera di Verona – NERVOSO TESSUTO.

Isabella CECCHERINI
Assistente Biologo, Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto «G. Gaslini», Genova – GENETICA MEDICA E UMANA.

Walter CECCHETTI
Professore a contratto, Scuola di Specializzazione in Fisica Sanitaria, Università «Tor Vergata», Roma – LASER.

Remo CEFFA
Specialista in Ortopedia e Traumatologia; Specialista in Chirurgia della Mano; Aiuto ospedaliero, Azienda Ospedaliera «Maggiore della Carità», Novara – FRATTURE.

Paolo CERRETELLI
Ordinario di Fisiologia Umana, Università di Milano – FATICA.

Guglielmo CERULLO
Specialista in Ortopedia; Specialista in Medicina dello Sport;

Docente, Scuola di Specializzazione in Ortopedia, Università di Siena – MENISCHI E LEGAMENTI.

Dennis W. CHOI
MD, PhD, Professor and Head of Neurology, Washington University, St. Louis, Missouri – GLUTAMMATO, ANTAGONISTI DEL.

Maria Irene CIOLI
Istituto Farmacologia, Università «La Sapienza», Roma – IBOGAINA.

Massimo CIPOLLA
Specialista in Ortopedia; Specialista in Medicina dello Sport; Assistente Ortopedico, Università «La Sapienza», Roma – MENISCHI E LEGAMENTI.

Guido CIPRANDI
Aiuto, Chirurgia Pediatrica, Dipartimento Chirurgia Pediatrica, Ospedale Pediatrico «Bambino Gesù», Roma – MEDIASTINO; MEGACOLON; NEFROBLASTOMA; NEUROBLASTOMA.

Ercole CIRINO
Ordinario di Chirurgia d'Urgenza e Pronto Soccorso, Università di Catania – LAPAROSCOPIA.

Ettore CITTADINI
Direttore Clinica Ostetrica e Ginecologica, Istituto Materno Infantile, Palermo – FECONDAZIONE ASSISTITA.

Vera CLÒ
Specialista in Oncologia Medica, Divisione di Oncologia Medica, Policlinico Universitario, Modena – LINFOMI.

Fabio COCCOLO
Istituto Malattie Apparato Cardiovascolare, Università di Bologna – MIOCARDIOPATIE.

Claudio COCO
Ricercatore in Chirurgia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Policlinico «A. Gemelli», Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Marco COLASANTI
Ricercatore, Facoltà di Scienze M.F.N., Dipartimento di Biologia, Università degli Studi «Roma Tre», Roma – MONOSSIDO D'AZOTO.

Massimo COLETTA
Ordinario di Chimica e Propedeutica Biochimica, Università «La Sapienza», Roma – MIOGLOBINE.

Luigi CONDORELLI
Specialista in Endocrinologia, Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Salvatore CONDORELLI
Professore Associato di Fisiologia Umana, Università «La Sapienza», Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Anita CONFORTI
Ricercatore Confermato, Istituto Farmacologia, Ospedale Policlinico «Borgo Roma», Verona – FARMACOSORVEGLIANZA.

Angelo CONTI
Professore di Chirurgia Generale, Sezione di Clinica Chirurgica III, Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Anestesiologiche, Università di Bologna – OBESITÀ.

Laura CONTI
Dirigente I Livello, Servizio Patologia Clinica, Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori «Regina Elena», Roma – FATTORI DI CONTATTO; FIBRINOLISI.

Enrico CORTESI
Professore Associato, Cattedra di Oncologia Medica, Università «La Sapienza», Roma – METASTASI.

Alessandro CORTOPASSI
Specialista in Stomatologia e Protesi dentaria; Specialista in Anestesia e Rianimazione, Firenze – LASER.

Paolo CORUZZI
Ricercatore Universitario, Istituto di Semeiotica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Parma – IMMERSIONE VERTICALE FINO AL COLLO.

Alberto COSTA
Istituto Europeo di Oncologia, Università di Milano – MAMMELLA.

Marisa COVI
Istituto Fisiologia e Malattie Apparato Respiratorio, Università di Modena – ISEPAMICINA; LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE.

Sonia CRISTALLINI
Dottorando di Ricerca in Fisiopatologia Applicata, Università di Perugia – IPOCALCEMIA.

Mario CRUCIANI
Aiuto Ospedaliero, Divisione Clinicizzata di Malattie Infettive, Ospedale Maggiore di Borgo Trento, Verona – MACROLIDI.

Maurizio CUTOLO
Aiuto, Divisione di Reumatologia; Direttore Laboratorio di Ricerca Reumatologica, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova – FIBRILLINA; MARFAN, SINDROME DI.

Francesca CUTRUZZOLÀ
Ricercatore Universitario, Dipartimento Scienze Biochimiche, Università «La Sapienza», Roma – MUOGLOBINE.

Bruno DALLAPICCOLA
Direttore Cattedra di Genetica Medica, Università «Tor Vergata», Roma; Direttore Scientifico I.R.C.C.S., «Casa Sollievo della Sofferenza», San Giovanni Rotondo (Foggia) – HOLT-ORAM, SINDROME DI; NOONAN, SINDROME DI.

Sandra D'ALFONSO
Ricercatore in Genetica Umana, Università di Torino – HLA.

Ciro D'ALÒ
Istituto Anestesia e Rianimazione, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – IPERBARICA TERAPIA.

Maurizio D'AMICO
Istituto di Clinica Otorinolaringoiatrica, Università «La Sapienza», Roma – FARINGE.

Franco DAMMACCO
Ordinario di Medicina Interna; Direttore Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari – MODIFICATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA.

Daniele DANESE
Capo Reparto Laboratorio di Analisi, Istituto Medico Legale, Aeronautica Militare, Roma; Docente presso Scuola di Specializzazione Endocrinologia I, Università «La Sapienza», Roma – ORMONI.

Pietro D'ARCANGELO
Già Professore Associato e Titolare del Corso di Fisiologia Umana e dell'Apparato Stomatognatico, Università «La Sapienza», Roma – MASTICAZIONE.

Patrizia D'ARGENIO
Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università «Tor Vergata», Roma – MANO-PIEDE-BOCCA, MALATTIA; OPPORTUNISTICHE INFEZIONI.

Filippo DE BRAUD
Divisione di Oncologia Medica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano – FLOXURIDINA.

Carlo DE FELICE
Assistente di Radiologia, II Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università «La Sapienza», Roma – FETO.

Costantino DE GIACOMO
Aiuto, Clinica Pediatrica I.R.C.C.S., Policlinico «S. Matteo», Pavia; Professore a contratto di Gastroenterologia Pediatrica, Università di Pavia – HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONE DA.

Roberto DELLE CHIAI
Medico Chirurgo; Specialista in Psichiatria, III Cattedra Psichiatrica, Università «La Sapienza», Roma – FLUOXETINA ED ANALOGHI.

Giuseppe DEL PORTO
Cattedra Genetica Medica, Università «La Sapienza», Roma, c/o Ospedale «Spallanzani», Roma – NEFROPATIE MEDICHE.

Ugo DE LUCA
Dirigente di I Livello, Ospedale Santobono, Napoli – FETO.

Anna Maria DE NEGRI
Oculista, Istituto Scientifico «S. Raffaele», Monte Tabor, Roma – LEBER, MALATTIA DI.

Ferdinando DE NEGRI
Dirigente Medico I Livello, Istituto di Clinica Medica II, Università di Pisa – MELATONINA.

Luciana DENTE
Dipartimento di Biologia, Università «Tor Vergata», Roma – GENOTECHE.

Marcella DEVOTO
Ricercatrice Universitaria, Dipartimento di Oncologia Clinica e Sperimentale, Università di Genova – GENETICA MEDICA E UMANA.

Gaetano DI CHIARA
Ordinario di Farmacologia e Farmacoterapia, Facoltà di Farmacia, Università di Cagliari – MARIHUANA.

Francesco DI COSTANZO
Servizio Oncologico, Ospedale Civile «Santa Maria», Terni – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Biagio DIDONA
Aiuto Dermatologo, I Divisione Dermatologica, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma – ITTIOSI.

Natale Mario DI LUCA
Professore Associato di Medicina Legale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università «La Sapienza», Roma – INFORTUNISTICA MEDICINA; INVALIDITÀ.

Raffaella DI NARDO
Istituto di Radiologia, Università «La Sapienza», Roma – FETO.

Ermanno DOMENICHINI
Primario Servizio Anestesia e Rianimazione; Responsabile Direzione Scientifica e Biblioteca, Ospedale Maggiore, Crema – HEIMLICH, MANOVRA DI.

Francesco DONATELLI
Istituto Malattie Apparato Cardiovascolare e Respiratorio, Università di Milano – LASER.

Gianpaolo DONZELLI
Professore Associato di Neonatologia, Università di Firenze – MORTE IMPROVVISA; NEONATO.

Gino DORIA
Ordinario di Immunologia, Università «Tor Vergata», Roma – IMMUNITÀ.

Paolo DURAND
Direttore Scientifico, Ospedale «Bambino Gesù», Roma – NIEMANN-PICK, MALATTIA DI.

Luigi ELIA
Docente della Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università «Tor Vergata», Roma – MANO-PIEDE-BOCCA, MALATTIA; OPPORTUNISTICHE INFEZIONI.

Elizabeth J. ELLIOTT
Sydney University Teaching Unit, Royal Alexandra Hospital for Children, Parramatta, Australia – LAFORA, MALATTIA DI.

Dierk ENDEMAN
Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Germania – IPERTENSIONE ARTERIOSA.

Emanuele ERRIGO
Professore Associato di Allergologia e Immunologia Clinica, Università «La Sapienza», Roma – IMMUNODIAGNOSTICA.

Ciro ESPOSITO
Ricercatore Confermato di Chirurgia Pediatrica, Università di Reggio Calabria – FETO; LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA.

Giovanni ESPOSITO
Ordinario di Chirurgia Pediatrica, Università «Federico II», Napoli – FETO.

Brunangelo FALINI
Professore Associato di Ematologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia – LINFOMI.

Roberto FANFANI
Ospedale «Cristo Re», Roma – METORRAGIA.

Marcello FARINELLI
Dirigente di I Livello di Neurologia, Dipartimento di Medicina, Recupero & Rieducazione Funzionale, Ospedale «La Colletta», Arenzano (Genova) – GUILLAIN-BARRÉ, SINDROME DI.

Antonella FARSETTI
Ricercatore C.N.R. e Docente presso Scuola di Specializzazione Endocrinologia I, Università «La Sapienza», Roma – ORMONI.

Mauro FASANO
Ricercatore Universitario, Facoltà di Scienze M.F.N., Università di Torino – METEMOGLOBINA.

Cristina FAVERO
Istituto Clinica Oculistica, Università di Torino – OCCHIO.

Silvia FAVILLI
Dirigente I Livello, U.O. Cardiologia, Azienda Ospedaliera «A. Meyer», Firenze – NEONATO.

Nicola FAZIO
Divisione di Oncologia Medica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano – FLOXURIDINA.

Massimo FEDERICO
Professore Associato di Oncologia Medica, Divisione di Oncologia Medica, Policlinico Universitario, Modena – LINFOMI.

Piera FELE
Psichiatra-Psicoterapeuta; Borsista nel Dipartimento di Scienze Psichiatriche, Università di Genova – FETICISMO.

Renato FELLIN
Ordinario di Medicina Interna, Istituto di Medicina Interna 2, Università di Ferrara – IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE; OLI DI PESCE.

Eduardo FERNANDEZ
Ricercatore Confermato, Istituto Neurochirurgia, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – NERVO.

Paolo FILIPPONI
Professore Associato di Malattie Metaboliche e del Ricambio, Università di Perugia – IPOCALCEMIA.

Mirella FILOCAMO
Dipartimento Scienze Biochimiche, Università «La Sapienza», Roma – GAUCHER, MALATTIA DI.

Massimo FIORILLI
Dipartimento Medicina Clinica, Università «La Sapienza», Roma – IMMUNODEFICIENZE.

Leonardo FLENGHI
Assistente Ospedaliero, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia – LINFOMI.

Marco FLORIDIA
Ricercatore, Istituto Superiore di Sanità, Roma – MIELITI.

Giovanni B. FOGAZZI
Dirigente Medico I Livello, Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Maggiore, IRCCS, Milano – NEFROPATIE MEDICHE.

Giuseppe FORNARINI
Specializzando, Cattedra di Oncologia Medica, Università «La Sapienza», Roma – METASTASI.

Marina FRONTALI
I Ricercatore, Istituto Medicina Sperimentale, C.N.R., Roma – FRIEDREICH, MALATTIA DI.

Roberta FRUTTERO
Ordinario di Chimica Farmaceutica, Dipartimento Scienze

e Tecnologia del Farmaco, Facoltà Farmacia, Università di Torino – MONOSSIDO D'AZOTO.

Remo FUMAGALLI
Ordinario di Farmacologia e Farmacognosia, Istituto di Scienze Farmacologiche, Università di Milano – IPOCOLESTEROLEMICI FARMACI.

Mauro GALEAZZI
Professore Associato di Reumatologia, Facoltà di Medicina, Università di Siena – FIBROMIALGIA.

Giuseppe M. GANDOLFO
Ordinario di Patologia Clinica, Università «La Sapienza», Roma – FATTORI DI CONTATTO; FIBRINOLISI.

Detlev GANTEN
Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Germania – IPERTENSIONE ARTERIOSA.

Nicola GARCEA
Professore Associato in Ginecologia Endocrinologica; Primario Divisione Ginecologia Disfunzionale e Osservazione Ostetrica, Policlinico Universitario «A. Gemelli», Roma – GRAVIDANZA; OVARICA IPERSTIMOLAZIONE, SINDROME DA.

Tigellio GARGIULO
Primario Divisione Ostetricia e Ginecologia, Ospedale «Maria Vittoria», Torino – LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA.

Alberto GASCO
Professore Ordinario di Chimica Farmaceutica, Dipartimento Scienze e Tecnologia del Farmaco, Facoltà Farmacia, Università di Torino – MONOSSIDO D'AZOTO.

Rosanna GATTI
Libero Docente in Clinica Pediatrica, Primario Divisione III, Istituto «Giannina Gaslini», Genova Quarto – GAUCHER, MALATTIA DI; GLICOGENOSI; MUCOPOLISACCARIDOSI.

Cesare GERIN
Già Direttore dell'Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università «La Sapienza», Roma – INFORTUNISTICA MEDICINA.

Gian Luigi GESSA
Ordinario di Neuropsicofarmacologia, Università di Cagliari – NEUROLETICI FARMACI.

Pietro GHEZZI
Capo Laboratorio Neuroimmunologia, Istituto Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Milano – INTERLEUCINE.

Franco GHISELLINI
Libero docente in Clinica Ortopedica, Università di Pavia; Primario Ospedaliero, Divisione di Ortopedia e Traumatologia, Azienda Ospedaliera «Maggiore della Carità», Novara – FRATTURE.

Alessandro M. GIANNI
Divisione Oncologia Medica, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano – MAMMELLA.

Franco GIANTURCO
Libero docente in Anestesia e Rianimazione, Università «La Sapienza», Roma – MORTE.

Bruno GIARDINA
Direttore Istituto di Chimica e Chimica Clinica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – METEMOGLOBINA; MIOGLOBINE.

Fiorina GIONA
Funzionario tecnico di Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università «La Sapienza», Roma – LEUCEMIE.

Mario GIORDANI
Professore, Dipartimento di Chirurgia; Vice-Direttore della Scuola di Specializzazione in Chirurgia Generale, Università di Verona – FEGATO E VIE BILIARI.

Giovanni GIUDICE
Professore Ordinario di I fascia di Biologia dello Sviluppo, Università di Palermo – OMEOTICI GENI.

Marina GIULIANO
Ricercatore, Istituto Superiore di Sanità, Roma – LYME, MALATTIA DI.

Roberto GRADNIK
General Manager, Knoll Farmaceutici, Muggiò, Milano – OMOCISTEINA.

Fabio GRASSI
Ricercatore, Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano – MONOCLONALI ANTICORPI.

Vittorio GRASSI
Ordinario di Medicina Interna, Università di Brescia – IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE.

Jean GREGOIRE
MD, Associate Professor of Medicine; Consultant, Division of Cardiovascular Diseases, Montreal Heart Institute, Montreal (Canada) – LASER.

Adalberto GROSSI
Istituto Malattie Apparato Cardiovascolare e Respiratorio, Università di Milano – LASER.

David R. HOLMES Jr.
MD, Professor Medicine, Mayo Medical School; Consultant in Cardiovascular Diseases and Internal Medicine; Director, Adult Catheterization Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota – LASER.

Maurizio INGHILLERI
Funzionario Tecnico, Dipartimento Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – NEURO-URO-GASTROENTEROLOGIA.

Alessandro INSERRA
Aiuto Chirurgo, Ospedale Pediatrico «Bambino Gesù», Roma – MEDIASTINO; MEGACOLON; NEFROBLASTOMA; NEUROBLASTOMA.

Anna LADOGANA
Medico, Istituto Superiore di Sanità, Roma – GERSTMANN-STRAUSSLER-SCHINKER, SINDROME DI.

Alberto LALA
Ricercatore Confermato, Dipartimento Medicina Interna, Università «Tor Vergata», Roma – INSULINA.

Marco LAZZARONI
Aiuto; Divisione di Gastroenterologia, Polo Universitario «L. Sacco», Milano – HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONE DA; LANSOPRAZOLO; OMEPRAZOLO.

Antonino LEONARDI
Dirigente II Livello di Neurologia, Divisione di Neurologia, Ospedale «S. Paolo», Savona – GUILLAIN-BARRÉ, SINDROME DI.

Roberto LEONE
Ricercatore Confermato, Istituto Farmacologia, Ospedale Policlinico «Borgo Roma», Verona – FARMACOSORVEGLIANZA.

Gastone LEONETTI
Ordinario di Terapia Medica Sistemica, Università di Milano; Primario Divisione di Riabilitazione Cardiovascolare e Malattie Cardiache, Ospedale «S. Luca», Milano – IPERTENSIONE ARTERIOSA.

Vincenzo LEUZZI
Tecnico laureato, Istituto Neuropsichiatria Infantile, Università «La Sapienza», Roma – LEBER, MALATTIA DI.

Gabriel LEVI
Ordinario di Neuropsichiatria Infantile, Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche dell'Età Evolutiva, Università «La Sapienza», Roma – IDIOTA SAPIENTE, SINDROME DELL'.

Egle LEVRÉ
Professore Associato di Igiene e Metodologia Epidemiologica nel Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa – MYCOBACTERIUM GENTRI.

Alessandro LIBERATI
Azienda Ospedaliera «L. Sacco», Milano; Istituto di Ricer-

che Farmacologiche «Mario Negri», Laboratorio Epidemiologia, Milano – MEDICINA DELLE PROVE DI EFFICACIA.

Arcangelo LISO
Specializzando in Ematologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia – LINFOMI.

Susanna LIVADIOTTI
Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università «Tor Vergata», Roma – OPPORTUNISTICHE INFEZIONI.

Giuseppe LONGO
Dirigente I livello, Clinica Medica I, Policlinico Universitario, Modena – LEUCEMIE.

Fabrizio LORENI
Ricercatore, Dipartimento di Biologia, Università «Tor Vergata», Roma; Docente (per supplenza dal 1993) dell'insegnamento Biologia Molecolare II, Corso di Laurea in Scienze Biologiche – GENETICA.

Fabrizio LUPPI
Specialista in Malattie Apparato Respiratorio; Contrattista, Policlinico di Modena – LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE.

Giuseppe LUZI
Ricercatore Universitario Confermato, Università «La Sapienza», Roma – LINFOCITI.

Bruno MAGNANI
Professore Ordinario fuori ruolo; Direttore della Scuola di Specializzazione in Cardiologia, Istituto di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, Università di Bologna – MIOCARDIOPATIE.

Nicola MAGRINI
Responsabile, Unità Operativa di Farmacoepidemiologia e Valutazione dei Servizi Sanitari, Azienda USL di Modena – FARMACI ORFANI.

Salvatore MANCUSO
Ordinario; Direttore Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – OVAIO.

Adriano MANETTI
Primario Cardiologo, U.O. Cardiologia, Azienda Ospedaliera «A. Meyer», Firenze – NEONATO.

Ruggero MANFREDINI
Dirigente I livello, Divisione di Cardiologia, Ospedale Maggiore I.R.C.C.S., Milano – FIBRILLAZIONE E FLUTTER.

Paola MANNA
Ospedale «Cristo Re», Roma – METRORRAGIA.

Corrado MANNI
Direttore Istituto Anestesia e Rianimazione, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – IPERBARICA TERAPIA.

Alberto MANTOVANI
Istituto Farmacologico «Mario Negri», Milano – INTERLEUCINE.

Massimo MARANGI
Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – MALARIA.

Federico MARCHETTI
Dirigente Medico I Livello, Divisione Pediatria, Ospedale di Matera – OTITI.

Aleardo MARESTA
Responsabile del Dipartimento di Cardiologia, Ospedale «S. Maria delle Croci», Ravenna – INFARTO MIocardico.

Pasquale Alessandro MARGARITI
Ricercatore Confermato, Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – OVAIO.

Alessandro MARRA
Dottore di Ricerca in Chirurgia Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Policlinico «A. Gemelli», Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Teodoro MARUOTTI
Specialista in Ostetricia e Ginecologia; Dirigente di I Livello,

Divisione di Ostetricia e Ginecologia II, Arcispedale di «S. Giovanni in Laterano», Roma – LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA.

Cesare MASALA

Primario del Servizio Speciale per le Malattie Autoimmunitarie, Università «La Sapienza», Roma – MALATTIE AUTOIMMUNI.

Carlo MAURI

Professore Emerito, Clinica Medica, Università di Pavia – LEUCEMIE; LINFOMI.

Claudia MAURI

Dirigente I Livello, Servizio di Radiodiagnostica, Ospedale Estense, Modena – LINFOMI.

Francesca Romana MAURO

Cattedra di Ematologia, Università «La Sapienza», Roma – FLUDARABINA.

Vincenzo MAZZAFERRO

Responsabile Unità Trapianto di fegato, Divisione di Chirurgia dell'Apparato Digerente, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano – FEGATO E VIE BILIARI.

Alighieri MAZZIOTTI

Professore Associato di Chirurgia, Università di Bologna; Clinica Chirurgica II, Policlinico «S. Orsola», Bologna – FEGATO E VIE BILIARI.

Ivano MAZZON

Professore, Unità di Isteroscopia, Divisione di Ginecologia, Ospedale «S. Carlo di Nancy», Roma – ISTEROSCOPIA.

David MEGIGHIAN

Professore di ruolo di II fascia, Clinica Otorinolaringoiatrica, Università di Padova – MALATTIE AUTOIMMUNI.

Gianfranco MELONI

Ricercatore Confermato, Clinica Pediatrica, Università di Sassari – GLICOSO-6-FOSFATODEIDROGENASI.

Tullio MELONI

Ordinario di Pediatria; Direttore Clinica Pediatrica, Università di Sassari – GLICOSO-6-FOSFATODEIDROGENASI.

Giovanna MENICHELLA

Specialista in Pediatria, Ospedale «Bambino Gesù», Roma – NEONATO.

Vincenzo MENICHELLA

Libero Docente in Clinica Pediatrica, Università «La Sapienza», Roma; Primario Pediatra, Ospedale di Frascati – NEONATO.

Irene MESSANA

Dipartimento Scienze Biochimiche, Università «La Sapienza», Roma – METEMOGLOBINA.

Salvatore MINISOLA

Assistente, Clinica Medica II, Università «La Sapienza», Roma – IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO; OSTEOPOROSI.

Mauro MISELLI

Farmacista; Responsabile del Servizio di Informazione e Documentazione Scientifica delle Farmacie Comunali di Reggio Emilia; Professore a Contratto, Università di Bologna – INALATORIA TERAPIA; INSULINA.

Guido MODIANO

Ordinario di Genetica Umana, Università «Tor Vergata», Roma – GENETICA.

Alvaro MORDENTE

Ricercatore Universitario, Facoltà Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Milano – MIOGLOBINE.

Gabriele MORESCHINI

Assistente in formazione, I Cattedra, Clinica Otorinolaringoiatrica, Università «La Sapienza», Roma – FARINGE.

Marta MOSCA

U.O. Immunologia Clinica, Istituto Patologia Medica, Università di Pisa – IMMUNOCOMPLESSI, MALATTIE DA.

Monica MOTTES

Istituto di Genetica e Biologia, Università di Verona – OSTEOGENESIS IMPERFECTA.

Priamo MURA.

Dottore in Odontostomatologia, Roma – IMPLANTOLOGIA DENTALE.

Sergio NASI

I Ricercatore C.N.R., Centro Acidi Nucleici, Dipartimento Genetica e Biologia Molecolare, Università «La Sapienza», Roma – FATTORI DI CRESCITA; ONCOGENI E PROTONCOGENI.

Gaetano NETRI

Professore Associato di Chirurgia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Policlinico «A. Gemelli», Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Almerico NOVARINI

Ordinario di Medicina Interna, Istituto di Semeiotica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia Medica, Università di Parma – IMMERSIONE VERTICALE FINO AL COLLO.

Andrea NOVELLETTI

Ricercatore, Dipartimento di Biologia, Università «Tor Vergata», Roma – MOSAICISMO.

Giuseppe NOVELLI

Professore Associato di Genetica Umana, Università «Tor Vergata», Roma – MACHADO-JOSEPH, MALATTIA DI; NORRIE, MALATTIA DI; ODORE DI PESCE, SINDROME DELL'.

Raffaele NUZZI

Ricercatore Confermato; Aiuto, Dipartimento di Oftalmologia, Università di Torino – LENTI E OCCHIALI; OCCHIO; OCULOPLASTICA CHIRURGICA PALPEBRALE.

Pietro OMODEO

Già Ordinario di Zoogeografia, Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Siena; Dipartimento di Biologia, Università «Tor Vergata», Roma – FLUSSO DI INFORMAZIONI IN BIOLOGIA; OMINAZIONE.

Guido PALLADINI

Ordinario di Biologia Generale applicata agli Studi Medici, Università «La Sapienza», Roma – NERVOSO SISTEMA; NEUROFIBROMATOSI.

Giovanni B. PANATTA

Professore Associato di Alimentazione e Nutrizione Umana; Direttore Istituto di Nutrizione Umana, Università di Ferrara – OLIO D'OLIVA.

Franco PANDOLFI

Professore Associato di Semeiotica e Metodologia Medica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – IMMUNODEFICIENZE; KAPOSI, MORBO DI.

Patrizia PANTANO

Aiuto, I Cattedra di Neuroradiologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università «La Sapienza», Roma – NUCLEARE MEDICINA.

Luciano PAOLOZZI

Professore di Microbiologia Generale, Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze, Università «Tor Vergata», Roma – GENETICA.

James R. PARRAT

Chair of Cardiovascular Pharmacology, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland – ISCHEMICO PRECONDIZIONAMENTO DEL CUORE.

Laura PASQUALUCCI

Specializzando in Ematologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia – LINFOMI.

Guglielmo PASTENA

Ricercatore, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Milano) – FETO.

Martin PAUL

Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, Germania – IPERTENSIONE ARTERIOSA.

Gabriele PERRIELLO

Aiuto, Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università di Perugia – OBESITÀ.

Tiziana PERSICHINI
Dottorando di Ricerca, Facoltà di Scienze M.F.N., Dipartimento di Biologia, Università degli Studi «Roma Tre», Roma – MONOSSIDO D'AZOTO.

Eliano PESSA
Professore Associato di Teoria e Sistemi di Intelligenza Artificiale, Facoltà di Psicologia, Università «La Sapienza», Roma – LINGUAGGIO.

Maria Grazia PETRONGARI
Specializzanda in Radiologia, Istituto di Radiologia, Policlinico «Umberto I», Università «La Sapienza», Roma – FETO.

Aurelio PICCIOCCHI
Direttore Istituto di Patologia Chirurgica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma; Fellow of American College of Surgeons – METASTASI.

Pier Franco PIGNATTI
Ordinario di Genetica Molecolare, Facoltà di Medicina, Università di Verona – GENETICA MEDICA E UMANA.

Sergio PIMPINELLI
Ordinario di Genetica, Facoltà di Scienze, Università «La Sapienza», Roma – GENETICA.

Luciano PIRAZZINI
Dipartimento di Cardiologia dell'Azienda USL, Ravenna – INFARTO MIocardico.

Maurizio POCCHIARI
Dirigente di Ricerca, Istituto Superiore di Sanità, Roma – GERSTMANN-STRAUSSLER-SCHEINKER, SINDROME DI.

Antonio POLITI
Specialista in Medicina Interna, Cattedra di Medicina Interna, Università di Brescia – IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE.

Venanzio PORZIELLA
Membro Istituto Patologia Chirurgica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – METASTASI.

Simone PRATESI
Medico Chirurgo, Specializzando in Pediatria indirizzo Neonatologico, Università di Firenze – NEONATO.

Patrizia PRESBITERO
Primario Divisione di Cardiologia, Istituto Clinico «Humanitas», Rozzano, Milano – FETO.

Alberto PREZIOSI
Direttore Istituto di Farmacologia, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – MONOSSIDO DI CARBONIO.

Alberto PRIORI
Specialista in Neurologia; Dottore di Ricerca, Università «La Sapienza», Roma; Dirigente Sanitario di I Livello; Istituto di Clinica Neurologica, Università di Milano, Ospedale Maggiore-Policlinico, Milano – IPERKPLESSIA EREDITARIA.

Giancarlo PUDDU
Specialista in Ortopedia dello Sport; Docente, Scuola di Specializzazione in Ortopedia, Università di Siena – MENISCHI E LEGAMENTI.

Andrea PULVIRENTI
Unità Trapianto di Fegato, Divisione di Chirurgia dell'Apparato Digerente, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano – FEGATO E VIE BILIARI.

Franco QUADRIFOGLIO
Professore di Biologia Molecolare, Facoltà di Medicina, Università di Udine – NUCLEICI ACIDI.

Stefano RADICCHIA
Dirigente Medico di I Livello, Azienda Ospedaliera di Perugia – OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE.

Claudio RAPEZZI
Dirigente Medico di I Livello, Istituto Malattie Apparato Cardiovascolare, Università di Bologna – MIOCARDIOPATIE.

Umberto Maria REALI
Professore Associato di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva,

Istituto di Clinica Dermosifilopatica, Università di Firenze – LASER.

Enrico REGALIA
Unità Trapianto di Fegato, Divisione di Chirurgia dell'Apparato Digerente, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano – FEGATO E VIE BILIARI.

Carlo REGGIANI
Professore Ordinario di Fisiologia Umana, Università di Pavia – MUSCOLARE TESSUTO.

Giuseppe REMUZZI
Coordinatore delle Ricerche, Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare «Aldo e Cele Daccò», Ranica, Bergamo; Aiuto, Divisione di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera, Ospedali Riuniti di Bergamo – MALATTIE RARE.

Stefania RICCI
Specialista in Ostetricia e Ginecologia, Ospedale «Cristo Re», Roma – MENOPAUSA.

Gianfranco RISULEO
Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università «La Sapienza», Roma – GENETICA; METILAZIONE.

Nicolò RIZZUTO
Ordinario di Neurologia; Direttore della Clinica Neurologica, Università di Verona; Membro del Consiglio Scientifico, Istituto Superiore di Sanità; Membro del Comitato Esecutivo dell'European Confederation of Neuropathology (EURO-CNS) – NERVOSO TESSUTO.

Elisabetta ROMAGNOLI
Assistente Medico, Ospedale «S. Giovanni Battista» (SMOM), Roma – IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO.

Carlo ROMANINI
Direttore Clinica Ostetrica e Ginecologica, Ospedale «S. Eugenio», Università «Tor Vergata», Roma – GRAVIDANZA.

Giovanni ROMEO
Professore Ordinario di Genetica Umana, Dipartimento di Oncologia Clinica e Sperimentale, Università di Genova – GENETICA MEDICA E UMANA.

Luigi ROSSI
Medico Chirurgo; Specialista in Igiene e Medicina Preventiva, Università di Pisa – ISOLAMENTO.

Romolo ROSSI
Direttore Dipartimento di Scienze Psichiatriche, Università di Genova; Ordinario della Clinica Psichiatrica – FETICISMO; ISTERISMO.

Anna RUFFILLI
Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica (I.I.G.B.), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli – IMMUNOGENETICA.

Emilio RUMI
Ricercatore Confermato, Istituto Patologia Chirurgica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – INTESTINO TENUE E CRASSO.

Michele SAGNELLI
Titolare dell'Insegnamento di Malattie Otorinolaringoiatriche, Il Canale, Università «La Sapienza», Roma – FARINGE.

Costantino SALERNO
Ordinario di Biochimica Clinica, Università «La Sapienza», Roma – IPOURICEMIA; LIPEMIA; MACROENZIMI.

Alessandro SALVIATI
Sezione Neurologia Clinica, Dipartimento Scienze Neurologiche, Policlinico Borgo Roma, Verona – GANGLIOSIDOSI.

Giovanni SALVIATI
Ordinario di Patologia Generale, Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Padova – MITOCONDRI.

Giuseppe SANGIORGI
MD, Research Associate, Division of Cardiovascular Diseases and Internal Medicine, Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester, Minnesota – LASER.

Sergio SANGUIGNI
Dipartimento Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – MALARIA.

Roberta SANTINI
Medico-Chirurgo; Specializzanda in Psichiatria, Pisa – ISTERISMO.

Francesco SASSO
Ricercatore Confermato; Professore Incaricato di Andrologia, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – IMPOTENZA.

Giovanni SCAMBIA
Professore Associato, Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – OVAIO.

Francesco Jacopo SCARSI
Aiuto Ospedaliero; Docente della Scuola di Specializzazione in Psichiatria, Università di Genova; Psico-terapeuta – ISTERISMO.

Stefano SCHIAFFINO
Ordinario di Patologia Generale, Università di Padova – MUSCOLARE TESSUTO.

Arrigo SCHIEPPATI
Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare «Aldo e Cele D'Accò», Ranica, Bergamo – MALATTIE RARE.

Antonio SCOGNA
Specializzando in Neurochirurgia; Istituto di Neurotraumatologia, Università Cattolica del «Sacro Cuore», Roma – NERVO.

Stefano L. SENSI
MD, Research Ass. in Neurology, Washington University, St. Louis, Missouri – GLUTAMMATO, ANTAGONISTI DEL.

Gino SERRA
Ordinario di Farmacologia e Farmacognosia, Università di Sassari – NEUROLETTICI FARMACI.

Giovan Battista SERRA
Primario Divisione Ostetricia e Ginecologia, Ospedale «Cristo Re», Roma – MENOPAUSA; METRORRAGIA.

Paolo SERVENTI
Aiuto Chirurgo Pediatra, Dipartimento Chirurgia Pediatrica, Ospedale «Bambino Gesù», Roma – MEDIASTINO; ME-GACOLON.

Vincenzo SGRO
Cattedra di Neurofisiologia Clinica, Ospedale «San Paolo», Università di Milano – LANDAU-KLEFFNER, SINDROME DI.

Franco SORICE
Ordinario di Malattie Infettive, Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – FASCITE NECROTIZZANTE.

Thomas E. STARZL
Direttore del «TE Starzl Transplantation Institute», University of Pittsburg, Stati Uniti – FEGATO E VIE BILIARI.

Andrea TASCA
Professore a contratto, Scuola di Specializzazione in Urologia, Università di Padova – LASER.

Adelmo TERNZI
Assistente Ospedaliero, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia – LINFOMI.

Fabrizio TOCCACELI
Ricercatore Confermato; Aiuto Dipartimento Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – HANTAVIRUS, MALATTIE DA.

Tullia TODROS
Professoressa Associata in Ostetricia, Università di Torino – FETO.

Margherita TOMASSINI
Consulente di Allergologia, Istituto Scientifico «S. Raffaele», Milano-Roma – FEBBRE.

Giuliano TOMELLERI
Ricercatore Confermato, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Clinica Neurologica, Azienda Ospedaliera Istituti Ospitalieri di Verona – MIOTONICHE SINDROME; MOTONEURONE, MALATTIE DEL.

Daniela TONIOLO
PhD, Istituto Genetica Biochimica ed Evoluzionistica, Università di Pavia – GENOMA UMANO.

Roberto TOSI
Dirigente di Ricerca, Istituto di Biologia Cellulare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma – HLA.

Alberto TREGNAGHI
Istituto Radiologia e Fisioterapia, Università di Padova – ORECCHIO.

Gabriella TURANO
Dirigente Sanitario di I Livello, Divisione di Neurologia, Ospedale Civile «Ettore Spalenza», Rovato-Brescia – IPERREKPLESSIA EREDITARIA.

Giuseppe VADALÀ
Professore Associato, Chirurgia d'Urgenza e Pronto Soccorso, Università di Catania – LAPAROSCOPIA.

Carla VALENZANO
Specialista in Dermatologia, Università «La Sapienza», Roma – IPERTRICOSI.

Luigi VALENZANO
Responsabile del Day Hospital, Ospedale Dermatologico «Santa Maria e San Gallicano», Roma – IPERTRICOSI.

Luciano VELLA
Già I Ricercatore, Istituto Superiore di Sanità; Libero Docente di Microbiologia, Università «La Sapienza», Roma – MEROPENEM.

Giorgio VELLUTI
Professore Associato, Cattedra Istituto Tisiologia e Malattie Apparato Respiratorio, Università di Modena – ISEPA-MICINA; LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE.

Giampaolo VELO
Direttore Istituto Farmacologia, Ospedale Policlinico «Borgo Roma», Verona – FARMACOSORVEGLIANZA.

Giorgio VENTURINI
Ordinario di Citologia ed Istologia, Facoltà di Scienze M.F.N., Dipartimento di Biologia, Università degli Studi «Roma Tre», Roma – MONOSSIDO D'AZOTO.

Giovanni Battista VIGNA
Dottore di ricerca in Aterosclerosi; Assistente Medico, Istituto di Medicina Interna 2, Università di Ferrara – IPERLI-POPOTEINEMIE E IPOLIPOPOTEINEMIE; OLFATTO; OLI DI PESCE.

Robert VIGNALI
Ricercatore, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Sezione di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa – INDUZIONE EMBRIONALE.

Odoardo VISIOLI
Ordinario di Cardiologia, Università di Brescia – MIOCARDIO.

Massimo VOLPE
Ordinario di Medicina Interna, Università «La Sapienza», Roma – FATTORE NATRIURETICO ATRIALE.

Vincenzo VULLO
Ordinario di Malattie Infettive, Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – FASCITE NECROTIZZANTE.

Paola ZANGARI
Istituto Malattie Infettive e Tropicali, Università «La Sapienza», Roma – MALATTIE AUTOIMMUNI.

Massimo ZEVIANI
Istituto Nazionale Ospedale Neurologico «Carlo Besta», Divisione di Biochimica e Genetica, Milano; Ospedale Pediatrico «Bambino Gesù», Roma – MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE.

Abbreviazioni e simboli

A	ampère	g/l	grammo a litro	Pa (pascal); 1 kPa = 7,50 mmHg)	R.I.A.	dosaggio radio-immunologico
Å	angström	g	accelerazione di gravità	mm ²	RNA	acido ribonucleico
a	accelerazione	Gy	gray (1 Gy = 100 rad)	mm ³	SDH	sorbitolo deidrogenasi
ac.	acido; acidi	GGT	γ-glutamyltransferasi	mol	s; sec	minuto secondo
ACTH	ormone adrenocorticotropo	(o γGT)		mol/l	Sv	sievert (1 Sv = 100 rem)
ADH	ormone antidiuretico	GLDH	glutammideidrogenasi	msec; ms	T.A.C.	tomografia assiale computerizzata
ADP	adenosindifosfato	g/min	giri al minuto	MSH	sin.	sinonimo
AMP	adenosinmonofosfato	GOT	transaminasi glutammico-ossalacetica	mμ	s.l.m.	sul livello del mare
APD	leucina-amilamidasi	GPI	transaminasi glutammico-piruvica	(o nm)	T	temperatura termodinamica
(o LAP)		glt	gocce	μ (o μm)	t	tonnellata
atm	atmosfera	G (W, P)	peso	μbar	τ	temperatura
ATP	adenosintrifosfato	G-6-PDH	glicosio-6-fosfatodeidrogenasi	(= dyn/cm ²)	T _{1/2}	vita media (mean-life)
bar	bar	γ	lotone	μCi	T _{1/2}	tempo di dimezzamento (half-life)
Bq	becquerel (1 Bq = 2,7 · 10 ⁻¹¹ Ci)	γ, o	tensione superficiale	microcurie	ICT	tirocalcitonina
C	coulomb	h	ora	microgrammo	Torr	pressione in mmHg (ora Pa [pascal]; 1 kPa = 7,5 Torr)
°C	grado Celsius	HB	emoglobina	micrometro	TSH	ormone tirotropo
cal	caloria	HB _{Ag}	antigene di superficie del virus dell'epatite B	μl	T ₃	triiodotironina
cd	candela	HCG	gonadotropina corionica umana	N	T ₄	tiroxina
cg	centigrammo	HGH	ormone somatotropo	0,1 N	U.	unità
Ci	curie	(o STH)		■	U.I.	unità internazionale
cm	centimetro	Hz	hertz	Na ⁺ ; Ca ²⁺ ; PO ³	U.V.	ultravioletto
cm ²	centimetro quadrato	I	forza ionica	n.a.	V	volt
cm ³	centimetro cubo	ICSH	ormone stimolante le cellule interstiziali	NAD	V	volume (come grandezza fisica)
CP	creatinofosfato	Ig (A, D, E, G, M)	immunoglobuline e relative classi	NADP	VES	velocità di eritrosedimentazione
CPK	creatinofosfochinasi	i.m.	via intramuscolare	nm	v/v	volume/volume (per esprimere la concentrazione di una soluzione)
cpsec;	} ciclo per secondo	I.R.	infrarosso	NEFA	W	watt
cps		I	joule	N.R.	W. A	lavoro
d; Da	dalton	°K	grado kelvin	v, f	Ω	ohm
d	densità relativa	kat	katal (attività catalitica)	o		
dB	decibel	kcal	chilocaloria (ora kJ; 1 kJ = 0,2389 kcal)	P		
DE ₅₀	dose efficace 50%	kd; kDa	chilodalton	Pa		
DL	dose letale	kg	chilogrammo	p		
DL ₅₀	dose letale 50%	kgm	chilogrammetro	p-		
DL-	racemico (otticamente inattivo per compensazione esterna)	km	chilometro	p.a.		
o (±)		l; L	litro	p.c.		
		LAD	lattatodeidrogenasi	p.f.		
dg	decigrammo	LAP	leucina-amilamidasi	pH		
dl	decilitro	LH	ormone luteinizzante			
dm	decimetro	lm	lumen			
DML	dose minima letale	loc. cit.	luogo citato (riferimento bibliografico)			
DNA	acido desossiribonucleico	LPH	lipotropine	PG		
dyn	dine	lx	lux	PIK		
e	elettrone	λ	lunghezza d'onda	(o PK)		
e.v.	via endovenosa	M	molare	p.m.		
η	viscosità	m	metro	p/p		
ECG	elettrocardiogramma	m ²	metro quadrato			
EDTA	acido etilendiaminotetracetico	m ³	metro cubo			
EEG	elettroencefalogramma	mbar	millibar			
EMG	elettromiogramma	mCi	millicurie			
ERG	elettroretinogramma	mEq/l	milliequivalente al litro			
erg	erg	MeV	megaelettronvolt			
et al.	et alii	mg	milligrammo			
etc.	eccetera	mg/l	milligrammo a litro			
eV	elettronvolt	min	minuto primo			
E. W	energia	ml	millilitro			
F	forza	mm	millimetro			
FAD	flavin - adenindinucleotide	mmHg	millimetro di mercurio; pressione (ora			
FDP	fruttosio difosfato					
FECG	elettrocardiogramma fetale					
FEEG	elettroencefalogramma fetale					
FMN	flavin - mononucleotide					
FSH	ormone follicolostimolante					
g	grammo					

Prefissi per indicare i multipli o i sottomultipli di una unità

d	deci	(10 ⁻¹)
c	centi	(10 ⁻²)
m	milli	(10 ⁻³)
μ	micro	(10 ⁻⁶)
n	nano	(10 ⁻⁹)
p	pico	(10 ⁻¹²)
h	etto	(10 ²)
k	chilo	(10 ³)
M	mega	(10 ⁶)
G	giga	(10 ⁹)
T	tera	(10 ¹²)

Simboli matematici

circa uguale	±, ≈
differente	≠, ≠
infinito	∞
maggiore	>
maggiore o uguale	≥, ≥, ≥
meno	-
minore	<
minore o uguale	≤, ≤, ≤
molto maggiore	≫
molto minore	≪
per cento	%
per mille	‰
più	+
più o meno	±
proporzionale	∝, ∝
uguale	=

ENCICLOPEDIA MEDICA ITALIANA

Aggiornamento II**

FARINGE - OZONO-OSSIGENOTERAPIA

F

FAMCICLOVIR: v. ACICLOVIR E ANALOGHI** (coll. **18-22).

FANCONI, MALATTIA DI: v. FANCONI, MALATTIA DI (VI, 671-675); ANEMIA APLASTICA**, *malattia di Fanconi* (col. **269).

FARINGE [v. vol. VI, coll. 679-774]

FARINGOTONSILLITE STREPTOCOCCICA

SOMMARIO

Etiologia (col. 2117). - **Epidemiologia** (col. 2118). - **Sintomatologia** (col. 2118). - *Forma acuta*. - *Forma cronica*. - **Complicanze** (col. 2119). - **Diagnosi** (col. 2120). - *Test di laboratorio*. - **Terapia** (col. 2121).

Etiologia

Le faringotonsilliti rivestono grande interesse per la frequenza con cui si incontrano nella pratica clinica. Normalmente sono dovute ad infezioni virali e spesso accompagnano malattie stagionali quali il raffreddore e l'influenza; altre volte possono essere causate da un'infezione batterica: streptococchi, stafilococchi, pneumococchi, altri piogeni. L'agente etiologico più frequentemente responsabile dell'infezione è lo streptococco β -emolitico di gruppo A (*Streptococcus pyogenes*; v. STREPTOCOCCUS GENERE*). Nonostante che la morbilità relativa a queste infezioni si sia progressivamente ridotta dal momento della introduzione in terapia degli antibiotici, bisogna porre sempre l'accento sulla necessità di una attenta profilassi e controllo di queste malattie, soprattutto a causa della potenziale pericolosità di talune complicazioni post-streptococciche (otite media, ascessi peritonsillari, adenite cervicale suppurativa, febbre reumatica o glomerulonefrite acuta), conseguenti ad infezioni delle prime vie aeree.

L'attività emolitica dello *S. pyogenes* dipende dalla produzione di due tossine emolitiche delle quali una è labile in presenza di ossigeno ed è denominata streptolisina O e l'altra, sprovvista di potere immunogeno, è denominata streptolisina S perché estraibile e solubile in presenza di siero. La streptolisina O è in grado di danneggiare, agendo a livello delle membrane cellulari, oltre che i

globuli rossi, anche i leucociti e le piastrine. Questa tossina è dotata di potere immunogeno; infatti la titolazione del titolo anti-streptolisinico O è il procedimento sierologico più usato per accertare le infezioni streptococciche di gruppo A. La tossina eritrogenica è dotata di una numerosa serie di effetti tossici rappresentati dalla capacità di innalzare la temperatura corporea attraverso una probabile mobilitazione del pirogeno endogeno dei leucociti, da una estesa citotossicità, dalla capacità di aumentare notevolmente la sensibilità dell'organismo ad altri materiali tossici di origine batterica e da una certa capacità immuno-depressiva. Degli esoenzimi prodotti da *S. pyogenes* sono da ricordare: deossiribonucleasi, la streptochinasi che agisce attivando il plasminogeno in plasmina capace di solubilizzare la fibrina, ialuronidasi e proteinasi in grado di favorire la diffusione attraverso i piani tissutali. I componenti cellulari che intervengono nel meccanismo dell'azione patogena dello *S. pyogenes* sono la capsula di acido ialuronico e la proteina M della parete cellulare dotate di una intensa attività antifagocitaria; il polisaccaride C e l'emolisina intracellulare. Inoltre è da menzionare il fatto che alcuni antigeni superficiali presentano una reattività crociata con antigeni di alcuni tessuti dell'organismo, nel quale possono scatenare quindi una reazione autoimmunitaria.

Epidemiologia

L'incidenza di questa infezione è maggiore nei bambini di età compresa tra i 5 e i 15 anni, senza predilezione di sesso. Lo *S. pyogenes* può essere isolato in una percentuale sino al 30% dei pazienti che si presentano in un ambulatorio medico per una faringite (Taylor e Howie, 1983). Questa patologia ha un'incidenza stagionale in inverno ed all'inizio della primavera e la diffusione del microorganismo avviene dal malato o portatore sano per mezzo delle goccioline emesse con gli starnuti e con i colpi di tosse ed è favorita dal sovraffollamento. I pazienti con faringotonsillite streptococcica acuta sono portatori di un gran numero di germi nell'orofaringe; nel caso non vengano somministrati antibiotici i microorganismi possono persistere nel tratto respiratorio superiore per mesi dopo la scomparsa dei sintomi, anche se presentano una minore carica batterica. In seguito i portatori di streptococco, la cui frequenza resta per un certo periodo tra il 20 e il 25%, hanno minore probabilità di trasmettere il germe agli individui esposti al contagio.

Sintomatologia

Forma acuta

Lo streptococco dà una forma di tonsillite che appartiene al gruppo delle tonsilliti pseudomembranose difteroidi. L'elemento obiettivo fondamentale è costituito dalla presenza di

una falsa membrana di colorito grigiastro, costituita da fibrina e leucociti che ricopre tutta la tonsilla, che ricordano quelle della difterite, ma che ne differiscono per essere più facilmente staccabili dalla superficie. La presenza di febbre elevata (38-39 °C) ad insorgenza improvvisa, la faringodinia, la disfagia, l'intensa iperemia, l'essudazione, l'ingrossamento dei linfonodi sottoangolomandibolari sono ritenuti, dalla maggior parte degli autori, aspetti tipici della infezione da streptococco beta-emolitico di gruppo A, anche se quadri del tutto simili possono riscontrarsi in forme virali, in particolare da adenovirus o da virus di Epstein-Barr.

Forma cronica

Una tonsillite cronica può rappresentare l'esito di un processo acuto, ma in altri casi può instaurarsi come tale sin dall'inizio. L'iperplasia tonsillare si può manifestare con un ingrossamento uniforme delle tonsille che sporgono al di fuori della loggia che le contiene (tonsillite cronica ipertrofica semplice), altre volte le tonsille assumono un aspetto molle e friabile; talvolta il quadro clinico è caratterizzato dalla presenza di materiale caseoso e biancastro (tonsillite cronica criptico-caseosa) ed infine ci sono condizioni in cui è evidente la componente sclerotica localizzata o diffusa (tonsillite cronica sclerotica). Nei bambini gli episodi infiammatori si ripetono frequentemente e pongono interrogativi sulla condotta terapeutica da seguire. Negli adulti la tonsillite cronica è caratterizzata clinicamente da uno stato subfebbrile continuo o saltuario, disfagia lieve, alito fetido ed adenopatia reattiva sottoangolomandibolare.

Complicanze

La faringotonsillite streptococcica può determinare complicanze suppurative, fra le quali le più frequenti sono l'otite media acuta, la sinusite acuta, la linfadenite cervicale suppurativa, gli ascessi peritonsillari e quelli retrofaringei. Altre complicanze tardive sono la febbre reumatica e la glomerulonefrite acuta (GNA). La funzione difensiva anticorpopoietica che rappresenta, soprattutto nei primi dieci anni di vita, la funzione essenziale del tessuto linforeticolare, può, in alcuni casi, trasformarsi in fattore offensivo per l'organismo, scatenando e mantenendo quadri morbosi che prendono il nome di *manifestazioni metaforali*. Il *focus* tonsillare è il più importante ma altri se ne possono instaurare a livello dei denti e dei seni paranasali. Tutti i tipi di streptococco betaemolitico di gruppo A possono essere responsabili delle manifestazioni metaforali cardiache, mentre la GNA sarebbe provocata dal tipo 12 e meno frequentemente dai tipi 4, 1, 19. Il meccanismo attraverso il quale gli streptococchi di gruppo A determinano la malattia non è ancora ben definito. L'impianto diretto dei batteri a livello tessutale deve essere scartato come causa, perché le lesioni tessutali sono sterili. Il periodo di latenza che intercorre tra la faringite e l'inizio delle malattie focali, favorisce l'ipotesi che la risposta immunitaria abbia un ruolo importante.

I meccanismi immunologici sono rappresentati in primo luogo da un processo di autoimmunizzazione basato sulla presenza di autoanticorpi anti-miocardio ed anti-rene a seguito della rottura della tolleranza immunitaria che porta alla liberazione di antigeni normalmente segregati; questi ultimi potrebbero essere prodotti di demolizione cellulare del tessuto linforeticolare tonsillare (autoantigeni), oppure essere costituiti da sostanze di origine batterica (eteroantigeni).

Un secondo meccanismo si baserebbe sulla presenza di complessi solubili A₂ Ab₁ (immunocomplessi circolanti), che precipiterebbero a livello renale o cardiaco scatenando l'attivazione del complemento e determinando alterazioni di tipo vasculitico.

La focalità tonsillare può essere chiamata in causa in tutti i casi in cui esistono manifestazioni metaforali clinicamente conclamate ed in cui esiste un rapporto clinico e temporale ben definito, tra gli episodi di tonsillite (o episodi tonsillitici recidivanti) ed insorgenza delle manifestazioni metaforali. Esiste però tutta una serie di situazioni cliniche senza manifestazioni metaforali clinicamente conclamate, nelle quali bisogna stabilire, attraverso dati clinici o di laboratorio, l'esistenza di un eventuale ed iniziale disordine immunologico in grado di dare manifestazioni focali.

Diagnosi

Ci sono molti elementi che possono guidarci nella diagnosi di *focus* tonsillare. Anzitutto una accurata anamnesi: chiedere al paziente quante volte ha avuto un episodio acuto; con quale frequenza in un anno, se sono comparsi dolori articolari, disturbi renali, cutanei, oculari (uveiti), etc.; se permane febbricola. Dopo l'anamnesi si ispeziona accuratamente il cavo faringeo effettuando una spremitura tonsillare per verificare la fuoriuscita di mucopus dalle cripte tonsillari; occorre verificare infine la presenza di linfonodi latero cervicali ipertrofici.

Test di laboratorio

L'uso del tampone faringeo è comunemente proposto nella diagnosi etiologica delle flogosi tonsillari acute e croniche e, insieme a quelle sierologiche, in quella di malattia focale. Alcune ricerche hanno dimostrato la validità di questa procedura avendo individuato a livello tonsillare una corrispondenza tra flora superficiale e quella parenchimale (Carbonaro *et al.*, 1991; Timon *et al.*, 1991), altri studi, invece, hanno evidenziato una differenza sostanziale tra l'assetto batterico superficiale e quello intraparenchimale (Sarrow *et al.*, 1989).

Una crescita significativa sul terreno di cultura dello *S. pyogenes* è la conferma dell'origine streptococcica dell'infezione in un paziente con faringotonsillite, mentre l'assenza di crescita esclude questa possibilità a condizione che il tampone sia stato effettuato in modo corretto, cioè strofinando energicamente il tampone sulla parete mediale della tonsilla palatina e mantenendo durante il prelievo la lingua piana con un abbassalingua in modo tale da non toccare con il tampone nessun'altra superficie. Molte colture positive, in particolare se sono presenti microrganismi in bassa concentrazione, sono da attribuirsi allo stato di portatore piuttosto che a casi di infezione acuta. L'esame colturale non permette di differenziare con certezza i casi di infezione acuta dallo stato di portatore, ma consente di escludere dalla terapia antibiotica un gran numero di pazienti affetti da mal di gola (70%) e con colture negative per streptococco betaemolitico.

Sono disponibili numerosi test antigenici rapidi per evidenziare mediante reazione immunoenzimatica o di agglutinazione l'antigene di gruppo A direttamente su tampone faringeo o tonsillare. Questi test rapidi sono molto utilizzati in U.S.A. (Gerber, 1985) dove studi a riguardo hanno rilevato una specificità e sensibilità superiori al 90%. Nei pazienti con debole positività all'accertamento colturale possono sfuggire a tali indagini; va però sottolineato che molti di questi pazienti sono portatori asintomatici.

La dimostrazione di anticorpi nei confronti dell'antigene extracellulare secreto dal microrganismo viene spesso considerata come una prova dell'esistenza di un'infezione «immunologicamente significativa». Il titolo più frequentemente usato è quello antistreptolisina O. La positività di questo esame di laboratorio è tardiva, ma può confermare una recente infezione acuta o complicazioni connesse ad una patogenesi focale. Va segnalato, però, che un aumento dei valori di questo titolo si riscontra spesso in soggetti che

non hanno mai lamentato manifestazioni cliniche di tipo metafoale. L'aumento dei valori del titolo antistreptolisinico O in assenza di manifestazione clinica metafoale, non significa ovviamente che il paziente sia affetto da tonsillite cronica di tipo focale, ma è indice soltanto dell'avvenuto contatto tra organismo e streptococco; invece in pazienti con manifestazioni cliniche metafoali l'aumento di questo titolo è la prova della dipendenza di queste complicazioni da un focus, in genere tonsillare.

Anche test più specifici come il titolo APO (Bicciolo *et al.*, 1987) (ossia il dosaggio degli anticorpi antipolisaccaride C della parete cellulare caratterizzati da cross-reattività con i costituenti di cute, articolazioni, cuore e reni e quindi direttamente implicati nell'insorgenza di malattia reumatica) o il test di blastizzazione *in vitro* (Marcato *et al.*, 1987) che osserva la risposta linfoproliferativa indotta da un antigene streptococcico vanno valutati nel complesso di tutti i test esaminati.

Un altro test che può essere considerato è la reazione di Waaler-Rose: presenta però una certa aspecificità, essendo positivo anche nelle malattie del collagene, nelle epatiti, nei mielomi, etc.

L'aumento dei valori della VES, delle mucoproteine sieriche e della proteina C reattiva sono altri dati importanti anche se privi di specificità. Infine è utile la determinazione dei leucociti, della formula leucocitaria e delle sottopopolazioni linfocitarie circolanti.

Alla luce di queste considerazioni, la diagnosi di malattia focale è possibile solo nei casi con manifestazioni metafoali in atto e in cui esiste un chiaro rapporto anamnestico clinico e temporale fra l'insorgenza di queste complicanze e l'episodio faringotonsillitico. Nei casi a focalità subclinica, ogni decisione terapeutica può soltanto scaturire dalla corretta valutazione dei dati clinici e dall'esperienza.

Terapia

Il trattamento della faringotonsillite streptococcica è diretta soprattutto a prevenire le manifestazioni metafoali e le complicanze suppurative. La prevenzione di queste complicanze richiede l'eradicazione del microrganismo dalla faringe mediante terapia antibiotica prolungata. La penicillina rimane il farmaco di prima scelta, in quanto attivo su tutti gli streptococchi di gruppo A. Una singola iniezione i.m. di benzatin-penicillina (600.000 unità per i bambini e 1,2 milioni di unità negli adulti) oppure un trattamento per via orale con penicillina V alla dose di 125-250 mg ogni 6 ore al dì per 12 giorni garantiscono un'ottima copertura. Nei paesi industrializzati la febbre reumatica acuta è oggi giorno un'evenienza rara, grazie anche al miglioramento delle condizioni sociali ed ambientali e all'effetto terapeutico della penicillina. Negli ultimi 10 anni si è riscontrato un aumento dei casi di febbre reumatica nell'America del Nord, e sono aumentati anche i ceppi invasivi di *S. pyogenes* (Schwartz *et al.*, 1990), così come il numero di gravi malattie sistemiche di origine streptococcica come la fascite necrotizzante, la sindrome da shock tossico e la setticemia.

Nei pazienti allergici alla penicillina si ricorre all'eritromicina orale (40 mg/kg/die) (Ginsburg *et al.*, 1984); alcuni ceppi di *S. pyogenes* sono resistenti nei confronti dell'eritromicina, soprattutto nelle aree di impiego più massiccio dell'antibiotico. I macrolidi più recenti come la claritromicina causano minori effetti indesiderati (DTB, 1991; DTB, 1995) ma non sono molto più efficaci nei confronti dei ceppi più resistenti. Le percentuali di insuccesso del trattamento con la penicillina possono arrivare al 25%. Gli antibiotici a largo spettro, come le cefalosporine o l'associazione amoxicillina-acido clavulanico, sono attivi sia nei confronti dei batteri produttori di betalattamasi che dello *S.*

pyogenes. Comunque vanno sempre considerati farmaci di seconda scelta da riservare ai casi in cui il trattamento con la penicillina non abbia avuto successo o in pazienti con faringotonsilliti ricorrenti.

Il trattamento va iniziato immediatamente nei pazienti con faringotonsillite acuta, con marcati sintomi sistemici e in quelli con febbre esantematica scarlattiniforme, senza attendere i risultati del tampone. Stessa considerazione vale per i bambini tra i 3 e i 14 anni, i pazienti immunodepressi, in caso di epidemie di infezioni streptococciche in comunità e nei pazienti con una storia di febbre reumatica. I vantaggi di un trattamento antibiotico immediato consiste nel rapido risolversi della sintomatologia e nel limitare il contagio. Nei pazienti che non presentano sintomi sistemici e locali gravi, è consigliabile attendere il risultato dei dati di laboratorio e del tampone; in questo modo si evita di sottoporre ad un inutile trattamento antibiotico i pazienti con infezioni virali.

L'indicazione alla tonsillectomia è un problema da considerare con molta attenzione, dovendo tener conto della patologia tonsillare, dell'immunocompetenza del tessuto linfoide e dei risultati dell'antibiotico-terapia. Costituisce indicazione alla tonsillectomia una iperplasia di massimo grado, con disturbi del respiro, della deglutizione, della parola; angine recidivanti croniche (più di tre episodi l'anno) cui si associano iperplasie linfoghiandolari regionali, inappetenza, astenia; ascessi peritonsillari e laterofaringei; la febbre reumatica e la nefrite acuta ove sia dimostrato con certezza un rapporto sequenziale con tonsilliti recidivanti.

Alcuni Autori (Bellussi e Passali, 1992) evidenziando, in microscopia elettronica, una metaplasia squamosa nel fondo delle cripte di tonsille che siano state sede di ripetute flogosi, hanno ipotizzato che l'alterazione epiteliale determini un ostacolo alla progressione dell'antigene verso le zone del parenchima tonsillare in cui avviene il primo contatto con il sistema immunitario; non si viene così a realizzare quella prima barriera di neutralizzazione di antigeni da parte di anticorpi specifici in precedenza sintetizzati dai linfociti del tessuto linforeticolare diffuso circostante la cripta. Tutto ciò predisporrebbe ad una facile recidiva dei processi flogistici con conseguente aggravamento della metaplasia squamosa creando così, un circolo vizioso risolvibile solo con la tonsillectomia.

Bibliografia

- Bellussi L., Passali D., *Acta Otorhinol. Ital.*, 1992, 12, 95-106.
- Biasini G. C., *Riv. Inf. Ped.*, 1989, 4, 203-206.
- Bicciolo G. *et al.*, Valutazione comparativa del titolo ASLO e del titolo antipolisaccaride C (APO) nelle flogosi tonsillari recidivanti, in Sala O., Marchiori C., Martini A., *Progressi in O.R.L. Pediatrica*, 1987, CIC Ed. Internazionali, Roma.
- Carbonato V. *et al.*, *Acta Otorhinol. Ital.*, 1991, 11, 497-504.
- DTB, 1991, 29, 101-102.
- DTB, 1995, 4 (2), 9-12.
- Gallo O. *et al.*, *Int. J. Ped. Otorhinolaryn.*, 1991, 22, 219.
- Gerber M. A., *J. Pediat.*, 1985, 107, 85-88.
- Ginsburg C. M., McCracken G. H., Crow S. D. *et al.*, *Am. J. Dis. Child*, 1984, 138, 536-539.
- Kiselica D., *Am. Fam. phys.*, 1994, 49, 1147-1154.
- Marcato P. *et al.*, Valutazione della risposta linfoproliferativa dopo stimolazione «in vitro» con antigene streptococcico in pazienti pediatrici affetti da tonsillite cronica, in Sala O., *Progressi in O.R.L. Pediatrica*, 1987, CIC Ed. Internazionali, Roma.
- Marullo T., Carluccio F., *Aggiornamento del medico*, 1986, 10, 3.
- Motta G., *L'adenotonsillectomia: problemi immunologici e clinici*, 1989, Piccin, Padova.
- Nelson W. D. *et al.*, *Nelson Textbook of Pediatrics*, 1996, Saunders, Philadelphia, pp. 753-754; 1189-1190.
- Sartoris A., Marcato P., *Federazione Medica*, 1990, XLIII (5), 390-393.
- Schwartz B., Facklam R. R., Breiman R. F., *Lancet*, 1990, 336, 1167-1171.
- Surrow J. B. *et al.*, *Laryngoscope*, 1989, 99, 261-266.
- Taylor J. L., Howie J. G., *JR coll genule pract.*, 1983, 33, 783-786.

Timon C. I., Cafferkey M., Walsh M., *J. Otolaryngol.*, 1991, 20, 279-282.
Williams III E. F. et al., *Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, 1991, 104, 509-516.

NICHELE SAGNELLI, GABRIELE MORESCHINI
E MAURIZIO D'AMICO

FARMACI ORFANI

1. *orphan drugs*.

SOMMARIO

Definizione e introduzione (col. 2123). - **La legislazione sui farmaci orfani negli U.S.A.** (col. 2124). - **Esempi di farmaci orfani** (col. 2126). - **Altri problemi legislativi** (col. 2127).

Definizione e introduzione

I farmaci orfani [f. o.] sono farmaci utilizzati nel trattamento di malattie rare. Questa prima definizione evidenzia che i veri orfani non sono tanto i farmaci quanto le malattie rare a cui i cosiddetti f. o. sono destinati. Molte malattie rare infatti sono orfane innanzitutto perché manca loro un trattamento efficace e soprattutto sono orfane perché mancano progetti di ricerca e fondi equamente suddivisi per lo studio di molte malattie rare. Da queste prime riflessioni emergono gli elementi che compongono il problema dei f. o.: le malattie rare, o meglio i soggetti affetti da malattie rare; la ricerca su nuovi trattamenti per queste malattie, le sedi ove si svolge la maggior parte delle ricerche sui nuovi farmaci e gli incentivi volti a favorire le ricerche scientifiche in questa direzione; infine, alcuni esempi di f. o. recentemente approvati.

Le malattie rare (v.***) sono malattie di cui soffrono pochi soggetti o relativamente pochi soggetti. Tuttavia, non esiste una soglia ben precisa oltre la quale una determinata malattia si possa definire rara. Negli Stati Uniti, si è ufficialmente definita rara una malattia con meno di duemilamila casi presenti negli Stati Uniti; questa è una soglia piuttosto bassa (circa un soggetto affetto da una specifica malattia ogni 1000 abitanti), ma la definizione ha un valore soprattutto operativo in quanto riguarda l'attribuzione di un farmaco a questa categoria per fini registrati (Asbury, 1991). Esistono moltissime malattie rare, stimate attorno a circa cinquemila, molte delle quali effettivamente molto rare (pochi casi); purtroppo, la maggior parte di queste malattie non ha un trattamento efficace e non ha neppure un adeguato programma di sviluppo di trattamenti terapeutici o preventivi (Orphan drugs, 1995). Anche se la stima del numero delle malattie rare è approssimativa, essa ci offre un'idea della vastità del problema e della difficoltà di trovare una semplice soluzione. Il principale problema che ha dato vita alla categorizzazione dei f. o. riguarda i criteri per suddividere le risorse disponibili per la ricerca in campo biomedico tra tante diverse malattie e soprattutto i mezzi per indirizzare e agevolare la ricerca effettuata dall'industria farmaceutica verso farmaci che hanno necessariamente un mercato ridotto. Negli ultimi anni si è assistito, anche in Italia, a un fiorire di iniziative per raccogliere fondi, anche con l'appoggio di giornali e radiotelevisione, in favore di specifiche malattie. Per quanto lodevoli, tali iniziative ripropongono in modo evidente il problema di come finanziare appropriatamente le ricerche per le molte malattie rare esistenti. Tali iniziative sorgono su motivazioni di associazioni che si occupano di una specifica malattia e non hanno nessuna forma di coordinamento o compensazione tra loro. Invece, secondo una logica di adeguata programmazione sanitaria e di appropriata assegnazione delle risorse umane ed economiche disponibili, sarebbero necessari programmi

sanitari di salute pubblica maggiormente controllati a livello nazionale e internazionale. Se questo può attualmente apparire remoto o troppo a rischio di una eccessiva centralizzazione delle risorse e dei progetti, allora non resta che accettare l'attuale sistema, che ignora la ricerca su molte malattie rare mentre ne finanzia altre anche lautamente.

Va infatti ricordato che, negli ultimi venti anni, la maggior parte dei farmaci è stata scoperta e sperimentata da parte dell'industria farmaceutica piuttosto che dagli enti di ricerca pubblici. Poiché l'interesse primario dell'industria farmaceutica è quello del mercato (rispetto al quale la ricerca è un mezzo), il problema dei f. o. si è sempre più adeguato alle necessità e alle regole delle ditte produttrici (e scopritrici del farmaco) piuttosto che ai bisogni di salute. Infatti, nella definizione di rarità della malattia per cui viene sviluppato un f. o. si sottolinea che la malattia per cui un farmaco possa definirsi orfano deve essere sufficientemente rara da non garantire alla industria produttrice un ritorno economico che ripaghi le spese, sicuramente assai elevate, di scoperta e di sperimentazione preclinica e clinica di un farmaco (Asbury, 1991; Haffner, 1991). Attualmente i costi di ricerca e sviluppo di un farmaco sono molto elevati (stimati tra i 200 e i 500 miliardi di lire nel 1990) ed è assai lungo (mediamente 12 anni nel 1990) il periodo di tempo necessario per arrivare, dalla sintesi di un farmaco, alla sua immissione in commercio (Editorial, 1995). In questo contesto di criteri prevalentemente economici, si è formato il concetto di f. o., che è stato tradotto in legge dal parlamento degli Stati Uniti nel 1983 con una legge *ad hoc* che porta lo stesso nome (*The 1983 Orphan Drug Act*). Tale legge è rimasta un'eccezione nel panorama internazionale, anche tra i paesi maggiormente industrializzati, ed è attualmente fervido il dibattito su come gli altri paesi industrializzati dovrebbero seguire l'esempio americano.

Si dovrebbero cambiare alcune sperequazioni che da molti anni esistono nel campo della ricerca: ad esempio nel campo dei vaccini, dove l'enorme quantità di risorse dedicate alla ricerca di un vaccino per l'AIDS non sono confrontabili rispetto alla scarsità di risorse disponibili per la ricerca sulla malaria, che pur rappresenta la più devastante tra le infezioni umane (colpisce circa 200 milioni di persone e provoca 2 milioni di morti all'anno) e che è un problema sanitario sicuramente trascurato. Anche se questo genere di confronti risulta difficilmente praticabile, vi sono esempi anche all'interno dei paesi occidentali che possono fare riflettere e che potrebbero essere più facilmente soggetti a cambiamento: ad esempio nel campo delle malattie polmonari, dove negli ultimi 10-20 anni si è speso sicuramente di più nelle ricerche sui mucolitici (farmaci di secondaria importanza per un trattamento di supporto delle bronchiti acute o croniche) rispetto alle ricerche sul trattamento o la prevenzione della tubercolosi. Come si vede, se è difficile per malattie come quelle appena citate definire delle priorità o ripartire le risorse disponibili secondo criteri di salute pubblica, per la moltitudine delle malattie rare ciò si presenta come un problema di difficilissima soluzione.

La legislazione sui farmaci orfani negli U.S.A.

Anche se, nella terminologia medica corrente, a partire dagli anni '70, si è affacciato questo termine di f. o. per designare quei farmaci o quelle tecnologie che, pur promettenti o meritevoli di ulteriori ricerche, non trovano fondi sufficienti per essere sviluppati né trovano un numero sufficientemente ampio di ricercatori che se ne occupino, principalmente per il numero esiguo di pazienti affetti da queste malattie, sempre più questo concetto epidemiologico, o di salute pubblica, è stato sostituito dal concetto operativo di f. o. secondo la definizione di legge adottata negli U.S.A.

Nel 1983, il Parlamento americano ha approvato una legge (il cosiddetto «*Orphan Drug Act*» del 1983, *Public Law* 97-414) disegnata per favorire lo sviluppo e la disponibilità di nuovi farmaci utilizzati nel trattamento di malattie rare attraverso incentivi per le industrie produttrici (principalmente sgravi fiscali e una accelerazione dei tempi di registrazione). Inizialmente per malattia «rara» si intendeva una malattia la cui stima di prevalenza negli U.S.A. non garantiva vendite del farmaco sufficienti a bilanciare la previsione delle spese di ricerca e sviluppo di un farmaco ad essa destinato. Poiché tale definizione era poco chiara, nel 1984 fu approvato un emendamento (*Public Law* 98-551) che definiva come «rara» una malattia o una condizione che colpiva meno di duecentomila persone negli Stati Uniti (nel momento in cui viene effettuata la richiesta come farmaco orfano); mentre la classificazione come orfane per malattie più frequenti rende necessarie prove che le spese previste per lo studio del farmaco difficilmente potranno essere coperte dalle vendite negli U.S.A. Gli incentivi per l'industria produttrice previsti da questa legge sono fondamentalmente due: l'approvazione esclusiva e benefici fiscali (Asbury, 1991). L'approvazione esclusiva di un farmaco per una specifica condizione orfana preclude l'approvazione dello stesso farmaco da parte di altri produttori negli U.S.A. per i successivi 7 anni. I benefici fiscali riguardano la possibilità di avere uno sgravio fiscale pari al 50% dei costi delle ricerche cliniche (non di quelle per la sperimentazione animale) e di ottenere fondi pubblici per tali ricerche. Inizialmente, l'esclusività riguardava unicamente i farmaci privi di brevetto, ma un emendamento del 1985 (*Public Law* 99-91) ha esteso l'esclusività a tutti i f. o., per proteggere quei farmaci il cui brevetto scadeva prima o poco dopo l'approvazione alla commercializzazione.

La legge sui f. o. ha prodotto un forte aumento del numero di f. o. commercializzati o in fase di sviluppo da parte dell'industria e gran parte di questo successo sembra essere dipeso dalla clausola della approvazione esclusiva (Wagner, 1992; Asbury, 1991; Sanders, 1993). Secondo la *Food and Drug Administration* (FDA, l'ente deputato alla registrazione dei farmaci negli Stati Uniti), nei primi 7 anni di questa legge (tra il 1983 e il 1989) sono stati registrati 33 farmaci e altri 301 prodotti sperimentali hanno avuto la designazione di orfani. Tra i 33 farmaci registrati, 21 sono nuovi farmaci (o *New Molecular Entities*, secondo la definizione della FDA), 7 sono nuove formulazioni (diverse preparazioni o diverse forme farmaceutiche di farmaci già in commercio), 2 sono nuove indicazioni di farmaci già in commercio mentre 3 farmaci non sono stati classificati. Tra i 21 nuovi farmaci approvati, 8 (vale a dire il 38%) sono stati definiti come importanti progressi terapeutici mentre i restanti come modesti benefici terapeutici. Aggiornati al 1994, i f. o. registrati sono stati ben 103 e quelli in fase di studio sono oltre 500.

Tre f. o. sono stati definiti come grandi innovazioni nella terapia medica di malattie precedentemente prive di trattamenti efficaci e sono: l'eritropoietina (v.*; v.***) per l'insufficienza renale cronica; un inibitore dell'alfa-1 antitripsina per l'enfisema panacinare; il ganciclovir (v.*) per la retinite da citomegalovirus. In realtà, questa definizione è stata forse un po' benevola (almeno per gli ultimi due farmaci), in quanto essi non rappresentano una cura della malattia (come ad es. l'insulina nel diabete) e, pur trattandosi di farmaci «innovativi», sono in grado di produrre soltanto un rallentamento della progressione della malattia.

Nonostante l'aumento nel numero dei farmaci resi disponibili e le scoperte sopra citate, questa legge ha creato alcuni problemi. Il più evidente, che ha generato molte discussioni sui profitti eccessivi da parte delle industrie pro-

dottrici, riguarda la condizione di monopolio che si viene a creare attraverso la approvazione esclusiva, che può portare a prezzi eccessivi o poco controllati per alcuni prodotti (Garber, 1992). Quindi, se inizialmente la clausola della esclusività era stata creata perché la maggior parte dei f. o. ha un mercato ristretto (di pochi miliardi di lire equivalenti a pochi milioni di dollari), alcuni farmaci come l'eritropoietina, l'ormone della crescita e la pentamidina aerosol hanno invece avuto, ciascuno, vendite annuali superiori a 100 milioni di dollari, cioè ben superiori alle spese sostenute per la loro scoperta. Vedremo più in dettaglio il percorso che hanno avuto questi tre farmaci e ciò ci consentirà di comprendere alcuni aspetti del mercato farmaceutico (Asbury, 1991; Coster, 1992; Haffner & Kelsey, 1992). Un altro punto di discussione è il fatto che la designazione di malattia rara vale al momento della approvazione di un f. o.; pertanto, nel caso dell'AIDS, per qualche anno dopo l'approvazione della legge sui f. o., alcuni farmaci hanno potuto ottenere 7 anni di esclusività sul mercato, anche dopo che la malattia non era dimostrata così rara. In tal modo, l'industria produttrice godeva non solo di un ampio ritorno economico, data l'estensione delle vendite, ma anche di un regime di monopolio e di prezzi invariati; così infatti è stato per i principali farmaci per il trattamento dell'AIDS (o per la prevenzione di malattie associate) come ad esempio l'AZT (o zidovudina), la rifabutina, il ganciclovir o la pentamidina aerosol.

Esempi di farmaci orfani

Eritropoietina umana. - Questo farmaco da DNA ricombinante ha ottenuto la designazione di f. o. per il trattamento dell'insufficienza renale cronica, in quanto l'eritropoietina è in grado di ridurre la necessità di trasfusioni di sangue in pazienti con insufficienza renale in dialisi. La prevalenza di tale patologia era stimata attorno a 120.000 soggetti, mentre altre stime che tengono conto dei pazienti anemici in predialisi porterebbero la prevalenza al di sopra di 200.000 casi all'anno. Nel 1990, anno di commercializzazione del farmaco, in soli 6 mesi, il fatturato ha superato i 100 milioni di dollari e, poiché il farmaco è rimborsato da numerose assicurazioni, vi sono state polemiche legate al costo eccessivo. Va inoltre ricordato che ai farmaci prodotti con la tecnica del DNA ricombinante è stata data una enfasi eccessiva di farmaci «sicuri», mentre le regole per dimostrarne l'efficacia clinica non cambiano e la valutazione della sicurezza richiede nuovi e più sofisticati approcci.

Ormone della crescita. - Questo farmaco (sempre umano e sempre prodotto con la tecnica del DNA ricombinante) va utilizzato nei bambini con deficit di statura e con deficit di secrezione dell'ormone della crescita; si sono avute forti polemiche sul costo eccessivo di questo farmaco, in quanto nonostante vendite molto consistenti (nell'ordine di 150 milioni di dollari all'anno nel 1990) non si è avuta una riduzione del suo prezzo a fronte di spese di sviluppo e produzione assai inferiori (attorno ai 30 milioni di dollari). Inoltre, poiché la FDA ha dato l'approvazione a due ormoni della crescita, diversi tra loro per un solo aminoacido, è nata una *querelle* legale tra le due ditte produttrici per ottenere la esclusività di vendita per 7 anni; comunque, nemmeno tale «concorrenza» ha provocato una diminuzione del costo di questo farmaco. Come si vede, probabilmente, la legislazione americana avrebbe necessità di alcuni chiarimenti o miglioramenti.

Altri farmaci orfani. - Più recentemente, alcuni f. o., come l'interferon-beta da DNA ricombinante per il trattamento della sclerosi multipla (Goodkin, 1994), l'alglucerasi per il trattamento della malattia di Gaucher (Garber, 1992; Goldman *et al.*, 1992) e l'alfa-dornasi per il trattamento

della fibrosi cistica (Collier, 1995), hanno fatto parlare di sé per il loro costo molto elevato a fronte di una efficacia soltanto modesta e nota solo per trattamenti di durata relativamente breve (1 anno), mentre la durata effettiva della terapia sarebbe di fatto molto più lunga, trattandosi di terapie croniche o addirittura a vita. Questi farmaci, anche grazie al loro stato di f. o., hanno ottenuto una approvazione rapida, ma, una volta disponibili, hanno sollevato il problema di definire il loro ruolo in terapia, di individuare i pazienti ai quali si debbano riservare farmaci dal costo molto elevato, o, in altri termini, di valutarne il rapporto costo-beneficio (Collier, 1995). Nel caso dell'interferon-beta, il farmaco è stato registrato dopo che uno studio clinico controllato aveva dimostrato la sua efficacia nel rallentare la progressione delle placche valutate con la risonanza magnetica nucleare, pur in assenza di benefici clinici sulla disabilità. Per l'alfa-dornasi è stata dimostrata solo una modesta efficacia nel ridurre le infezioni nei soggetti affetti da fibrosi cistica e, infine, per l'alglucerasi (probabilmente il farmaco più costoso oggi a disposizione) sono ancora materia di studio dosaggi, modalità di somministrazione e benefici a lungo termine nella terapia della rara malattia di Gaucher.

Fino a quando le evidenze disponibili di efficacia e di sicurezza per un farmaco (anche se orfano) sono deboli, il suo utilizzo iniziale, dopo la registrazione, andrebbe limitato a studi clinici controllati e le autorità sanitarie e la ditta produttrice dovrebbero rendere esplicito che il farmaco è ancora oggetto di studio (Collier, 1995). Invece, questi farmaci dopo avere avuto un iter registrativo accelerato (data la mancanza di un trattamento efficace), una volta registrati, vengono resi disponibili senza una valutazione controllata rigorosa a lungo termine.

Metronidazolo. - Questo esempio riguarda un farmaco vecchio, registrato per la prima volta in Francia nel 1960 come antiprotozario e antibatterico efficace nel trattamento delle vaginiti da *Trichomonas*, che ha avuto una sua storia anche come f. o. degna di essere raccontata (Borgman, 1992). Alcuni anni dopo la sua immissione in commercio, in una paziente in trattamento con metronidazolo per una vaginosi, si osservò la contemporanea guarigione di una gengivite di Vincent di cui la paziente era affetta; questa osservazione portò altri medici alla valutazione del metronidazolo nelle infezioni da batteri anaerobi, per cui è ancora oggi utilizzato. Successivamente, nel 1976 si constatò altrettanto casualmente il miglioramento dell'acne rosacea in una paziente trattata per una infezione vaginale. Altri trattamenti confermarono questa prima osservazione e portarono alcuni ricercatori a valutarne l'efficacia in forma di crema (dati i possibili rischi di un uso prolungato del metronidazolo per via orale) e di cercare l'approvazione come f. o. In soli 5 anni, grazie all'*Orphan Drug Act*, si giunse (nel 1988) alla registrazione del metronidazolo topico per il trattamento della rosacea.

Altri problemi legislativi

Recentemente (tra il 1990 e il 1992), vi è stato un intenso dibattito in particolare negli U.S.A. (v. sopra) e più in generale sulle riviste scientifiche internazionali se e come modificare la legge sui f. o. Le richieste andavano nel senso di ridurre i profitti eccessivi da parte delle industrie produttrici per alcuni farmaci e di favorire prezzi più bassi attraverso una maggiore competitività. Tale dibattito è però cessato dopo il veto del Presidente americano Bush agli emendamenti votati dal Congresso americano che riguardavano principalmente la cessazione della esclusività dopo vendite del farmaco superiori a 150 milioni di dollari (Asbury, 1992).

Altri paesi stanno cercando di adottare qualche forma di legislazione in favore delle malattie rare o dei f. o. Il Giappone nel 1993 ha varato una propria legge in proposito, mentre l'Europa o meglio la Comunità Europea non ha ancora preso nessun provvedimento su questo argomento. Recentemente (giugno 1995) il Ministro della Sanità francese ha presentato un memorandum al Consiglio Europeo dei Ministri della Sanità al fine di «adottare misure concrete per stabilire una strategia in favore dei f. o.». Anche se ancora si preferisce parlare di f. o. piuttosto che di malattie orfane (o rare e prive di un trattamento efficace) è questo un primo passo per avviare anche in Europa un dibattito sui f. o. che sarebbe assai opportuno in quanto, nonostante alcune distorsioni commerciali, la legge sui f. o. è stata ottenuta anche grazie alla pressione di gruppi che rappresentano pazienti o familiari di soggetti colpiti da malattie rare o difficilmente curabili. Va purtroppo ricordato che l'Agenzia che regola la registrazione dei farmaci per l'Europa (*European Medicines Evaluation Agency* o EMEA che ha sede a Londra) non ha ancora dato una propria definizione di f. o. né di malattia rara. Ci si auspica che a breve, dopo numerosi rinvii, anche l'Europa abbia una propria regolamentazione che favorisca la ricerca e lo sviluppo di trattamenti per molte malattie rare senza cura.

Il problema della ricerca e della produzione dei f. o. va reso maggiormente esplicito e soprattutto vanno rese esplicite le decisioni riguardanti: l'utilizzazione nella ricerca dei fondi disponibili sia pubblici che privati (ad esempio quelli attualmente raccolti per singole malattie attraverso donazioni, beneficenza, lotterie, e altro ancora); la selezione delle malattie da privilegiare sulla base dei bisogni epidemiologici; infine, l'identificazione sia degli obiettivi di ricerca da lasciare agli investitori privati (le industrie farmaceutiche) sia degli incentivi o dei possibili benefici economici. Significativo è l'impegno dell'Organizzazione Mondiale della Sanità nella raccolta di fondi per la ricerca nel campo delle malattie tropicali e per lo sviluppo di nuovi contraccettivi.

Bibliografia

- Asbury C. H., *JAMA*, 1991, **265**, 893.
 Borgman R. J., *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 1992, **8**, 566.
 Collier J., *Lancet*, 1995, **346**, 633.
 Coster J. M., *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 1992, **8**, 635.
 Editorial., *Lancet*, 1995, **346**, 917.
 Garber A. M., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1676.
 Goldman D. P., Clarke A. E., Garber A. M., *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 1992, **8**, 583.
 Goodkin D. E., *Lancet*, 1994, **344**, 1057.
 Halfner M. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1991, **31**, 603.
 Halfner M. E., Kelsey J. V., *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 1992, **8**, 647.
 Kasilo O. et al., *I farmaci orfani*, in *Medicina - Riv. EMI*, 1986, **6**, 295-300.
 Orphan drugs, in *Drug Evaluations*, 1995, American Medical Association, U.S.A.
 Sanders C. A., *Arch Intern. Med.*, 1993, **153**, 2623.
 Wagner J. L. J., *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 1992, **8**, 561.

NKOLA MAGRINI

FARMACOSORVEGLIANZA

Sin.: farmacovigilanza; farmacoepidemiologia. - **F.** *pharmacovigilance*. - **I.** *postmarketing surveillance*. - **T.** *Arzneimittelsicherheit*. - **S.** *farmacovigilancia*.

SOMMARIO

Introduzione. Definizione (col. 2129). - **Premessa** sulle metodologie in farmacovigilanza (col. 2131). - **La segnalazione spontanea** (col. 2131). - **Gli studi caso-controllo** (col. 2135). - **Gli studi di**

coorte (col. 2136). - Il *Prescription Event Monitoring* (col. 2137).
- L'acrobazia dei dati (col. 2137).

Introduzione. Definizione

Un'acquisizione che risale sicuramente all'inizio della storia della medicina, quando l'uomo cominciò a utilizzare le piante a scopo terapeutico, è che l'uso dei farmaci può provocare danni all'organismo umano. Già Omero (c. 700 a. C.) e Ippocrate (460-370 a. C.) parlano di questo problema. Paracelso (1493-1541) ci ricorda che «tutte le sostanze sono veleni e nessuna è innocua: la mancanza d'effetti tossici, infatti, dipende sempre dalla dose». L'affermazione di Paracelso rimane ancora uno dei capisaldi della tossicologia, anche se oggi sappiamo che alcuni effetti tossici possono essere indipendenti dalla dose.

In epoca moderna, con l'aumento dell'uso dei farmaci e delle conoscenze relative alle loro modalità d'azione, è cresciuta l'attenzione verso i potenziali danni da farmaci. In particolare alcune gravi reazioni (tab. I) hanno creato allarme sia nella comunità scientifica che nella popolazione.

Per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio di un farmaco l'industria farmaceutica produttrice è tenuta per legge a effettuare delle sperimentazioni sia sugli animali (*studi preclinici*) che sull'uomo (*studi clinici*). Gli studi preclinici di farmacologia quali farmacocinetica, farmacodinamica e tossicologia forniscono diverse indicazioni sugli effetti di nuove sostanze ma il loro valore predittivo nell'uomo è limitato dalla variabilità di risposta fra le specie animali. Gli studi clinici pre-commercializzazione sono generalmente predittivi dell'efficacia di un nuovo farmaco per le indicazioni per le quali è studiato e commercializzato. Tali studi forniscono anche un preliminare giudizio sulla sicurezza del prodotto. Circa il 3% dei nuovi farmaci, tuttavia, viene ritirato dal commercio per problemi di tollerabilità durante i primi 5-10 anni d'utilizzo nella popolazione: un ulteriore 5-10% subisce delle restrizioni nell'utilizzo e/o nei dosaggi per la comparsa di gravi fenomeni di tossicità. Gli antinfiammatori non steroidei rappresentano la classe terapeutica con il maggior numero di ritiri e le cause sono essenzialmente cutanee, ematologiche e gastrointestinali. Esempi di farmaci ritirati dal commercio in questi ultimi anni, a causa di reazioni avverse rare e inaspettate, includono il benoxaprofene (danni epatici e gravi reazioni cutanee), l'isoxicam (gravi reazioni cutanee), la remoxipride (anemia aplastica), la zimeldina (sindrome di Guillain-Barré), la terodilina (tachiaritmie ventricolari) e la temafloxacina (sindrome plurisistemica grave, talvolta mortale). Risulta così evidente che le sperimentazioni cliniche pre-com-

mercializzazione hanno alcune intrinseche limitazioni nel definire il profilo di sicurezza dei farmaci. Nel momento in cui un nuovo farmaco viene commercializzato l'esperienza sull'uomo è limitata, dato che gli studi sono effettuati su un campione di circa 2000-3000 pazienti. Tale numero può risultare sufficiente a identificare soltanto reazioni avverse da farmaci che hanno un'incidenza superiore ad 1:500.

Nei *trial* clinici pre-commercializzazione i pazienti sono studiati in un ambiente ospedaliero, secondo protocolli ben precisi e restrittivi e in gruppi di popolazione selezionati. Dopo la commercializzazione il farmaco è prescritto da medici con diversa esperienza e soprattutto a una popolazione di pazienti maggiormente eterogenea (che include anziani, bambini, donne in gravidanza, soggetti con patologie concomitanti, etc.). Spesso, poi, il farmaco è utilizzato contemporaneamente a altri con la possibilità d'interazioni sfavorevoli. Così reazioni avverse da farmaci non evidenziate o con una bassa incidenza durante gli studi pre-commercializzazione possono manifestarsi o diventare rilevanti per alcuni sottogruppi di pazienti. Esempi sono l'aumentata tossicità al benoxaprofene (negli anziani) e agli ACE-inibitori (nei pazienti con insufficienza cardiaca). Infine negli studi pre-commercializzazione i pazienti sono generalmente trattati e controllati per periodi relativamente brevi, pertanto le reazioni avverse che hanno una lunga latenza non sono evidenziate. Esempi di questo tipo includono il prattutto (peritoniti sclerotizzanti) e gli estrogeni (tumori endometriali ed epatici).

Da quanto sopra esposto e quindi dalla consapevolezza che è necessario proseguire lo studio di un farmaco anche dopo la sua immissione in commercio è nata la *farmacosorveglianza* [f.], anche definita come fase IV dello sviluppo di un farmaco (v. FARMACOLOGIA CLINICA, VI, 860), disciplina che si occupa della conoscenza, valutazione e prevenzione degli effetti avversi da farmaci. Inoltre la sorveglianza dei farmaci dopo la commercializzazione può anche essere indirizzata ad una migliore definizione della loro efficacia.

Vi è oggi un largo consenso da parte delle autorità sanitarie, medici e altri operatori sanitari, consumatori e industria farmaceutica sugli obiettivi della f. che di seguito elenchiamo:

- 1) identificazione delle reazioni avverse precedentemente non riconosciute e stima della loro incidenza;
- 2) quantificazione delle reazioni avverse gravi, ma note, nell'ambito della popolazione esposta ai farmaci. Nello stesso ambito quantificazione di quelle meno gravi ma sufficientemente fastidiose da limitare l'utilizzo di un farmaco;
- 3) identificazione dei fattori di rischio (inclusi dosaggio, età, sesso, fattori genetici, patologie concomitanti, etc.) che possono predisporre alla comparsa di reazioni avverse;
- 4) definizione dei profili comparativi di farmaci appartenenti alla stessa classe terapeutica;
- 5) individuazione di prescrizioni e somministrazioni inappropriate;
- 6) identificazione delle interazioni tra farmaci;
- 7) identificazione di nuovi effetti terapeutici.

Il fine ultimo della f. consiste nel miglioramento del rapporto beneficio/rischio dei farmaci in commercio, sia a livello individuale (scegliere il trattamento migliore per quel dato paziente) che di sanità pubblica (mantenere o no sul mercato un determinato farmaco, informare i prescrittori sui rischi potenziali, etc.).

Numerose sono le difficoltà connesse all'identificazione e valutazione degli effetti avversi da farmaci. Una di queste è la possibilità che vi sia un lungo intervallo fra l'esposizione al farmaco e il manifestarsi della sintomatologia (reazioni ritardate). Classico esempio di questa situazione è l'adenocarcinoma vaginale che si sviluppa in giovani donne nate da

TAB. I. GRAVI REAZIONI AVVERSE CHE HANNO ATTIRATO L'ATTENZIONE SUI RISCHI DA FARMACI

Anno	Farmaco	Reazione
1880	Cloroformio	Arresto cardiaco
1937	Sulfanilamide	Avvelenamento fatale da dietilenglicole
1952	Cloramfenicolo	Anemia aplastica
1954	Stalinon	Avvelenamento fatale
1961	Talidomide	Focomelia
1966	Contraccettivi	Tromboembolismo
1967	Simpatomimetici	Morti in asmatici
1972	Dietilstilbestrolo	Carcinoma vaginale

madri che assumevano dietilstilbestrolo durante la gravidanza. Un'altra difficoltà è connessa con l'aspecificità delle reazioni avverse. Tranne che per alcune, ad es. la sindrome oculomucocutanea da practololo, le reazioni avverse sono generalmente degli eventi che possono essere provocati anche da altre cause. Questo rende più difficile l'attribuzione di causalità farmaco-evento. Il processo d'imputabilità si basa generalmente su un approccio di tipo algoritmico, utilizzando come criteri la relazione temporale tra comparsa dell'evento ed esposizione al farmaco, l'esclusione di altri fattori causali, le conoscenze sul farmaco sospetto, l'evoluzione dell'evento in caso di sospensione del farmaco (*de-challenge*) e la sua ricomparsa in caso di risomministrazione (*rechallenge*). Teoricamente quest'ultimo dato è l'unico che consenta la certezza nell'attribuzione della causalità farmaco-evento, ma nella pratica, soprattutto nel caso di reazioni gravi, raramente è disponibile.

Premessa sulle metodologie in farmacovigilanza

I molteplici obiettivi e la complessità della f. richiedono spesso metodologie d'indagine diverse e complementari fra di loro. Nello schema sottostante diamo una classificazione delle principali metodiche utilizzate in questo campo:

1. Approccio descrittivo:
 - Segnalazione spontanea;
 - *Case report*.
2. Approccio analitico:
 - Studi osservazionali: coorte, caso-controllo;
 - Studi sperimentali: *trial* clinici controllati.

Nel primo approccio non sono effettuate selezioni di pazienti ma raccolte tutte le reazioni avverse riferite dai medici attraverso il sistema della segnalazione spontanea o ricavate dai casi pubblicati in letteratura. Il secondo approccio, invece, si basa sull'organizzazione di studi osservazionali, in cui il trattamento farmacologico viene scelto liberamente dai medici, e sperimentali, in cui i pazienti vengono assegnati in modo randomizzato al farmaco in studio o al braccio di controllo.

Gli studi clinici controllati sono rivolti alla dimostrazione dell'efficacia terapeutica di un farmaco, ma consentono anche di rivelare nel corso della sperimentazione la comparsa di eventuali reazioni avverse. Essi rappresentano la fase III degli studi pre-commercializzazione e ne abbiamo già evidenziato i limiti per quanto attiene la scoperta delle reazioni avverse. Tuttavia tale metodologia viene anche utilizzata in studi multicentrici su farmaci già in commercio, ad es. per valutare la validità di una nuova indicazione terapeutica. Spesso, in tali studi, il numero di pazienti è particolarmente elevato consentendo pertanto anche una migliore definizione del profilo di tollerabilità del farmaco.

Ciascuna delle diverse metodiche presenta dei vantaggi e degli svantaggi, così come differenti sono i costi e la complessità organizzativa dei diversi sistemi. È pertanto difficile pensare che l'applicazione di una sola di esse possa permettere di realizzare tutti gli obiettivi che la f. si pone.

La segnalazione spontanea

Nell'ambito delle diverse metodologie epidemiologiche utilizzate nella f. la segnalazione spontanea è il principale sistema che consente l'identificazione precoce delle nuove reazioni avverse che si manifestano quando un farmaco, immesso in commercio, entra nella pratica prescrittiva dei medici. La sua attuazione è legata generalmente a un concetto di volontarietà o spontaneità, da cui il nome, anche se in alcuni paesi, come ad esempio in Italia, è obbligatoria.

In linea teorica la segnalazione spontanea permette di sorvegliare tutti i pazienti esposti all'uso dei farmaci. Considerando che la possibilità di effettuare una segnalazione

coinvolge in primo luogo tutti i medici e secondariamente tutti coloro che hanno un rapporto con il farmaco, quali farmacisti e pazienti, è intuibile la potenzialità intrinseca di quest'approccio metodologico. Secondo alcuni esperti, ad es., non è possibile individuare reazioni avverse rare, tipo l'anemia aplastica da cloramfenicolo (con un'incidenza di 1 caso su 20-40.000), ricorrendo a altre metodologie.

Per esprimere pienamente la sua potenzialità è indispensabile che tutte le segnalazioni siano convogliate su centri di raccolta a carattere nazionale, o meglio ancora sovranazionale, in modo da estenderne il più possibile la sorgente e ottimizzare la visione epidemiologica del fenomeno. L'allarme precoce su reazioni avverse non note, infatti, si può ottenere solo quando si concentrino più segnalazioni simili relative a un medesimo farmaco.

La segnalazione spontanea rappresenta oggi il cardine dei sistemi di f. adottati nei paesi europei ed extracuropei. In linea generale l'Autorità Sanitaria richiede a ogni medico che osservi una reazione avversa di segnalare, avvalendosi di appositi moduli, a centri di raccolta locali o nazionali. Esistono delle differenze tra i sistemi dei diversi paesi: alcuni forniscono delle *linee-guida* su cosa e per quali farmaci segnalare, altri richiedono di segnalare tutte le reazioni osservate.

Le critiche al sistema non mancano e, in effetti, in alcuni casi la segnalazione spontanea non ha portato a un tempestivo riconoscimento delle reazioni avverse insorte in seguito all'assunzione di determinati farmaci. Ad es. nel Regno Unito, che vanta la più antica esperienza in questo campo, il sistema non è stato in grado di individuare la sindrome oculomucocutanea da practololo. Di seguito riassumiamo i principali vantaggi e limiti della segnalazione spontanea:

Vantaggi:

- è un sistema semplice, rapido ed economico;
- può sorvegliare tutti i farmaci in commercio;
- può coinvolgere tutti i pazienti, anche quelli normalmente esclusi nella fase *pre-marketing*;
- non interferisce con la pratica prescrittiva;
- fornisce un allarme precoce su reazioni non note.

Limiti:

- è difficile stabilire una relazione causale tra farmaco ed evento;
- è difficile individuare reazioni ritardate;
- non fornisce direttamente dati d'incidenza;
- sottostima le reazioni a causa della sottosegnalazione.

Il limite della mancanza di dati sulla popolazione realmente esposta al farmaco, che non consente di calcolare il tasso d'incidenza di una reazione avversa, può essere superato prendendo in considerazione le vendite e/o le prescrizioni del farmaco, anche se questi non necessariamente corrispondono al reale consumo (ad es. non si tiene conto della *compliance* del paziente).

L'aspetto più rilevante della segnalazione spontanea è quello di rappresentare il primo segnale d'allarme per l'identificazione di una reazione avversa da farmaci sconosciuta (fig. 1). Il sospetto che un farmaco provochi una determinata reazione avversa, non identificata nelle sperimentazioni *pre-marketing*, nasce nel momento in cui l'evento viene osservato e segnalato ripetutamente dai medici. L'ipotesi generata può essere verificata attraverso studi *ad hoc*, analisi della letteratura, scambi d'informazione tra i vari Centri nazionali di raccolta delle segnalazioni, contatti con i Centri sovranazionali (WHO, EMEA, etc.). Questo consente un aumento delle conoscenze sul profilo di sicurezza del farmaco e può portare a provvedimenti da parte delle Autorità Sanitarie (ritiro o sospensione dal commercio, limitazioni d'uso, nuove controindicazioni, etc.). È evidente che nel caso di reazioni gravi, che possono costituire una

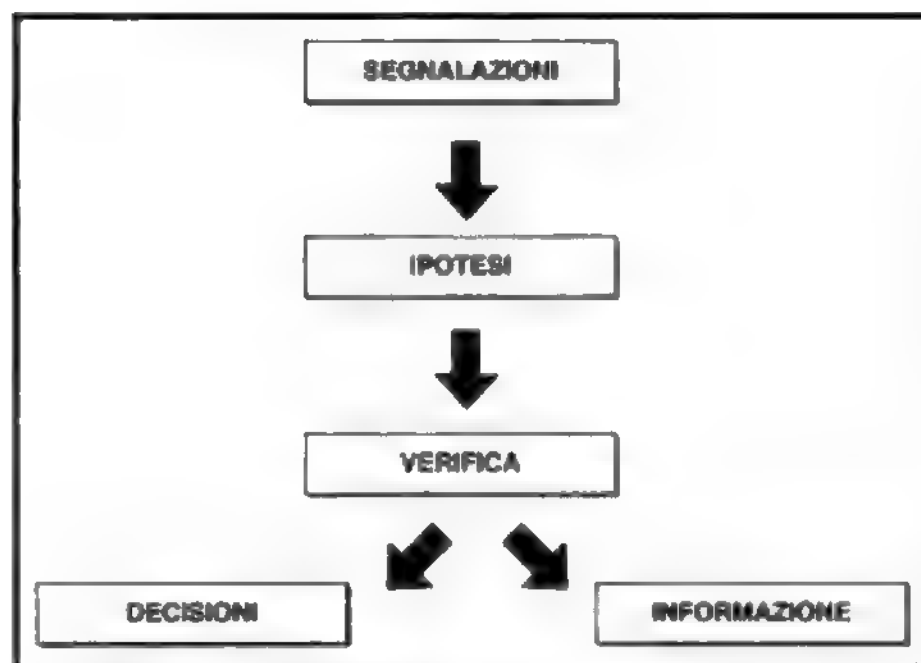


Fig. 1. Segnalazione spontanea: flusso decisionale.

minaccia per la vita del paziente (in particolare quando siano coinvolti farmaci per i quali esistono alternative terapeutiche), eventuali provvedimenti restrittivi dovranno essere presi prima della verifica.

Nel corso degli anni le reazioni avverse, individuate attraverso la segnalazione spontanea, sono state numerose. Nella tab. II riportiamo alcuni esempi, fra i più rilevanti, che evidenziano il contributo apportato dalla segnalazione spontanea alla conoscenza degli effetti dei farmaci e quindi alla salvaguardia della salute della popolazione.

All'inizio degli anni sessanta, in seguito a eventi drammatici (come i casi di focomelia da talidomide e di anemia aplastica da cloramfenicolo), numerosi paesi hanno istituito programmi nazionali per raccogliere le segnalazioni delle reazioni avverse da farmaci. Uno dei paesi che per primo ha sviluppato la segnalazione spontanea è l'Inghilterra, con la creazione e la divulgazione ai medici di un'apposita scheda per la raccolta delle segnalazioni di reazioni avverse: l'ormai famosa *yellow card*.

Attualmente sistemi di segnalazione spontanea operano in più di 35 paesi coordinati dal *WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring* di Uppsala. Nella maggior parte delle nazioni esiste una raccolta centralizzata delle schede, mentre in alcune, come in Francia, l'organizzazione è su base regionale. Le segnalazioni provengono in genere direttamente dai medici, anche se non è trascurabile, soprattutto in alcuni paesi come gli USA, il ruolo dell'industria farmaceutica.

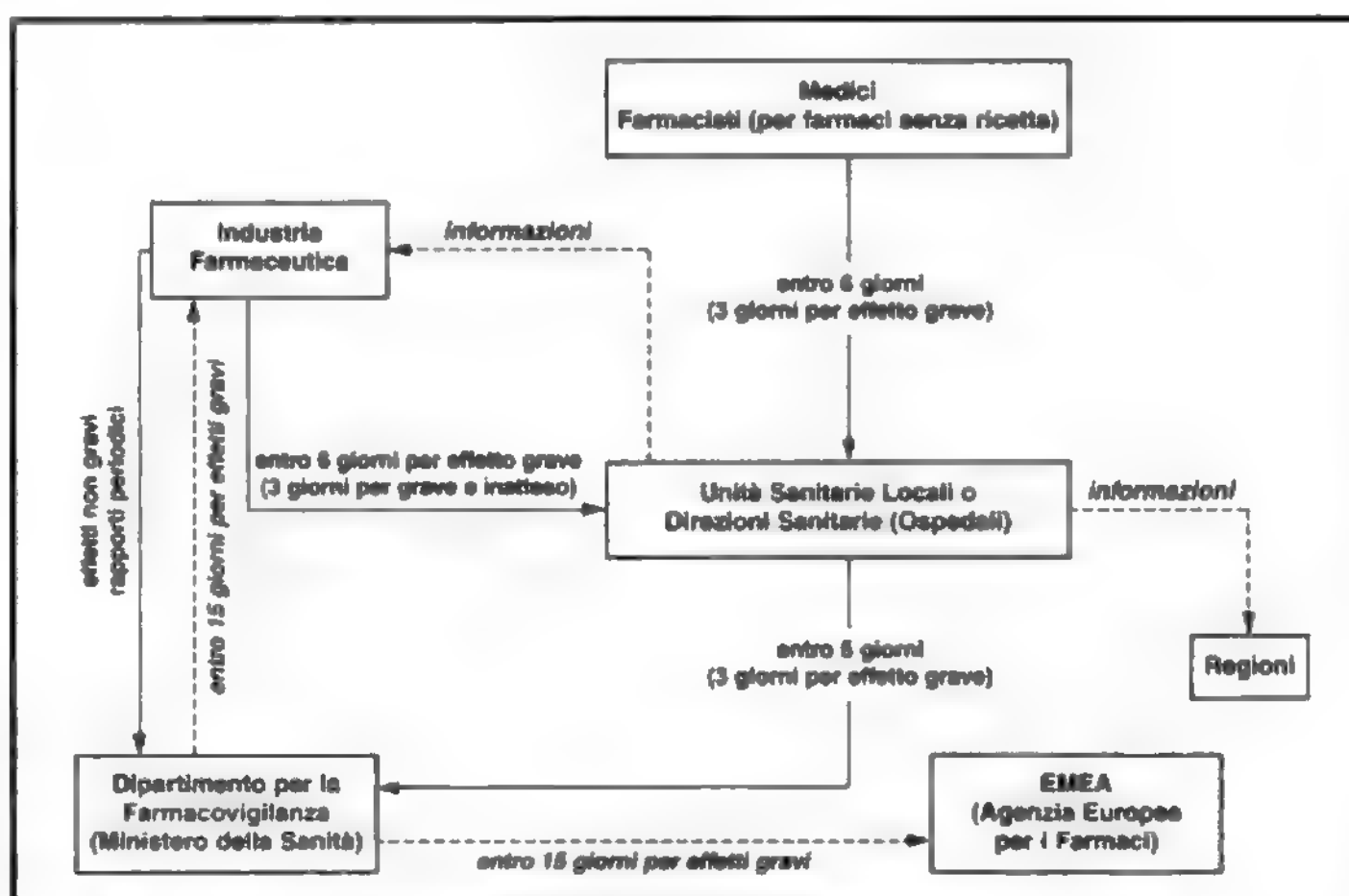
In Italia, dal dicembre 1987, la segnalazione spontanea di reazioni avverse è obbligatoria a termini di legge (Legge istitutiva n. 531/87). La legge, modificata recentemente (Decreto Legislativo n. 44/97), impone a medici e farmacisti (per i farmaci venduti senza ricetta medica) di segnalare «gli effetti tossici e secondari, sia locali sia generali, conseguenti o comunque correlabili all'impiego di farmaci». Sono previste sanzioni che vanno da 1 a 10 milioni di multa e che possono portare all'arresto fino a 6 mesi.

Nella fig. 2 è rappresentato lo schema di funzionamento del sistema italiano.

TAB. II. ESEMPI DI REAZIONI AVVERSE INDIVIDUATE CON LA SEGNALAZIONE SPONTANEA

Farmaco	Reazione
Estrogeni	Tromboembolismo
Alotano	Ittero colestatico
Metoclopramide	Discinesia tardiva
Amiodarone	Epatite
Terfenadina	Reazioni cutanee
Glafenina	Shock anafilattico
Mianserina	Artropatia
Metildopa	Epatite
Zomepirac	Anafilassi
Maprotilina	Agranulocitosi

Fig. 2. Schema organizzativo della segnalazione spontanea in Italia come previsto dal Decreto Legislativo 44/97.



La legge italiana impone anche alle industrie farmaceutiche di segnalare le reazioni avverse, causate dai farmaci di propria produzione, di cui sono venute a conoscenza; nonché i dati relativi alle proprie vendite. Questo canale rappresenta una possibile fonte di duplicazione delle segnalazioni, in quanto le industrie assumono le informazioni dai medici, che a loro volta possono averle segnalate direttamente alle USL o USSL di competenza. È perciò necessario un controllo a livello centrale dei dati per eliminare le eventuali segnalazioni doppie. Tale problema non è di facile risoluzione ed è comune anche ad altri paesi.

Il problema principale delle segnalazione spontanea è rappresentato dal fenomeno della sottosegnalazione. Non è semplice dare una stima esatta dell'entità della sottosegnalazione, ma il fenomeno è sicuramente rilevante: ad es. nel Regno Unito è stato calcolato che presumibilmente viene riportato soltanto il 10% dei casi da segnalare. Le motivazioni alla base della sottosegnalazione sono molteplici e complesse.

Di seguito ne elenchiamo alcune, definite dal Prof. Inman i *sette peccati capitali* dei medici inglesi:

1. *Eccessiva fiducia*: cioè l'erronea convinzione che in commercio esistano solo farmaci sicuri;
2. *Senso di colpa* per avere prescritto una terapia che ha provocato danno;
3. *Ambizione* di pubblicare una casistica propria;
4. *Paura* di ritorsioni medico-legali;
5. *Paura di cadere nel ridicolo* segnalando un'associazione reazione-farmaco di cui non si è certi;
6. *Letargo* derivante da una mancanza di interesse e di tempo, da una scarsa fiducia nel sistema, etc.;
7. *Mancanza di informazione* sulle modalità della segnalazione.

In Italia il fenomeno della sottosegnalazione è particolarmente evidente. Attualmente il tasso di segnalazioni annuali è di circa un sesto di quello del Regno Unito e Francia. È necessario, pertanto, aumentare l'interesse della classe medica alle problematiche legate alla sicurezza dei farmaci e più specificamente al ruolo che essa può e deve svolgere nell'ambito della segnalazione spontanea di reazioni avverse. Sulla base dell'esperienza dei diversi paesi appare evidente che uno dei maggiori stimoli alla segnalazione proviene dall'informazione di ritorno ai medici. Questa può essere fornita attraverso l'invio periodico sia dei dati provenienti dall'analisi delle segnalazioni e sia di aggiornamenti informativi sul profilo di tollerabilità dei singoli farmaci. In Inghilterra, ad es., si è osservato un notevole aumento nel numero di segnalazioni nel momento in cui si sono attivati nuovi sistemi di comunicazione con i medici.

Un altro intervento, che può migliorare la segnalazione spontanea, è quello di fornire ai medici delle *linee-guida* che orientano su cosa e per quali farmaci segnalare. Lo scopo principale della segnalazione spontanea, come già detto, è quello di costituire un *campanello d'allarme* per le reazioni nuove, non individuate prima della commercializzazione di un farmaco, e per quelle gravi che possono costituire un danno per la salute del paziente. La segnalazione di eventi minori e già noti non è di alcuna utilità e può rappresentare un fattore di confondimento.

Gli studi caso-controllo

Una metodica epidemiologica di applicazione complessa, indicata essenzialmente quando si vogliano studiare reazioni avverse o malattie iatrogene estremamente rare, è lo studio caso-controllo particolarmente utile per verificare ipotesi generate con la segnalazione spontanea.

In questi studi viene identificato un gruppo di soggetti con una determinata patologia o reazione avversa (*casi*) e

un gruppo simile d'individui (*controlli*) che non presentano la patologia in esame. Mediante interviste con appositi questionari e l'esame dei dati clinici disponibili viene esaminata la frequenza di esposizione nei due gruppi a un farmaco sospetto. Le associazioni identificate tra il farmaco e la patologia sono studiate in dettaglio per verificarne il nesso di causalità. I criteri che si utilizzano per questa valutazione si basano sulla significatività statistica, grandezza dell'associazione, coerenza dello studio, concordanza con i risultati di altri studi epidemiologici e plausibilità biologica rispetto al farmaco sospetto.

Con altre metodologie la possibilità di identificare una reazione avversa rara richiede la sorveglianza di un campione molto ampio di soggetti, mentre con gli studi caso-controllo tale risultato si realizza con un numero notevolmente inferiore. Ad es., il classico studio che ha permesso di identificare l'associazione tra dietilstilbestrolo e adenocarcinoma vaginale ha richiesto solo 8 casi e 40 controlli, rispetto alle migliaia di soggetti che sarebbero stati necessari in uno studio di coorte. Un altro vantaggio di questa metodologia è la possibilità di identificare più di un fattore di rischio nell'ambito di un singolo studio.

Gli studi caso-controllo sono soggetti, tuttavia, a diverse possibilità di vizi formali (i cosiddetti *bias*) che possono alterare i risultati. Particolare attenzione va quindi posta nella selezione dei casi e dei controlli in modo da evitare differenze tra i due gruppi, ad es. per quanto attiene l'età, il sesso, le abitudini di vita, il livello sociale, ecc. La raccolta delle informazioni deve essere condotta con metodiche analoghe tra i due gruppi ed è, in ogni caso, soggetta alle limitazioni di un'analisi retrospettiva (in particolare la difficoltà nel ricostruire la storia dei soggetti in studio). Il motivo d'errore più importante è la presenza di fattori che confondono i risultati. In uno studio caso-controllo sulle malattie cardiovascolari, un esempio di fattore di confondimento può essere il diabete che è associato sia ad un aumento di eventi cardiovascolari sia all'uso di farmaci anti-diabetici; quest'ultimi potrebbero, pertanto, essere identificati come fattore di rischio.

Uno dei primi e più importanti studi caso-controllo è stato condotto in Inghilterra nel 1968 e ha portato all'identificazione dei contraccettivi orali come fattore di rischio nell'insorgenza di malattie tromboemboliche.

Gli studi di coorte

Gli studi di coorte si basano sull'identificazione di gruppi di soggetti, estratti da una popolazione definita, che vengono seguiti nel tempo. Sono utilizzati per confrontare pazienti esposti a un farmaco con pazienti non esposti, tuttavia possono anche essere impiegati per paragonare due o più farmaci tra loro.

In genere gli studi di coorte sono attuati prospetticamente ma in alcuni casi i dati sono raccolti in maniera retrospettiva. In ogni caso la differenza fondamentale tra gli studi di coorte e quelli caso-controllo si riferisce al criterio di selezione dei soggetti. Nei primi la selezione si effettua in base all'esposizione al farmaco in studio e viene rilevata l'incidenza di reazioni avverse in un determinato periodo. Nei secondi il punto di partenza è la selezione dei pazienti che presentano una determinata patologia, che sono confrontati con i relativi controlli rispetto alle differenze d'esposizione ai farmaci.

Gli studi di coorte risentono di meno dei *bias* tipici degli studi caso-controllo e presentano il vantaggio di poter registrare, contemporaneamente, più eventi legati a una singola esposizione. Ulteriori vantaggi sono rappresentati dalla possibilità di identificare fattori predisponenti all'insorgenza di reazioni avverse e possibili interazioni tra farmaci.

In generale si può affermare che uno studio di coorte può dimostrare in modo più sicuro, rispetto a uno studio caso-controllo, l'associazione causale tra un farmaco e una reazione avversa. Gli svantaggi principali degli studi di coorte sono l'elevato numero di pazienti da reclutare, la necessità di un lungo periodo di osservazione, la difficoltà di individuare reazioni avverse rare e la complessità organizzativa (personale, costi, ecc.).

Nell'ambito degli studi di coorte possiamo ricordare il *monitoraggio intensivo ospedaliero*, che si basa sulla raccolta degli eventi avversi e di tutti i dati relativi ai pazienti ospedalizzati trattati con farmaci. L'esperienza più rilevante è quella del *Boston Collaborative Drug Surveillance Program* iniziata nel 1966 e sempre attiva negli ospedali dell'area di Boston.

Il Prescription Event Monitoring

Le metodologie della f., com'è già stato ricordato, sono diverse secondo gli obiettivi che s'intende raggiungere e dell'ambiente in cui si opera. In Inghilterra, all'inizio degli anni ottanta, è stato sviluppato un sistema di sorveglianza per i nuovi farmaci, il *Prescription Event Monitoring* (PEM), che ha rappresentato un'interessante novità in campo epidemiologico. La sua applicazione è rimasta tuttavia limitata all'Inghilterra. Il PEM si basa sull'identificazione, tramite l'analisi delle ricette, dei pazienti che hanno avuto una prescrizione di un determinato farmaco che s'intende *sorvegliare* (in genere quelli appena immessi in commercio) e sulla raccolta delle informazioni sugli eventuali eventi che hanno interessato il paziente in seguito alla terapia. Tali dati sono raccolti attraverso i medici di medicina generale ai quali viene spedito un apposito modulo (*green card*). La correlazione tra la comparsa di un determinato evento e il farmaco in esame viene eseguita comparando i dati con quelli di un altro farmaco (simile per la struttura chimica e le caratteristiche farmacologiche e già in commercio per le stesse indicazioni terapeutiche) utilizzato come controllo.

Una delle novità del PEM è l'introduzione del concetto di *evento*, che è più ampio di quello di reazione avversa e non comporta un rapporto di causalità con il farmaco. Un evento è ogni nuova diagnosi, ogni motivo di visita specialistica o di ammissione in ospedale, ogni imprevisto peggioramento o miglioramento, la comparsa di un'eventuale patologia concomitante, ogni reazione sospetta da farmaci od ogni altra notizia considerata d'importanza tale da essere riportata nella cartella clinica del paziente. Questo presuppone che ogni medico trascriva sulla cartella clinica le informazioni riguardanti i pazienti, abitudine normale per i medici inglesi. Purtroppo in Italia tale abitudine è poco diffusa e questo costituisce un importante limite all'applicazione del PEM nel nostro paese.

L'incrocio dei dati

Nonostante i grandi progressi compiuti nel campo della f. esiste ancora la necessità di metodi in grado di studiare le reazioni avverse rare e ritardate, quali tumori, malformazioni congenite, nefropatie. Un metodo che potrebbe dare risposta a quest'esigenza è rappresentato dall'incrocio dei dati (*record linkage*) anagrafici e sanitari dei singoli individui in una data popolazione. Il sistema presuppone che tutti gli eventi medici (prescrizioni di farmaci, richieste di visite specialistiche, ricoveri, etc.) di una persona siano registrati nel corso della sua vita. Di fatto questo metodo può essere utilizzato soltanto in paesi con un sistema sanitario o assicurativo altamente organizzato e informatizzato. Negli USA, ad es., esistono programmi fondati sulle compagnie di assicurazioni come il *Kaiser Permanent Medical Care Program* o basati sul servizio sanitario riservato ai poveri come

il *Compass*. Altri paesi con esperienze significative in questo campo sono il Canada (con il *database* di Saskatchewan che include una popolazione superiore al milione di abitanti), i Paesi Nordici, e il Regno Unito.

Bibliografia

- Association pour la Recherche Méthodologique en Pharmacovigilance, *Methodological Approaches in Pharmacovigilance*, 1993, Elsevier, Amsterdam.
 Bakke O. M., Manocchia M., de Abajo F. et al., *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 1995, **58**, 108-117.
 Casadei G. L., Silva A., *Farmacovigilanza*, 1989, Masson, Milano.
 Conforti A., Leone R., Moretti U. et al., *Pharmacovigilance Drug Safety*, 1995, **4**, 129-135.
 Inman W. H. W., *Monitoring for Drug Safety*, 2 ed., 1986, MTP Press, Lancaster.
 Stephens M. D. B., *Detection of new adverse drug reactions*, 3 ed., 1992, MacMillan Press, London.
 Strom B. L., *Pharmacovigilance*, 1989, Churchill Livingstone, New York.
 Strom B. L., Velo G. P., *Drug epidemiology and post-marketing surveillance*, 1992, Plenum Press, New York.
 Tognoni G., Laporte J. R., *Epidemiologia del farmaco*, 1984, Pensiero Scientifico Editore, Roma.

GIAMPAOLO VELO, ANITA CONFORTI E ROBERTO LEONE

FARMACOEPIDEMOLOGIA E FARMACOVIGILANZA: V. FARMACOSORVEGLIANZA**.

FASCITE NECROTIZZANTE

F. aponévrotite necrotique. - I. necrotizing fasciitis. - T. nekrotische Aponeurotitis. - S. fascitis necrotica.

SOMMARIO

Definizione (col. 2138). - **Cenni storici** (col. 2138). - **Etiologia e patogenesi** (col. 2138). - **Epidemiologia** (col. 2139). - **Clinica** (col. 2140). - **Prognosi** (col. 2141). - **Diagnosi** (col. 2141). - **Terapia** (col. 2141).

Definizione

La fascite necrotizzante (f. n.) è un'infezione dei tessuti molli, ad etiologia batterica, caratterizzata da una rapida diffusione del processo flogistico e conseguente necrosi della fascia muscolare, del grasso sottocutaneo e, in alcuni casi, dell'epidermide. I piani muscolari ed ossei sono di solito risparmiati grazie alla funzione limitante della fascia muscolare.

Cenni storici

La prima descrizione clinica della malattia risale al 1924, quando Meleney ha definito l'affezione come «gangrena acuta da streptococco emolitico». Successivamente, lo stesso Autore (Meleney, 1933) ha descritto una forma ad etiologia polimicrobica, definita «gangrena da sinergismo». L'attuale denominazione di f. n. è stata proposta da Wilson nel 1952. Successivamente, Giuliano et al. (1977) hanno proposto la classificazione della malattia in due forme:

- a) f. n. di tipo 1 a causa polimicrobica, da streptococchi non di gruppo A, batteri anaerobi, enterobatteri;
- b) f. n. di tipo 2 in cui l'agente etiologico è identificabile con lo streptococco beta-emolitico di gruppo A, in alcuni casi associato con *Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*.

Etiologia e patogenesi

Sono stati ipotizzati due diversi meccanismi etiopatogenetici della malattia.

1) *Interazione tra diverse specie microbiche*: questo meccanismo sarebbe alla base della f. n. caratterizzata dalla contemporanea presenza di germi anaerobi (*Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp.), batteri aerobi grampositivi (streptococchi B e D, *Staphylococcus* spp.) e gramne-

gativi (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*).

L'associazione di queste diverse specie microbiche sarebbe caratterizzata da un elevato potere patogeno (Kingston e Seal, 1990).

2) *Presenza di uno stipite batterico ad alta virulenza*: questo meccanismo sarebbe coinvolto nelle forme di f. n. provocate da ceppi di streptococco di gruppo A (GAS), prevalentemente i sierotipi M1 ed M3 produttori della tossina streptococcica pirogenica A o B (SPEA o SPEB). La proteina di superficie M svolgerebbe un importante ruolo nell'inibizione della fagocitosi mentre le SPEA o SPEB, agendo come superantigeni (Mollick e Rick, 1991), potrebbero innescare una improduttiva e sproporzionata risposta infiammatoria locale e sistemica.

Un importante cofattore sarebbe inoltre rappresentato dallo stato immunitario locale e/o sistemico dell'ospite. È stata infatti frequentemente descritta la presenza di una condizione predisponente sistemica come diabete mellito, tossicodipendenza, alcolismo, obesità, neoplasie o una situazione locale provocata da ascessi odontologici o tonsillari (Mathieu *et al.*, 1995), vasculopatie periferiche, interventi chirurgici (Mokocua, 1994), traumi, varicella (Brogan *et al.*, 1995).

L'associazione tra varicella e f. n. da streptococco betaemolitico di gruppo A era stata descritta sin dal 1882 da Hutchinson che denominò questa affezione «varicella gangrenosa». È probabile che la lesione varicellosa possa rappresentare il punto di ingresso del microrganismo ma è stato anche ipotizzato che il virus varicella-zoster possa indurre un'immunodepressione selettiva per alcuni ceppi di streptococco di gruppo A.

A prescindere dal tipo di agente infettante e dall'eventuale interazione con l'ospite, il momento fondamentale ai fini dello sviluppo della f. n. è rappresentato, soprattutto nella forma sostenuta da *Streptococcus pyogenes*, dalla dissezione dei piani tissutali (figg. 1 e 2) con coinvolgimento e distruzione del distretto vascolare e conseguente necrosi del tessuto adiposo e delle fasce muscolari.

Epidemiologia

Nonostante i numerosi casi verificatisi in Gran Bretagna nel maggio del 1994 (Pini, 1994; Nowak, 1994; Burge e Watson, 1994), la f. n. è una malattia non comune, a carattere sporadico. Fino ad oggi i casi descritti in letteratura sono solo alcune centinaia.

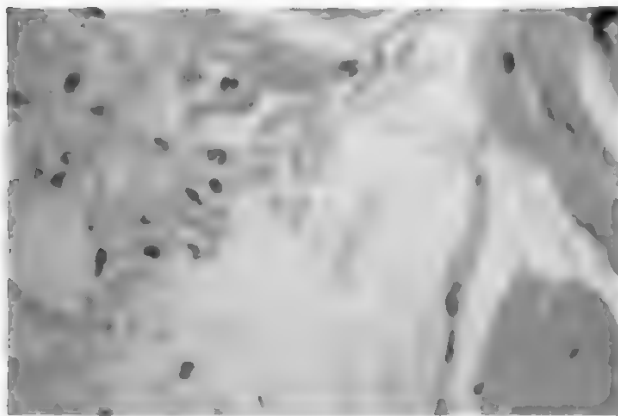


Fig. 1. Polimorfonucleati dispersi tra i miociti. (Colorazione ematossilina eosina; 35 X). (Da Case Records 21-1995, N. Engl. J. Med., 1995, 333(2), 113).

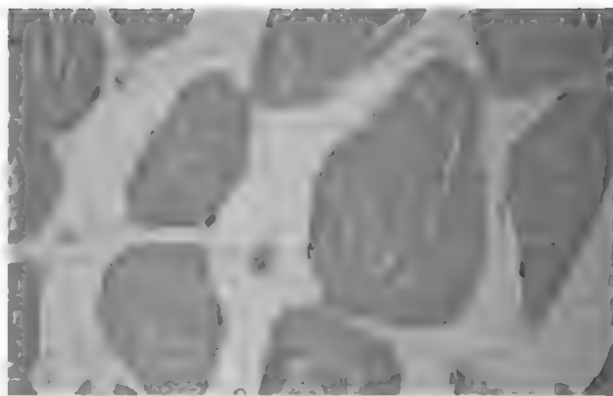


Fig. 2. Degenerazione discoide dei miociti ischemici con caratteristica frammentazione del citoplasma. (Da Case Records 21-1995, N. Engl. J. Med., 1995, 333(2), 113).

L'incidenza stimata è di circa 2 casi anno/100.000 abitanti. Un lieve aumento di frequenza si è recentemente registrato nei paesi del Nord Europa, prevalentemente legato alla riemersione delle infezioni da stipiti di streptococco altamente virulenti verificatesi dalla metà degli anni '80 ad oggi (Stevens, 1992). La malattia colpisce tutte le età con una predominanza per il sesso maschile.

Clinica

La f. n. può colpire ogni parte del corpo, ma la localizzazione più frequente è a carico degli arti inferiori. La malattia può presentare una rapida evoluzione con progressione in 24-48 ore o esordire più lentamente; in questo caso la fase acuta è preceduta per alcuni giorni dalla sola dolenzia della zona interessata. Il sintomo predominante è il dolore di forte intensità, spesso sproporzionato rispetto alla reazione flogistica cutanea. La cute appare tumefatta, eritematosa, calda, senza una netta demarcazione rispetto alla cute circostante. Non sono presenti né linfangite né linfadenite, in quanto il processo avanza rapidamente per contiguità senza interessamento linfatico.

Quando si verifica la necrosi tissutale, il dolore viene sostituito da anestesia dell'area cutanea interessata che da rosso porpora diviene a chiazze blu-grigiastre. Nelle forme polimicrobiche è possibile talvolta rilevare la presenza di gas sottocutaneo.

È quasi sempre presente la compromissione dello stato generale, con febbre elevata e stato tossico. Frequentemente può essere osservato un coinvolgimento multiorgano (MODS) e l'insorgenza di shock tossico con coagulopatia intravasale disseminata (CID).

Una forma particolare di f. n. è rappresentata dalla localizzazione cervicale denominata «angina di Ludwig», spesso conseguente ad un'infezione odontogena (terzo molare) o tonsillare, che si estende dallo spazio sottomandibolare fin oltre l'osso ioide (Scott *et al.*, 1994).

Un altro quadro clinico è rappresentato dalla «gangrena di Fournier» (Fournier, 1883), localizzata ai genitali esterni maschili con tipico inizio dallo scroto, o più raramente femminili, con rapida estensione verso il perineo. L'etiologia è di solito polimicrobica e insorge frequentemente dopo un'infezione uretrale, proctale o dopo un intervento chirurgico perineale. Un'ulteriore forma è quella a localizzazione nella cavità addominale, prevalentemente postchirurgica. Infine è stata descritta una forma di f. n. che può colpire il neonato come complicanza di un'onfalite.

Prognosi

L'*exitus* sopraggiunge nel 38-50% dei casi, ma tale percentuale è ridotta fino al 10% nei casi diagnosticati precocemente. Fattori prognostici negativi sono rappresentati da età avanzata, presenza di diabete mellito, allungamento del tempo di protrombina e coinvolgimento mediastinico.

Diagnosi

La diagnosi è prevalentemente clinica; l'esame batteriologico dell'aspirato non è patognomonico. Talvolta possono risultare utili la TC e la RMN in quanto in grado di valutare l'estensione della flogosi. L'esplorazione chirurgica è di fondamentale importanza ai fini diagnostici: il quadro caratteristico è rappresentato dalla presenza di tessuto grasso edematoso, di colorito grigiastro, che scolla la fascia muscolare, con risparmio, in genere, dei piani muscolare ed osseo (Barcher *et al.*, 1987). La diagnosi differenziale va posta con l'erisipela, la gangrena gassosa e la rhabdomiolisi acuta.

Terapia

La terapia della f. n. deve essere in particolar modo tempestiva.

È sempre necessario l'intervento chirurgico che deve essere radicale e comprendere la cute e il tessuto adiposo sottocutaneo (Ward e Walsh, 1991), con possibile risparmio della fascia muscolare che permette la conservazione dei tessuti profondi muscolo-scheletrici. Sono necessarie successive revisioni chirurgiche, al fine di eliminare completamente i frammenti necrotici tissutali.

La terapia antibiotica deve essere ad ampio spettro e prevedere sempre un farmaco antistreptococcico come la benzilpenicillina (2,4 g/4 ore) o la clindamicina, in quanto attiva anche nei confronti dei microrganismi anaerobi (0,6-1,2 g/6 ore) associato ad un aminoglicoside o ad una cefalosporina di III generazione. Utile è risultata l'associazione con il metronidazolo.

Altro importante presidio terapeutico è rappresentato dall'ossigeno iperbarico (Riseman *et al.*, 1990) che, oltre ad inibire lo sviluppo di microrganismi anaerobi, facilita la risposta leucocitaria dell'ospite, aumenta la deposizione di collagene, l'angiogenesi e la riepitelizzazione riparativa post-chirurgica.

Bibliografia

- Barcher F. G. *et al.*, *J. Clin. Pathol.*, 1987, **40**, 334-341.
 Brogan T. V. *et al.*, *Pediatric Infect. Dis. J.*, 1995, **14**, 588-594.
 Burge T. S., Watson J. D., *Brit. Med. J.*, 1994, **308**, 1453-1454.
 Fornier J. A., *Semaine Med.*, 1883, **3**, 345.
 Giuliano A. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1977, **134**, 52.
 Hutchinson J., *Med. Chir. Trans.*, 1882, **65**, 1-11.
 Kingston D., Seal D. V., *Br. J. Surg.*, 1990, **77**, 260-264.
 Mathieu D. *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 1995, **21**, 51-56.
 McLeney F. L., *Arch. Surg.*, 1924, **9**, 317-364.
 McLeney F. L., *Surg. Gynaecol. Obstet.*, 1933, **56**, 847.
 Mokocua T., *Br. J. Surg.*, 1994, **81**, 772.
 Mollick J. A., Rich R. R., *Clin. Res.*, 1991, **39**, 213 A.
 Nowak R., *Science*, 1994, **264**, 1665.
 Pini P., *Lancet*, 1994, **343**, 1376-1377.
 Riseman J. A. *et al.*, *Surgery*, 1990, **108**, 847-850.
 Scott P. M. J. *et al.*, *J. Laryngol. Otol.*, 1994, **108** (5), 435.
 Stevens D. L., *Clin. Infect. Dis.*, 1992, **14**, 2-13.
 Ward R. G., Walsh M. S., *Br. J. Surg.*, 1991, **78**, 488.
 Wilson B., *Am. Surg.*, 1952, **18**, 416.

FRANCO SORICI E VINCENZO VULLO

FATICA [v. vol. VI, coll. 900-908]

SOMMARIO

Fatica generalizzata (col. 2142): *Fatica acuta*. - *Fatica cronica*. - **La fatica muscolare** (col. 2143): *La dipendenza dal tipo di attività (-task dependency-)*. - *La relazione forza-faticabilità*. - *La cosiddetta «saggezza» del muscolo*. - *La percezione dello sforzo*. - *Rilievi obbiettivi della fatica muscolare nell'uomo*.

detta «saggezza» del muscolo. - *La percezione dello sforzo*. - *Rilievi obbiettivi della fatica muscolare nell'uomo*.

La fatica è una condizione dell'organismo, considerato nel suo complesso o in una specifica funzione, manifestantesi con incapacità o ridotta capacità di sostenere un livello di prestazione imposto od atteso. Si distingue una f. generalizzata dell'organismo, che si può manifestare nei suoi aspetti acuto o cronico, dalla f. localizzata a carico di un organo o apparato.

Fatica generalizzata*Fatica acuta*

La f. *acuta generalizzata* può insorgere in un tempo variabile da poche decine di secondi ad alcune ore, durante il quale il soggetto va incontro ad un deterioramento progressivo della prestazione fisica o psichica in corso, fino all'interruzione. Gli elementi obbiettivi dell'affaticamento sono, ad es., l'aumento del tempo necessario per una data manualità, movimento di uno o più segmenti del corpo, o operazione mentale, e/o del numero di errori, sia a livello di prestazione fisica che di funzione richiedente l'intervento di attività nervose superiori. Per mezzo di misure di laboratorio è possibile constatare, a livello del S.N.C., un aumento della soglia di taluni riflessi monosinaptici (ad es., dei riflessi rotuleo e achilleo), della latenza di riflessi polisintaptici quale il riflesso orbicolare dell'occhio; a livello dei muscoli, una riduzione della massima forza di contrazione volontaria (MVC), un rallentamento della contrazione muscolare, un progressivo aumento del segnale elettromiografico integrato (EMGi) (la somma dei potenziali d'azione registrati alla superficie del muscolo) ed un'alterazione del suonomiogramma (SMG) (il suono generato dalle vibrazioni dei filamenti muscolari durante la contrazione).

Alla f. *acuta generalizzata* possono accompagnarsi numerose alterazioni di variabili fisico-chimiche. Queste differiscono in relazione al tipo, alla durata e alla intensità della prestazione richiesta al soggetto. Nel caso dell'esercizio muscolare, il dato più rilevante è la deplezione delle riserve energetiche intrinseche del muscolo, quali i fosfati altamente energetici (prevalentemente fosfocreatina [PC]) e il glicogeno. Alla caduta delle riserve glicidiche del muscolo e contemporaneamente del fegato può seguire uno stato ipoglicemico con notevoli conseguenze sulla funzione del S.N.C. A seguito di un esercizio protratto e della conseguente sudorazione si può verificare una perdita di riserve idriche che, attraverso ispessimento del sangue, rende più difficoltosa la circolazione. Inoltre, la perdita di cloruri può condurre alla manifestazione di crampi muscolari che possono costringere ad interrompere l'attività. Nel corso di esercizi intensi e prolungati la f. può essere associata ad un progressivo aumento della temperatura corporea, che in condizioni ambientali particolari (elevata temperatura) può condurre a gradi estremi di spossatezza fino al cosiddetto «colpo di calore».

La f. può essere anche la conseguenza di una deficiente disponibilità di ossigeno da parte dell'organismo. Questa condizione può manifestarsi in seguito: 1) ad esercizio muscolare di elevata intensità, tale per cui l'apporto di ossigeno ai tessuti da parte del sangue circolante non tiene il passo con il consumo. In tale caso, parte dell'energia necessaria ai muscoli viene resa disponibile dalla trasformazione del piruvato in lattato (glicolisi anaerobica) con produzione di ATP.

Per effetto di tale reazione i fluidi intracellulari ed il sangue, vanno incontro a notevoli modificazioni fisico-chimiche (ad es., riduzione del pH) mentre il muscolo subisce

FATICA

un rapido affaticamento; 2) ad un abbassamento della pressione parziale dell'ossigeno nell'aria ambiente, come si verifica per una progressiva elevazione dal livello del mare, condizione in cui la disponibilità dell'energia nei vari organi e tessuti si riduce, mentre la f., a parità di prestazione, si manifesta più rapidamente.

Uno stato di f. acuta generalizzata può manifestarsi peraltro anche in assenza di esercizio fisico, ad es., a seguito di attività esclusivamente o prevalentemente intellettuale. L'etiologia del fenomeno va ricercata in cause che coinvolgono il S.N.C. ai livelli più elevati. In generale, non è possibile obbiettivare l'insorgenza di questo tipo di f. con i comuni strumenti di laboratorio esaminando, ad es., il decadimento di singole funzioni motrici e/o sensoriali. Si può, tutt'al più, rilevare un deficit di attenzione o una compromissione della memoria di fissazione, sintomi che peraltro sfuggono a una valutazione quantitativa. I sintomi di affaticamento, infatti, possono ridursi fino a scomparire in modo improvviso e apparentemente sorprendente a differenza di altri elementi organici obbiettivabili con metodi fisiologici, quando il soggetto «affaticato» passi ad un'altra attività anche dello stesso tipo. Quando la f. possa essere vinta sulla base di uno stimolo psicologico (un incentivo che sostenga la motivazione dell'individuo, la rimozione di uno stato di tensione dovuto a pericolo, il cambiamento saltuario della mansione allo scopo di ridurre la monotonia), la ricerca delle sue origini con l'ausilio dei mezzi a disposizione del fisiologo appare del tutto infruttuosa. Fatta eccezione per condizioni specifiche, i fattori emotivi sono i principali responsabili di questo tipo di f.

Fatica cronica

La f. generalizzata nella sua forma cronica si manifesta con sintomi assolutamente aspecifici, privi non solo di valore quantitativo, ma anche qualitativo. Risiedendo spesso la causa di essa in manifestazioni psichiche (stati emotivi, preoccupazioni, disadattamento all'ambiente, frustrazioni), impulsi corticali possono evocare nel tempo le reazioni più disparate da parte di una serie di centri nervosi talamici, ipotalamici e bulbari; tali impulsi di natura psichica possono produrre quadri molteplici che è possibile ricondurre all'attività del sistema nervoso autonomo nelle sue sezioni orto- e para-simpatica. Questi si manifestano, ad es., con alterazioni della frequenza del polso e del respiro, variazioni della pressione arteriosa, extrasistoli, oltre a sintomi di carattere generale quali irritabilità, insonnia, disappetenza con perdita di peso, cefalea ed impossibilità a concentrarsi in qualsiasi attività che richiede attenzione.

L'interazione fra fattori psichici e funzioni vegetative riconduce tale aspetto della f. cronica alle manifestazioni psiconeurotiche. Una psiconeurosi vera e propria si può effettivamente manifestare allorché la f. divenga un fenomeno cronico (nevrosi da combattimento, da pericolo, superallenamento dello sportivo, etc.).

Altre basi, anche se tuttora non chiaramente individuate, si attribuiscono alla SINDROME DA FATICA CRONICA (v. *) dalle caratteristiche non del tutto definite.

La fatica muscolare

La f. muscolare, secondo una recente definizione (Enoka e Stuart, 1992), è un concetto generale mediante il quale si denota una limitazione acuta della prestazione che comprende sia un'aumentata percezione dello sforzo («effort») necessario per sostenere una data forza («force») sia l'incapacità di sviluppare la forza stessa. *Quattro elementi*, singolarmente o in associazione, descrivono le caratteristiche peculiari della f. muscolare: la dipendenza dal tipo di atti-

vità, la relazione forza-faticabilità, la cosiddetta «saggezza» del muscolo e la percezione dello sforzo.

La dipendenza dal tipo di attività («task dependency»)

Le cause di insorgenza della f. muscolare possono identificarsi nel livello di motivazione del soggetto, nella strategia del «comando centrale» e dell'attivazione del muscolo, nell'intensità e durata della prestazione e nella velocità di contrazione del muscolo. I meccanismi della f. si estrinsecano nel tipo di comando attuato a livello del S.N.C., nella qualità delle unità neuromuscolari attivate per effettuare la prestazione, nella modalità dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, nell'utilizzazione di adeguati substrati metabolici e di ossigeno, nonché nelle caratteristiche dell'apparato contrattile e dell'ambiente intracellulare in cui questo opera (v. MUSCOLARE TESSUTO, IX, 2125; MUSCOLO, IX, 2168, *5240). La tecnica applicata per valutare il ruolo del *comando centrale* (corticale) nell'insorgenza della f. si basa sul confronto fra la forza sviluppata da un dato gruppo muscolare per effetto di una contrazione volontaria massima (MVC) e quella generata in seguito a stimolazione elettrica sovramassimale. Bigland-Ritchie *et al.* (1983, 1986) hanno dimostrato che, sia nel muscolo adduttore del pollice che nel quadricipite femorale, la caduta di forza massima per effetto di una serie di contrazioni volontarie non differisce da quella riscontrata mediante stimolazione elettrica del nervo motore. La *giunzione neuromuscolare* (v. X, 807) è stata indicata da taluni autori come possibile sede di insorgenza della f. Quest'ultima si manifesterebbe con un'alterazione della propagazione dell'onda di eccitazione proveniente dal nervo. La tendenza prevalente, peraltro, è di escludere la giunzione neuromuscolare quale possibile sito di origine della f. periferica. In effetti, si è potuto dimostrare che il muscolo curarizzato (in cui la placca neuromuscolare è inattivata) presenta lo stesso profilo di affaticamento del muscolo intatto (Jones *et al.*, 1979). Sulla base di esperimenti condotti sul muscolo quadricipite femorale dell'uomo nel corso dei quali 30 min di contrazioni intermittenziali (della durata di 6 sec seguite da pause di 4 sec) inducevano una caduta del 50% sia della massima forza volontaria che della tensione sviluppata per effetto di una stimolazione elettrica massima, Bigland-Ritchie *et al.* (1986) hanno attribuito l'origine della f. ad un'alterazione dell'*accoppiamento eccitazione-contrazione* cioè del rapporto fra attivazione della membrana cellulare e sviluppo della forza da parte degli elementi contrattili della fibra (v. IX, 2204). Tale alterazione sarebbe legata ad un rallentamento del ciclo del calcio, particolarmente a carico delle fibre muscolari cosiddette «rapide» (v. IX, 2146). In questo ambito si deve anche rilevare che la f. può altresì essere causata da alterazioni metaboliche differenti da quelle legate alla liberazione e al recupero del calcio, quali un aumento della concentrazione di H^+ ioni e di fosfato inorganico (Pi) che agirebbero negativamente sullo sviluppo della forza da parte dei ponti actomiosinici e, limitatamente agli ioni H^+ , anche a livello del reticolo sarcoplasmatico e di talune proteine regolatrici (Fitts, 1994).

Una ben nota causa di f. muscolare è l'*esaurimento di taluni substrati energetici*. Gli eventi meccanici della contrazione derivano in prima istanza, come è noto, dalla complessa interazione di due proteine contrattili, l'actina e la miosina, nel corso della quale l'ATP viene idrolizzato ad adenosindifosfato (ADP) e fosfato inorganico (Pi) con liberazione dell'energia necessaria per la contrazione. Un dibattito molto vivace si è instaurato sull'ipotesi che la f. muscolare dipenda da una deplezione dei fosfati altamente energetici (ATP e PC) della fibra. La caduta di PC può limitare la prestazione del muscolo solo se causa una riduzione nella concentrazione di ATP tale da condurre ad una riduzione della forza di contrazione della fibra. L'evidenza sperimentale non è peraltro in favore di questa ipotesi. In effetti, nel corso di esercizi sovramassimali, la concentrazione di PC diminuisce in modo più spiccato della forza di contrazione del muscolo mentre la concentrazione dell'ATP resta relativamente elevata anche all'esaurimento.

Come è noto, la f., nel corso di esercizi protratti richiedenti il 65-85% della massima potenza aerobica del soggetto, interviene dopo circa 2-3 ore di attività. Da una serie di esperimenti recentemente passati in rassegna da Fitts (1994), risulta che la f. muscolare è altamente correlata con la deplezione delle riserve muscolari in glicogeno a carico particolarmente delle fibre di tipo I (lente) e di tipo IIA (rapide-ossidative) (v. IX, 2148-2150). La somministrazione di glicoso è in grado di ritardare l'insorgenza della f. in

quanto permette di «risparmiare» parte delle riserve muscolari di glicogeno a spese del glicoso ematico. Peraltro, l'esatto meccanismo di questo effetto protettivo sulla *f.* è tuttora ignoto (Fitts, 1994). Si è ipotizzato che la deplezione delle riserve di glicogeno del muscolo possa essere «per sé» causa di *f.* indipendentemente dal ruolo energetico. Si è postulato un rapporto fra presenza di glicogeno nel muscolo e funzione del sistema reticolo-endoplasmatico o di altri organi subcellulari della fibra muscolare. Va notato inoltre che l'esercizio effettuato ad intensità sovramassimali (cioè intensità superiori a quella massima sostenibile dal metabolismo anaerobico) viene limitato prima che si verifichi la deplezione delle riserve del glicogeno muscolare, a causa dell'accumulo di acido lattico.

La relazione forza-faticabilità

La *f.* si manifesta nel tempo, indipendentemente dalla forza sviluppata dal muscolo. Tuttavia, parecchie osservazioni sulla *f.* di diversi gruppi muscolari per effetto di contrazioni isometriche ripetute avrebbero messo in evidenza che maggiore è la componente forza a carico (prodotto forza $\times$ tempo) costante, più rapida è l'insorgenza della *f.* In particolare, esisterebbe una relazione fra forza assoluta sviluppata ed insorgenza della *f.* La curva di affaticamento non è necessariamente la stessa per gruppi muscolari differenti. La relazione forza-faticabilità non sembra essere modificata dall'allenamento né dall'atrofia da mancato uso. In quest'ultimo caso, l'affaticamento relativo del muscolo sembra essere paradossalmente ritardato. Lo studio della relazione forza-faticabilità è ancora in pieno svolgimento e potrà rivelarsi molto utile per l'identificazione di alcune, finora non precisate, cause della *f.*

La cosiddetta «saggezza» del muscolo

Col procedere dell'affaticamento di gruppi muscolari contratti volontariamente o stimolati artificialmente in maniera massimale, si rileva una progressiva riduzione della velocità di rilasciamento del muscolo seguente la contrazione nonché, nel caso di contrazione volontaria, una riduzione della frequenza di scarica dei motoneuroni necessaria per provocare la massima tensione. L'associazione fra il declino della massima forza sviluppata dal muscolo ed i sopracitati indicatori è stata definita «saggezza del muscolo». Il significato funzionale di una tale definizione è quello di una capacità intrinseca del muscolo di ottimizzare il rapporto tra forza sviluppata ed i relativi determinanti fisiologici, modulando l'attività dei motoneuroni alle variazioni meccaniche. Il controllo della frequenza di scarica dei motoneuroni nel corso dell'affaticamento è stato, tra l'altro, attribuito a fenomeni riflessi di origine periferica (Bigland-Ritchie *et al.*, 1986). Si presume che l'accumulo di H^+ e di Pi all'interno delle fibre muscolari possa eccitare terminazioni nervose afferenti dei gruppi III e IV (v. NERVO, X, 492), con conseguente modulazione della frequenza di scarica dei motoneuroni (Bigland-Ritchie, 1993), anche per un'azione sugli interneuroni inibitori del midollo spinale.

La percezione dello sforzo

Quando ad un individuo sia richiesto di sostenere uno sforzo isometrico sottomassimale per un lungo periodo di tempo, la percezione che tale prestazione non potrà essere mantenuta indefinitamente gli deriva non tanto da un'effettiva incapacità di sostenere il carico cui è sottoposto, ma piuttosto dalla necessità di aumentare progressivamente lo sforzo associato al compito richiesto (Enoka e Stuart, 1992). Il giudizio del soggetto è basato sulla propria percezione dello sforzo sviluppato per sostenere il carico («sense of effort»), piuttosto che sulla forza effettivamente sviluppata. La percezione dello sforzo sembra essere fortemente influenzata, se non indotta, da impulsi corticofugali (dalla corteccia motrice ad altre zone del sistema nervoso centrale) che danno origine a «scariche-corollario» («corollary discharge») (v. MOTORIO SISTEMA, IX, 2050). Queste ultime sono state definite da Mc Closkey *et al.* (1974; 1983) come «azioni interne derivanti dal comando motore».

Rilievi obiettivi della fatica muscolare nell'uomo

Le possibilità di rilevare i segni premonitori della *f.* muscolare nell'uomo sono tuttora molto scarse per non dire inesistenti. I metodi soggettivi, basati prevalentemente sull'uso di scale di percezione di *f.* possono risultare di una certa utilità, particolarmente per analisi comparative nello stesso

soggetto e fra soggetti. Essi non saranno peraltro trattati in questa sede.

I metodi obiettivi devono essere preferibilmente caratterizzati dalla non invasività. Escluso il ricorso, per ragioni pratiche, allo studio delle caratteristiche energetiche del muscolo, particolarmente dello stato di deplezione dei vari substrati energetici (ATP, PC, glicogeno, etc.) che può essere eseguito in condizioni estremamente rigorose di laboratorio, ad es., per mezzo di biopsie muscolari o della spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (v. XIII, 1541), si dispone di altri metodi fisici: 1) l'elettromiografia (EMG); 2) l'analisi dei suoni sviluppati dal muscolo durante la contrazione (SMG) e 3) lo studio della meccanica muscolare.

1) Dall'analisi EMG (v. V, 1053) possono essere tratti due specifici indicatori di affaticamento neuromuscolare: a) un progressivo aumento del segnale elettromiografico integrato (EMGi), una tecnica che permette di «mediare» i potenziali d'azione delle fibre attive (fig. 1, da Petrofsky, 1979), e b) uno spostamento a sinistra nello spettro di potenza delle frequenze caratteristiche dell'EMG (fig. 2). Per quanto concerne l'EMGi, i valori indicati nella figura sono espressi in percentuale del valore di controllo rilevato nel corso di una MCV. Nel corso di esercizi dinamici e per carichi di lavoro moderati, l'ampiezza dell'EMGi non subisce variazioni importanti nel tempo, ad indicazione che il numero di fibre attivate non varia, anche se le unità neuromuscolari reclutate possono alternarsi. Per livelli di lavoro $> 60\%$ della massima potenza aerobica ($\dot{V}_{O_2, \max}$) si verifica un progressivo aumento dell'ampiezza dell'EMGi ad indicazione di un progressivo reclutamento di fibre, la cui efficacia, ai fini della contrazione, risulta ridotta. L'analisi spettrale delle frequenze permette di rilevare due picchi di ampiezza dell'EMG corrispondenti a due diversi valori di frequenza (fig. 2). Le fibre lente (tipo I) scaricano a frequenze mediamente inferiori a quelle caratteristiche delle fibre rapide (tipo II). Per effetto di una contrazione isometrica sostenuta al 50% della MCV si può rilevare la scomparsa della distribuzione bimodale delle frequenze nonché uno spostamento a sinistra della curva. Tale spostamento indica probabilmente un reclutamento preferenziale delle

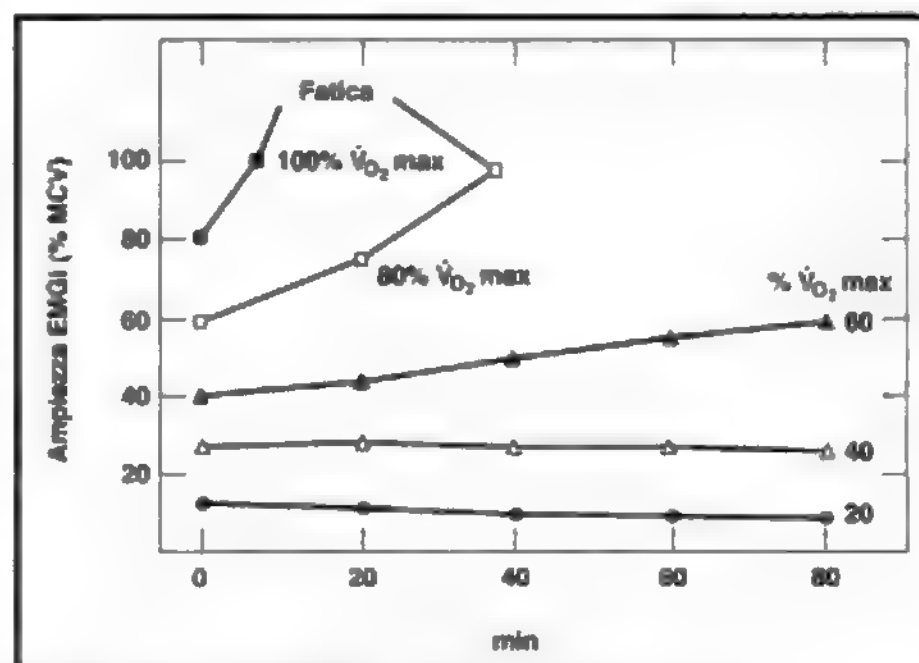


Fig. 1. Elettromiogramma integrato del muscolo retto femorale durante esercizi al cicloergometro di intensità crescente (espressa in percentuale della massima potenza aerobica [$\dot{V}_{O_2, \max}$]). I valori sono espressi in percentuale dell'elettromiogramma integrato (EMGi) registrato durante una contrazione isometrica massimale (MCV). È evidente, con l'affaticamento, un progressivo reclutamento di unità neuromuscolari per carichi lavorativi $> 60\%$ di $\dot{V}_{O_2, \max}$. (Da Petrofsky, 1979, ridisegnata).

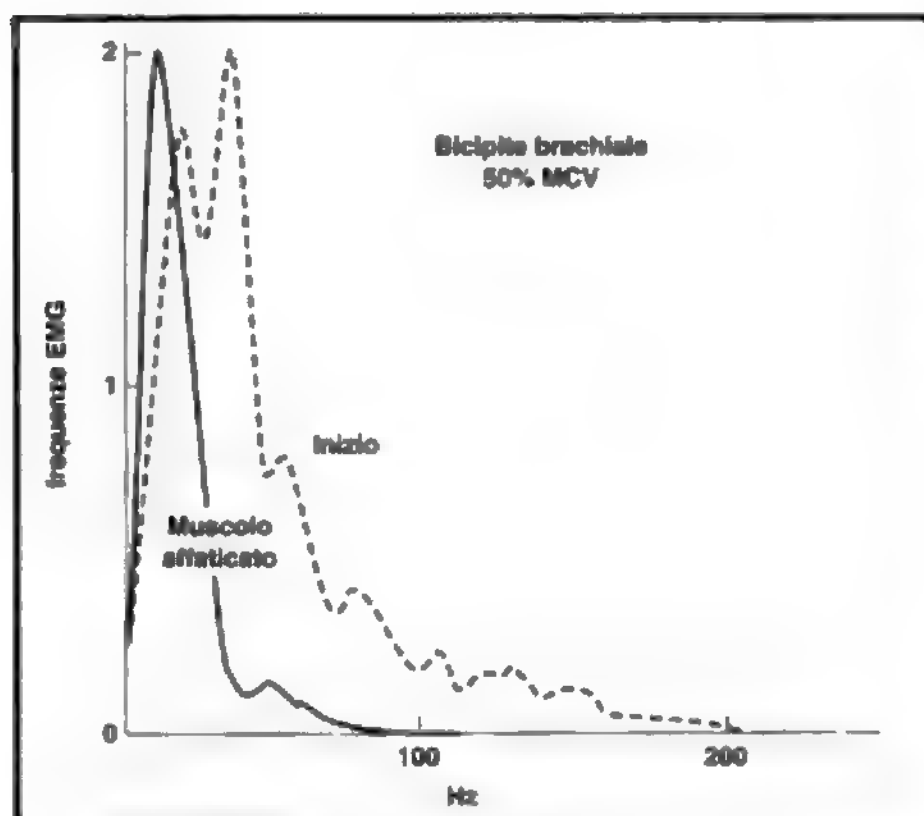


Fig. 2. Analisi spettrale delle frequenze dell'EMG in un bicipite brachiale umano non affaticato (*inizio*) e affaticato.

fibre lente col trascorrere del tempo e con l'insorgere della f. Le fibre rapide sono pertanto le prime ad esaurirsi.

2) L'informazione fornita dal SMG nel dominio del tempo offre elementi diversi e complementari a quelli dell'EMG. Così come per l'EMG, l'analisi spettrale del SMG fornisce informazioni relative alla frequenza di scarica delle unità motrici attivate durante una contrazione massimale. Tale frequenza varia tra soggetti, ad es. atleti scattisti, fondisti o sedentari, ovvero in uno stesso soggetto nel corso del tempo e della f., secondo un profilo dipendente dalla percentuale di fibre rapide o lente del muscolo (Orizio *et al.*, 1989; 1992).

3) Studio della meccanica muscolare, che consente il rilievo di alterazioni della contrattilità muscolare, caratterizzate da: a) rallentamento delle contrazioni muscolari e, soprattutto, b) aumento del tempo di rilasciamento del muscolo dopo una contrazione, c) diminuzione della massima forza sviluppata, d) diminuzione della massima velocità di contrazione muscolare, e) diminuzione della massima potenza muscolare erogabile, f) aumento della quantità di calcio ioni necessaria allo sviluppo di una data contrazione e g) sviluppo di una contrazione tetanica a frequenze di stimolazione elettrica meno elevate che nel muscolo non affaticato (normalmente, quest'ultimo entra in tetano [massima forza durante stimolazione elettrica ripetuta] ad una frequenza di circa 50 Hz; il muscolo affaticato invece sviluppa un tetano già a 20 Hz).

Dall'esame della letteratura più recente si può rilevare la complessità dei problemi che stanno alla base della f. muscolare, specie in relazione alla localizzazione della sede, centrale o periferica, di insorgenza del fenomeno. Mentre numerose esperienze, sulla base di misure obbiettive relativamente precise, permettono di sostenere l'importanza della componente periferica, non disponiamo di elementi sufficienti per valutare la localizzazione delle componenti nervose centrali della f. Si tratta di una tematica che necessita di ulteriori approfondite ricerche che potranno fornire risultati definitivi solo con l'introduzione di tecniche sofisticate applicabili allo studio di singole unità neuromuscolari appartenenti a gruppi di muscoli diversi durante differenti tipi di attività.

Bibliografia

- Bigland-Ritchie B., *Regulation of motoneuron firing rates in fatigue*, in Sargeant A. J., Kernell D. eds., *Neuromuscular Fatigue*, 1993, North Holland, Amsterdam, p. 147.
 Bigland-Ritchie B., Cafarelli E., Vollestad N. K., *Acta Physiol. Scand.*, 1986, Suppl. 556, 137-148.
 Bigland-Ritchie B., Dawson N. J., Johansson R. *et al.*, *J. Physiol.*, 1986, 379, 451.
 Bigland-Ritchie B., Furbush F., Woods J. J., *J. Appl. Physiol.*, 1986, 61, 421.
 Bigland-Ritchie B., Johansson R., Lippold D. C. J. *et al.*, *J. Physiol.*, 1983, 340, 335.
 Enoka R. M., Stuart D. G., *J. Appl. Physiol.*, 1992, 72, 1631.
 Fitts R. H., *Physiol. Rev.*, 1994, 74, 49.
 Jones D. A., Bigland-Ritchie B., Edwards R. H. T., *Exp. Neurol.*, 1979, 64, 401.
 Mc Closkey D. I., Ebeling P., Goodwin G. M., *Exp. Neurol.*, 1974, 42, 220.
 Mc Closkey D. I., Gandevia S., Potter E. K. *et al.*, *Muscle sense and effort, motor commands and judgements about muscular contractions*, in Desmedt J. E. ed., *Motor Control Mechanisms in Health and Disease*, 1983, New York, Raven, p. 151.
 Orizio C., Perini R., Veicsteinas A., *J. Appl. Physiol.*, 1989, 66, 1593.
 Orizio C., Veicsteinas A., *Int. J. Sports Med.*, 1992, 13, 594.
 Petrofsky J. S., *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1979, 41, 9.

PAOLO CERRETELLI

FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE

1. *platelet activating factor (PAF)*.

SOMMARIO

Notizie storiche (col. 2148). - Struttura (col. 2148). - Sintesi (col. 2149). - Recettore e attività biologiche (col. 2150). - Ruolo in patologia (col. 2150). - Farmaci antagonisti recettoriali del PAF (col. 2152).

Notizie storiche

Nel 1969 Peter Henson dimostrò nel surnatante di leucociti di coniglio stimolati con l'antigene specifico la presenza di un fattore solubile capace di aggregare le piastrine. Nel 1972 Jacques Benveniste dimostrò la natura lipidica di questo mediatore, stabilì le condizioni metodologiche e sperimentali per studiarne la struttura ed il ruolo fisiopatologico e ne diede il nome di *Platelet Activating Factor* [PAF] o «Fattore Attivante le Piastrine». Eric Muirhead dimostrò la presenza nel rene di ratto di un fosfolipide polare che riduceva la pressione arteriosa. Nel 1980 il gruppo di Donald Hanahan, a San Antonio in Texas, identificò la struttura molecolare del PAF prodotto dai basofili di coniglio quale un derivato della fosfatidilcolina (v. LIMBI, VIII, 2079), un alchil-etero acetilato della stessa (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerolo-3-fosfocolina), e dimostrò l'identità del fattore che induce l'aggregazione piastrinica con quello responsabile dell'ipotensione (Snyder, 1987).

Struttura

Attualmente è più opportuno definire il PAF come classe di molecole piuttosto che come un'unica struttura. Il PAF è un fosfolipide caratterizzato dalla presenza in sn-1 di un legame di etere (a differenza del più comune legame di estere presente nei fosfolipidi di membrana), che unisce il gruppo alcolico 1 del glicerolo con catene alifatiche solitamente sature la cui lunghezza può variare da 14 a 22 atomi di C a seconda del tipo cellulare e delle condizioni metaboliche. La posizione sn-1 ha grande importanza nell'attività biologica del PAF: la presenza di un legame di estere riduce di 1000 volte l'efficacia della molecola, mentre la presenza di doppi legami la riduce più modestamente (10-20 volte). In posizione sn-2 è esterificata una molecola di ac. acetico di fondamentale importanza, in quanto l'aumento della lunghezza della catena oltre i tre atomi di C riduce la potenza del PAF, mentre la sua rimozione elimina comple-

tamente l'attività. In posizione *sn*-3 è esterificata la fosfolina. La sostituzione di questo residuo riduce l'attività biologica.

Altri fosfogliceridi acetilati con in posizione *sn*-1 un legame di estere o un doppio legame tipico dei plasmalogeni, o con in posizione *sn*-3 l'etanamina al posto della colina, hanno attività biologiche simili a quelle del PAF (Chao e Olson, 1993; Mc Manus *et al.*, 1993).

Sintesi

Cellule non stimulate contengono minime quantità di PAF o addirittura ne sono prive. La sintesi è innescata da appropriati agonisti in diversi tipi cellulari (tab. I) ed avviene secondo due differenti vie metaboliche. La prima via chiamata «remodeling pathway» porta alla sintesi di PAF principalmente nelle cellule infiammatorie. In questa via una fosfolipasi A2 idrolizza l'acido grasso (solitamente ac. arachidonico) esterificato in posizione *sn*-2 degli alchilfosfogliceridi producendo un intermedio chiamato *liso*-PAF. È interessante notare come uno stesso enzima, la fosfolipasi A2, dia l'inizio alla sintesi di due classi di mediatori: il PAF ed i prostanoidei che derivano dall'ac. arachidonico liberato (v. anche PROSTAGLANDINE [v.; v.*]). Successivamente il *liso*-PAF è acetilato in PAF da una specifica acetiltransferasi (McManus *et al.*, 1993). Una seconda via metabolica definita «de novo pathway» è probabilmente deputata al mantenimento dei livelli basali di PAF in alcuni distretti, come il rene, o è stimolata da neurotrasmettitori nei neuroni. Questa via è analoga a quella che sintetizza la fosfatidilcolina e comporta la sintesi di 1-0-alchilglicerolo che è successivamente convertito in PAF da una specifica CDP colina: colina fosfotransferasi (Chao e Olson, 1993; McManus *et al.*, 1993).

TAB. I. SINTESI DI PAF IN CELLULE E TESSUTI DI MAMMIFERI

Cellule/Tessuti	Agonisti
neutrofili	fagocitosi anafilossine, proteine cationiche, TNF, elastasi, catepsina G, porine
eosinofili	agenti chemiotattici
macrofagi/monociti	fagocitosi anafilossine TNF, IL-1, INF γ , elastasi
basofili	allergene, anafilossine
cellule endoteliali	trombina, IL-1, TNF, elastasi, leucotrieni C e D, istamina, ipossia, plasmina, H ₂ O ₂ , porine, ATP, bradichinina
piastrine	trombina
mastociti	allergene
cellule mesangiali	fagocitosi
cellule neuronali	neurotrasmettitori (acetilcolina, dopamina)
tessuti ischemici (cervello, intestino, cuore)	riperfusion post-ischemica
endometrio	ionofori del calcio
cellule epiteliali polmonari	ionofori del calcio
muscolatura liscia vascolare	vasopressina, angiotensina II
cellule epiteliali pancreas e ghiandole salivari	ormoni specifici

La degradazione del PAF è catalizzata dalla acetilidrolasi che scinde l'acetile in posizione *sn*-2. Sono noti due diversi enzimi, uno plasmatico e uno cellulare, che mostrano un'alta specificità per i fosfolipidi con una catena corta in *sn*-2 (Snyder, 1987). La forma plasmatica è associata alle lipoproteine a bassa e ad alta densità, ma la forma più attiva nell'uomo è quella che si trova nelle lipoproteine a bassa densità. Nei pazienti con abetalipoproteinemia (v. IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE [v.; v.*; v.**]) il tempo di dimezzamento del PAF è più rapido che nei soggetti normali, mentre aumenta nella malattia di Tangier (v. TANGIER, MALATTIA DI) (Diana *et al.*, 1989). È conosciuto un difetto dell'acetilidrolasi cellulare, geneticamente trasmesso, responsabile della *sindrome di Miller-Dieker* (Hattori *et al.*, 1994), caratterizzata da lissencefalia (agria, pachigia), profondo ritardo mentale, *facies* tipica (fronte prominente, infossamento bitemporale, naso con narici volte in su, labbro superiore protuberante, mandibola piccola).

Recettore e attività biologiche

La dimostrazione della presenza di un recettore specifico del PAF è stata dapprima ottenuta dalle osservazioni che le cellule sensibili a questo mediatore legano il PAF in maniera specifica con una costante di dissociazione del legame dell'ordine di $1 \times 10^{-9} M + 1 \times 10^{-11} M$. Inoltre l'enantiomero (S)PAF è privo di attività biologica, il che dimostra la stereospecificità del legame con il recettore. Nel 1991 Zenichiro Honda ha clonato ed espresso in sistemi eucarioti il recettore del PAF del polmone di cavia (Honda *et al.*, 1991) e successivamente è stato clonato quello dei leucociti umani (Ye *et al.*, 1991). Ambedue i recettori sono costituiti da 342 residui di aminoacidi con sette domini transmembrana tipici dei recettori che legano proteine G (v.***) (ad es., i recettori β adrenergico, muscarinico, per la trombina, per il trombossano A₂), senza siti di glicosilazione. Sono presenti residui di serina e treonina situati in sequenze di consenso favorevoli ad essere fosforilate da proteine chinasi, fatto che permette di supporre che reazioni di fosforilazione siano alla base della desensibilizzazione di questo recettore. Il recettore del PAF trasduce segnali all'interno della cellula (v. SEGNALI CELLULARI**) mediante l'attivazione della fosfolipasi C β , della proteina chinasi C, del ciclo del fosfatidilinositolo, di tirosine chinasi citoplasmatiche, di fattori di trascrizione (STAT, *Signal Transducers and Activators of Transcription* [v. CITOCHINE**], NF- κ B), e mediante l'aumento della concentrazione di calcio citoplasmatico. Il recettore del PAF è praticamente ubiquitario e soltanto i globuli rossi e alcuni sottotipi di linfociti T ne sono sicuramente privi. Pertanto il PAF è un mediatore della comunicazione intercellulare con un gran numero di attività biologiche, riassunte nella tab. II.

Ruolo in patologia

Il PAF è un mediatore coinvolto nella patogenesi di numerosi modelli sperimentali e di alcune patologie umane. Vi sono alcuni modelli sperimentali esemplificativi dell'importanza del rilascio di PAF in condizioni di coinvolgimento del sistema immune. Il PAF ha un ruolo nel rigetto del trapianto iperacuto e acuto, in quadri di polmonite immunologica, nelle malattie autoimmuni quali il *lupus erythematosus systemicus*, nelle reazioni allergiche, nelle malattie da complessi immuni in particolare con interessamento renale (Braquet *et al.*, 1989; Bussolino e Camussi, 1995).

Il PAF è responsabile di importanti alterazioni della funzionalità cardiaca, quali la riduzione del flusso coronarico, la riduzione della forza contrattile del ventricolo sinistro e disfunzioni del ritmo che vanno da un blocco di branca atrioventricolare di II grado fino a una completa dissocia-

TAB. II. ATTIVITÀ BIOLOGICHE DEL PAF*

Cellule-tessuti bersaglio	Azione	Rilevanza biologica
piastrine	aggregazione, degranulazione	trombosi, infiammazione
polimorfonucleati	aggregazione, metabolismo ac. arachidonico, degranulazione, adesione ai vasi, chemiotassi, regolazione espressione genica	infiammazione, reazioni allergiche
macrofagi/monociti	chemiotassi, regolazione ed espressione recettori, regolazione espressione genica	infiammazione, reazioni allergiche
cellule B e T	modulazione antigeni di superficie, modificazione omeostasi del calcio	immunità cellulo-mediata
cellule endoteliali	contrazione, migrazione, adesione cellulare	infiammazione, aterosclerosi, angiogenesi, tono vascolare
muscolatura liscia vascolare	contrazione/rilasciamento, migrazione	regolazione tono vascolare, aterosclerosi, patologia vascolare acuta
cuore	effetto inotropo negativo, effetto aritmogenico	infarto miocardico
utero	contrazione miometrio, aumento calcio citosolico	parto, impianto morula, formazione decidua
muscolatura liscia bronchiale	contrazione	asma
cellule mesangiali	contrazione, produzione prostanoidi	progressione danno renale, controllo della pressione sanguigna
tubulo renale	modifica riassorbimento e secrezione ioni	regolazione omeostasi ionica, danno renale interstiziale
sistema nervoso centrale	differenziazione di linee di neuroblastomi, alterazioni dell'omeostasi del calcio dell'ippocampo o del talamo, modulazione risposta <i>long term potentiation</i> (LTP)	sviluppo sistema nervoso centrale, malattie degenerative, funzioni autonome
sistema nervoso periferico	rilascio catecolamine	controllo sistema adrenergico

* Le attività biologiche qui riportate sono quelle maggiormente consolidate nella letteratura scientifica.

zione e comparsa di ritmo giunzionale (Flores e Sheridan, 1990). Il PAF è un importante mediatore nella fase ripercussione (v. Riperfusione, danno da*), tanto nell'ischemia cardiaca che in quella cerebrale, ed è responsabile del reclutamento di neutrofili nella zona ischemica e conseguente progressione del danno (Montrucchio *et al.*, 1993a; 1993b). Sia nel cuore che nel cervello è possibile che i tessuti circostanti la zona ischemica, in condizioni di una riduzione della P_{O_2} , producano PAF. Infatti, i miociti cardiaci e l'endotelio (Janero e Burghard, 1990; Montrucchio *et al.*, 1993a; 1993b), danneggiati da uno stress ossidativo, producono PAF. Anche i neuroni umani producono PAF dopo stimolo con glutammato e possono anch'essi partecipare al danno ripercussione.

Il PAF induce ipotensione sia negli animali normotesi che in quelli ipertesi (Olson e Chao, 1993; Bussolino e Camussi, 1995). Il ruolo del PAF nell'indurre l'effetto ipotensivo è quanto mai complesso ed è in gran parte dovuto all'effetto vasodilatatore. In realtà, a seconda delle dosi, il PAF è vasodilatatore (a basse dosi) o vasocostrittore (ad alte dosi) e i due differenti effetti paiono dipendere rispettivamente dalla sintesi di ossido di azoto (v. MONOSSIDO DI AZOTO**) e da quella di metaboliti della ciclossigenasi (Juncos *et al.*, 1993). Il quadro è reso più complesso dal fatto che il PAF attiva l'enzima convertente che catalizza la formazione di angiotensina II. Oltre agli effetti acuti sopra descritti è possibile ipotizzare un ruolo del PAF anche in patologie croniche a carico del sistema cardiovascolare, quali la microangiopatia diabetica e l'aterosclerosi.

Il PAF ha anche un ruolo nello shock settico, nella pancreatite acuta, nell'alberca e nei nodi nella sarcoidosi e nell'asma bronchiale, anche se in molti di questi casi il ruolo in patologia umana sembra essere secondario.

Farmaci antagonisti recettoriali del PAF

Non esistono attualmente composti che interferiscano nella sintesi del PAF, anche se il clonaggio della acetilidrolasi plasmatica e citosolica potrebbe rappresentare il presupposto di una terapia genica antinfiammatoria basata sull'uso dell'espressione selettiva di questa proteina. Esistono numerose molecole definite come antagonisti recettoriali del PAF, identificabili per la capacità di inibire il legame del PAF alle cellule (Braquet *et al.*, 1989; Snyder, 1987). Sono classificabili in cinque sottogruppi.

Sottogruppo I. Appartengono a questo gruppo molecole che derivano dalla struttura del PAF opportunamente modificata nei diversi sostituenti i gruppi alcolici del glicerolo. In queste molecole è mantenuto lo stesso tipo di stereoisomeria del PAF, ma è solitamente cambiata la funzione di etere in posizione sn-1, mentre in posizione sn-2 l'acetile è sostituito con un'altra funzione sempre a catena corta, e in posizione sn-3 spesso è eliminato il fosfato e la fosforilcolina è sostituita con funzioni che mantengano le distanze spaziali presenti nella stessa posizione nel PAF.

Sottogruppo II. Appartengono a questo gruppo molecole in cui il glicerolo presente nel PAF è stato ciclizzato in derivati piperidinici o derivati diossanonici.

Sottogruppo III. Sono composti naturali derivati da piante cinesi o brasiliane, già impiegate dalla medicina locale come efficaci antinfiammatori e antiallergici, o da prodotti di fermentazione di funghi o batteri. Appartengono a queste molecole naturali i derivati di lignani (ad es. il *cadsurenone* estratto dalla *Piper futokadsurac*), di terpeni (ad es. i *ginkgolidi* estratti dalla *Ginkgo biloba* L.), e di estratti fermentativi di *S. phacofaciens* e *P. terlikowskii*.

Sottogruppo IV. Appartengono a questo gruppo mole-

cole di sintesi: le più importanti sono derivati piridil-pirrol-tiazolici.

Sottogruppo V. Appartengono a questo sottogruppo farmaci già noti per altri effetti, quali le triazolobenzodiazepine e in particolare le tienotriazolobenzodiazepine, che mostrano una IC_{50} (concentrazione che riduce del 50% la risposta) che varia da 2 μM a 0.5 μM . Anche i calcioantagonisti di classe II e III, ma non quelli di classe I, sono degli antagonisti recettoriali del PAF.

Bibliografia

- Benveniste J., Henson P. M., Cochrane C. G., *J. Exp. Med.*, 1972, 136, 1356.
 Braquet P., Paubert-Braquet M., Bourgain R. H. et al., *J. Lipid. Mediat.*, 1989, 1, 75.
 Bussolino F., Camussi G., *Eur. J. Biochem.*, 1995, 229, 327.
 Chao W., Olson M. S., *Biochem. J.*, 1993, 292, 617.
 Diana M., Stafforini M., Carter E. M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 2393.
 Flores N. A., Sheridan D. J., *Br. J. Pharmacol.*, 1990, 101, 734.
 Hanachan D. J., Demopoulos C. A., Liehr J., Pinckard R. N., *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 5514.
 Hattori M., Adachi H., Arai H., Inoue K., *Nature*, 1994, 370, 216.
 Henson P. M., *Fed. Proc.*, 1969, 28, 1721.
 Honda Z. J., Nakamura M., Miki I. et al., *Nature*, 1991, 349, 342.
 Janero D. R., Burghard C., *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.*, 1990, 67, 201.
 Juncos L. A., Ren Y. L., Arima S., Ito S., *J. Clin. Invest.*, 1993, 91, 1374.
 McManus L. M., Woodard D. S., Deavers S. I., Pinckard R. N., *Lab. Invest.*, 1993, 69, 639.
 Montrucchio G., Alloatti G., Mariano F. et al., *Amer. J. Pathol.*, 1993a, 142, 471.
 Montrucchio G., Bergerone S., Bussolino F. et al., *Circulation*, 1993b, 88, 1476.
 Snyder F., *Platelet activating factor and related lipid mediators*, 1987, Plenum Press, London.
 Ye R. D., Erptossitz H., Azuo Y., Cochrane C. G., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1991, 180, 105.

FEDERICO BUSSOLINO

FATTORE NATRIURETICO ATRIALE

f. *facteur natriurétique atrial*. - i. *atrial natriuretic factor*. - t. *atrialnatriuretisch Faktor*. - s. *factor natriurético atrial*.

SOMMARIO

Definizione e introduzione (col. 2153). - **Sintesi e secrezione** (col. 2154). - **Regolazione dell'espressione del gene dell'ANF** (col. 2154). - **Regolazione della secrezione** (col. 2154). - **Recettori dell'ANF** (col. 2155). - **Effetti biologici** (col. 2155). - **Possibile impiego clinico dei peptidi natriuretici** (col. 2156).

Definizione e introduzione

Il fattore atriale natriuretico (*atrial natriuretic factor* [ANF] o *atrial natriuretic peptide* [ANP]) è un polipeptide elaborato principalmente dai cardiociti atriali. Esso costituisce l'ormone responsabile della funzione endocrina del cuore ed è dotato di spiccata azione diuretica, natriuretica e vasorilassante, oltre ad esplicare numerose importanti azioni biologiche che tendono complessivamente a preservare l'omeostasi del volume intracardiaco e l'equilibrio idro-salino.

L'esistenza di una sostanza ormonale prodotta dal cuore in risposta al sovraccarico di volume era stata ipotizzata in seguito a classici esperimenti di fisiologia condotti negli anni '50 da Henry e Gaucier, nonché in seguito ad osservazioni ultrastrutturali che avevano mostrato la presenza di granuli citoplasmatici atriali organizzati in tipici apparati di Golgi (secretori), la cui numerosità e densità veniva modificata da semplici variazioni del volume centrale sanguigno. Tuttavia soltanto nel 1981 deBold et al. sono riusciti a dimostrare, attraverso lo studio degli effetti biologici dell'iniezione di estratti atriali o ventricolari, che gli atri car-

diaci contengono una sostanza peptidica che determina diuresi, natriuresi e riduzione della pressione arteriosa. In seguito a tale scoperta, è stato possibile isolare la forma pura dell'ANF e determinarne la sequenza aminoacidica.

Sintesi e secrezione

Gli atri cardiaci sono responsabili per oltre il 95% della biosintesi dell'ANF, mentre i ventricoli possono divenire fonti importanti di sintesi del peptide in condizioni di ipertrofia o in conseguenza di sovraccarichi di volume o di pressione. La forma matura, circolante e attiva a livello recettoriale è, nell'uomo, un polipeptide composto da 28 residui aminoacidici (ANF 99-126) e derivante dal clivaggio della porzione C-terminale di un precursore, verosimilmente inattivo, costituito da 126 aminoacidi (proANF) depositato nei granuli citoplasmatici, da cui è secreto in risposta a specifici stimoli regolatori, per essere successivamente sottoposto al processo proteolitico che conduce alla elaborazione del peptide maturo attivo all'esterno della cellula, verosimilmente dopo l'adesione dei granuli alla membrana o negli spazi intercellulari. Il proANF deriva a sua volta da un precursore di 151 aminoacidi, definito preproANF.

Più recentemente sono stati purificati e caratterizzati almeno altri due peptidi strutturalmente correlati all'ANF: 1) il *Brain Natriuretic Peptide* (o *B-type natriuretic peptide* [BNP]), inizialmente isolato nelle strutture cerebrali del maiale e successivamente identificato nei tessuti di numerose specie animali non solo nell'ipotalamo ed in altre aree del sistema nervoso centrale, ma anche nei ventricoli cardiaci, particolarmente in condizioni di scompenso cardiaco congestizio. Il BNP condivide molte delle azioni biologiche dell'ANF sebbene derivi da un gene diverso; 2) il *C-type Natriuretic Peptide* (CNP), anch'esso inizialmente isolato nel cervello nonché in tessuti periferici, particolarmente nell'endotelio vascolare, ove si ritiene possa esplicare una funzione di modulazione del tono vasomotore.

Regolazione dell'espressione del gene dell'ANF

L'isolamento del gene dell'ANF in varie specie (uomo, ratto, topo) ha consentito l'analisi delle regioni coinvolte nella regolazione dell'espressione del gene specificamente in determinati tessuti. In particolare, la regione 5' adiacente al gene dell'ANF è altamente conservata in tutte queste specie, osservazione che suggerisce una particolare importanza di questa regione. Inoltre, una piccola sequenza costituita da 68 paia di basi derivate dalla regione suindicata sembra controllare la espressione tessuto-specifica attraverso una combinazione di elementi regolatori positivi che sono operanti nelle cellule miocardiche e di elementi regolatori negativi operanti nelle cellule non-cardiache.

Regolazione della secrezione

Mentre è noto che il principale, anche se non unico, stimolo coinvolto nella secrezione dell'ANF è il sovraccarico di volume cardiaco con la conseguente distensione atriale, esistono soltanto scarse informazioni circa le relazioni fra gli stimoli fisiologici e l'espressione del gene dell'ANF a livello cellulare e molecolare. Vi sono evidenze, comunque, che modificazioni del bilancio idro-elettrolitico, sovraccarichi di volume o di pressione, i glucocorticoidi e l'ipertrofia ventricolare possano modificare i livelli di mRNA dell'ANF nei miociti. Altri fattori che certamente modificano il controllo della secrezione e forse la biosintesi dell'ANF sono l'angiotensina II, il controllo nervoso autonomo, variazioni osmotiche e, probabilmente, attraverso le modificazioni emodinamiche ad essi associate, l'arginin-vasopressina (AVP), l'endotelina e il neuropeptide γ . In particolare, va segnalato che l'angiotensina II è capace di stimolare la pro-

duzione di ANF in maniera diretta ed indipendente dall'incremento pressorio associato alla sua somministrazione, come dimostrato in miociti isolati, nel cuore isolato e perfuso ed in modelli sperimentali *in vivo*.

Recettori dell'ANF

L'ANF si lega perifericamente a due classi di recettori ad alta affinità presenti sulla superficie cellulare: i recettori biologici, che mediano la massima parte degli effetti del peptide atriale attraverso l'attivazione della guanilato-ciclastasi intracellulare che catalizza la formazione del guanosil-monofosfato ciclico (cGMP) a partire dal GTP, e i recettori di *clearance*, che sono simili a quelli biologici nella porzione extracellulare, ma che non sono collegati alla guanilato-ciclastasi intracellulare. Il recettore biologico presenta due sottotipi: il GC-A che lega ANF e BNP e il GC-B che lega solo il CNP. Tale differente legame al sito recettoriale può spiegare alcune delle differenze biologiche fra i tre peptidi. Il recettore di *clearance* (o *silent receptor*) è meno specifico e può legare tutti e tre i peptidi. Il cGMP è il messaggero intracellulare responsabile della gran parte degli effetti biologici dell'ANF. I livelli di questo nucleotide aumentano nei liquidi biologici (plasma e urine incluse) sia in seguito a somministrazione esogena del peptide sia dopo stimolazione della secrezione endogena, come ad es. in seguito a passaggio dalla postura ortostatica a quella clinostatica o durante immersione in acqua, riflettendo in maniera parallela le variazioni dei livelli dell'ANF e precedendo sistematicamente gli effetti biologici del peptide atriale.

Effetti biologici

Le azioni biologiche dei peptidi atriali sono numerose e contribuiscono in maniera rilevante al controllo dell'equilibrio idrosalino, alla regolazione del volume intravascolare e, probabilmente della pressione arteriosa. I principali effetti biologici sono i seguenti.

1) *Effetti renali*: i peptidi natriuretici causano potente e sostenuta diuresi e natriuresi, che sono principalmente secondarie all'aumento rapido e persistente della velocità di filtrazione glomerulare causata dall'ANF, sebbene siano stati chiamati in causa effetti sui meccanismi di riassorbimento e trasporto tubulare.

2) *Effetti vascolari*: i peptidi natriuretici sono dotati di potente ed ubiquitaria azione vasorilassante, sia per un effetto diretto sulla muscolatura liscia mediato dal cGMP, sia attra-

verso effetti diretti endotelio-mediati (ad es. per inibizione della produzione di endotelina) o secondari all'antagonismo selettivo dell'azione vasocostrittrice dell'angiotensina II o all'azione di potenziamento dei meccanismi baroriflessi arteriosi. Inoltre, i peptidi natriuretici sono responsabili di un aumento della permeabilità capillare sistemica, effetto che a sua volta può promuovere uno *shift* di fluidi dal compartimento intravascolare a quello extravascolare salvaguardando in tal modo l'omeostasi del volume intravascolare in condizioni di sovraccarico, ma contribuendo nel contempo alla formazione dell'edema tipico di patologie quali lo scompenso cardiaco congestizio o la cirrosi epatica. Infine l'infusione di ANF può causare riduzione della pressione arteriosa sistemica.

3) *Effetti sul sistema renina-angiotensina-aldosterone*: l'ANF antagonizza in maniera selettiva numerose azioni dell'angiotensina II e può essere considerato un «contro-oromone» nei confronti del sistema renina-angiotensina. Infatti, l'ANF riduce in maniera diretta la produzione di renina da parte dell'apparato iuxta-glomerulare e quella di aldosterone da parte delle cellule della zona glomerulosa surrenalica; inibisce in modo preminente numerosi effetti dell'angiotensina II: la vasocostrizione, la sete, la stimolazione della produzione di aldosterone e di arginin-vasopressina, il riassorbimento prossimale di sodio a livello del tubulo prossimale, e l'effetto sui riflessi barocettivi autonomi. Dal momento che, a sua volta, la secrezione di ANF è stimolata dall'angiotensina II, è stata ipotizzata la esistenza di un meccanismo di *feedback* di controllo reciproco dei due sistemi ormonali, che gioca un ruolo nel controllo dell'omeostasi idrosalina e circolatoria (fig. 1).

L'azione integrata di questi effetti dell'ANF tende complessivamente a preservare il volume circolante, favorendo l'escrezione di fluidi e soluti attraverso l'emuntorio renale e il distretto capillare, nonché antagonizzando i meccanismi idro- e sodio-ritentivi (angiotensina II, AVP, sete). In tal modo, i peptidi natriuretici possono determinare una riduzione delle pressioni di riempimento cardiache, effetto di grande importanza nell'insufficienza cardiaca.

Possibile impiego clinico dei peptidi natriuretici

La determinazione dei livelli plasmatici di ANF e BNP viene effettuata mediante tecnica radioimmunologica su plasma dopo estrazione dello stesso. I livelli di ANF e BNP sono elevati nel plasma umano in numerose condizioni, incluse l'ipertensione arteriosa, specialmente ove

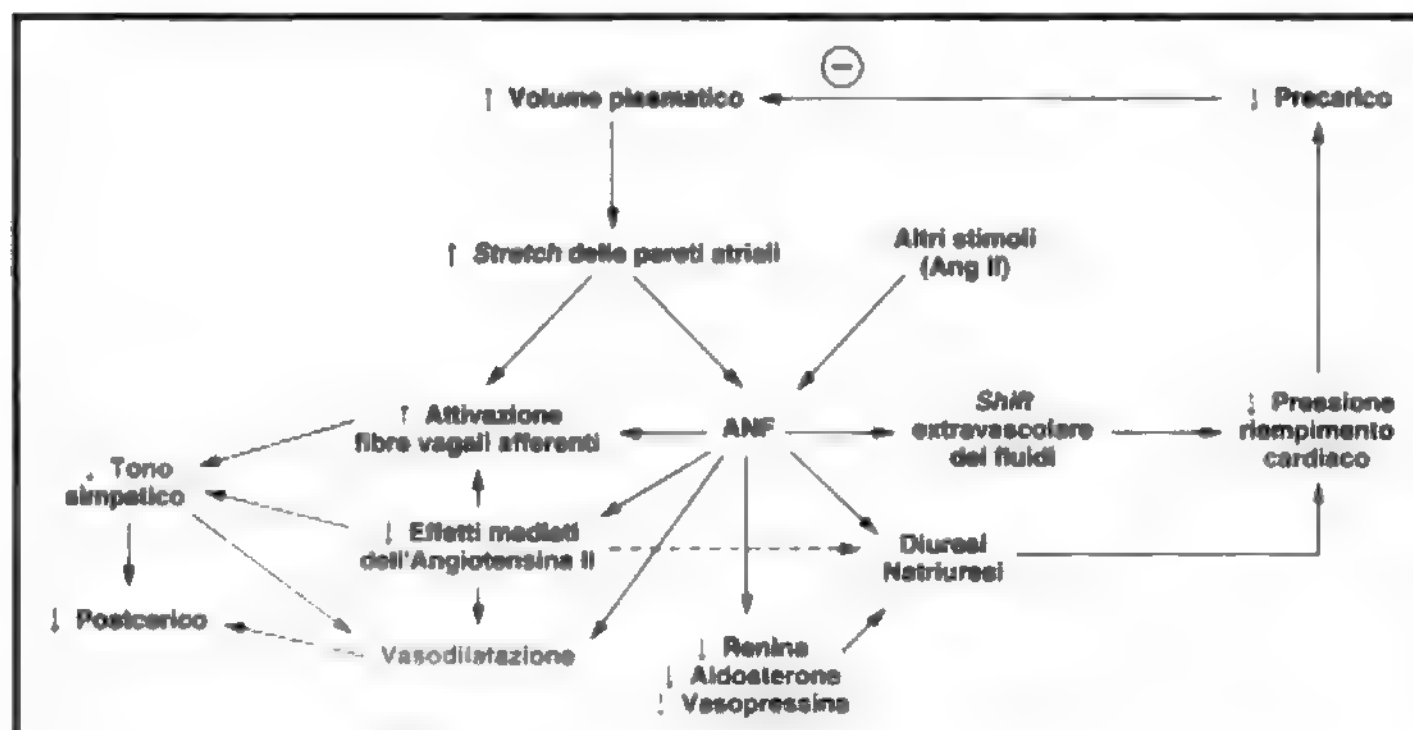


Fig. 1. Rappresentazione schematica degli effetti biologici e della regolazione della produzione del f. n. a. (ANF: atrial natriuretic factor).

coesista ipertrofia ventricolare sinistra, la cirrosi epatica e l'insufficienza renale cronica. Tuttavia, la condizione patologica in cui i livelli circolanti di questi peptidi crescono maggiormente fino a 100-150 volte quelli normali (che sono compresi tra 5-15 pg/ml) è l'insufficienza cardiaca. In questa affezione, inoltre, i livelli crescono progressivamente, in maniera proporzionale all'entità della disfunzione ventricolare sinistra o dell'aumento delle pressioni intracavitarie. Per questo motivo, la determinazione dei livelli di ANF può costituire un eccellente parametro non invasivo per la diagnosi ed il follow-up di questi pazienti in clinica.

Un altro potenziale impiego clinico del sistema dei peptidi natriuretici è basato sulla somministrazione terapeutica di farmaci che, inibendo il catabolismo dell'ANF ed aumentandone l'emivita, possano potenziarne gli effetti biologici, azione che potrebbe essere di grande utilità nell'insufficienza cardiaca. A tale categoria di farmaci appartengono gli inibitori delle neutroendopeptidasi che sono gli enzimi responsabili del catabolismo dell'ANF. Un approccio terapeutico alternativo per aumentare l'emivita e l'attività biologica dei peptidi atriali è basato sulla possibilità di bloccare selettivamente i recettori di clearance. Va infine ricordato che recenti osservazioni cliniche hanno dimostrato l'effetto benefico della somministrazione di ANF nell'insufficienza renale acuta.

Bibliografia

- Atlas S. A., Cody R. J., Camargo M. J. F. et al., *Atrial natriuretic factor and its role in circulatory physiology*, in Edwards C. R. W. e Lincoln D. W. eds., *Recent Advances in Endocrinology and Metabolism*, n. 3, 1989, Churchill Livingstone, New York.
 Davidson N. C., Struthers A. D., *J. Hyperten.*, 1994, 12, 329.
 deBold A. J., Borenstein H. B., Veress A. T., Sonnenberg H., *Life Sci.*, 1981, 28, 89.
 Dzau V. J., Baxter J. D., Cantin M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1987, 316, 1278.
 Laragh J. H., *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313, 1330.
 Lewicki J. A., Protter A. A., *Physiological studies of the natriuretic peptide family*, in Laragh J. H. e Brenner B. M. eds., *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 1995, 2 ed., Raven Press Ltd., New York.
 Maack T., *Receptors of natriuretic peptides: Structure, function, and regulation*, in Laragh J. H. e Brenner B. M. eds., *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 1995, 2 ed., Raven Press Ltd., New York.
 Ogawa Y., Nakao K., *Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in cardiovascular disorders*, in Laragh J. H. e Brenner B. M. eds., *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 1995, 2 ed., Raven Press Ltd., New York.
 Volpe M., *Cardioscience*, 1992, 3, 217.
 Volpe M., Tritto C., Condorelli M., *Acta Cardiol.*, 1993, 5, 483.
 Volpe M., Tritto C., DeLuca N. et al., *J. Clin. Invest.*, 1991, 88, 1481.

MASSIMO VOLPE

FATTORE VIII: v. COAGULAZIONE DEL SANGUE* (col. *1720); EMOFILIA* (col. *2358); EMOFILIA** (col. **1829); v. anche GLOBULINA ANTIEMOFILICA* (coll. 3413-3414); TRASFUSIONE (XV, 304).

FATTORI DI CONTATTO

f. *facteurs de contact*. - i. *contact factors*. - s. *factores de contacto*.

Per fattori di contatto [f. di c.] si intendono le proteine del sistema della coagulazione del sangue (v.*; v.***) che intervengono durante la prima fase di attivazione (o contatto-attivazione) della via intrinseca di tale sistema. Queste proteine sono il fattore XII, il fattore XI, la precallieina, il chininogeno ad alto peso molecolare.

Il *fattore XII*, o *fattore Hageman*, è una proteina dal p.m. di 80.000 dalton, costituito da 596 aminoacidi organizzati in una catena singola. Il cDNA che codifica per il fat-

tore XII è stato clonato e sequenziato. Il fattore XII può essere attivato da enzimi (come la tripsina, la callicreina, la plasmina, il fattore XIa), da esposizione al vetro, da sostanze varie (come l'acido ellagico, l'omocisteina, gli acidi grassi). La trasformazione nella forma attiva, o XIIa, avviene per clivaggio di un singolo legame arg₃₄₃-val₃₅₄, con formazione di una catena pesante (353 aminoacidi, con i siti di legame per le superfici con carica negativa) e di una catena leggera (243 aminoacidi, con il centro attivo, tipico delle serina-proteasi).

Il fattore XIIa può attivare il fattore XIa, la precallieina, l'attivatore tessutale del plasminogeno, il fattore VII.

Il *fattore XI* è una proteina dal p.m. di 180.000 dalton, formata da due catene identiche, ciascuna costituita da 607 aminoacidi. Tale sequenza è conosciuta, ed è stato clonato e sequenziato il corrispondente cDNA. Il fattore XI può essere attivato dal fattore XIIa e dalla tripsina. L'attivazione porta al clivaggio di un sito posto in corrispondenza del legame arg₁₆₅-ile₁₇₀, con formazione di una proteina tetramica, contenente 2 catene leggere (238 aminoacidi, con il centro attivo delle serina-proteasi) e 2 catene pesanti (369 aminoacidi).

La *precallieina*, o *fattore Fletcher*, è una proteina costituita da 619 aminoacidi in singola catena. Essa può essere attivata a callicreina dal fattore XIIa e dalla stessa callicreina, in seguito a clivaggio di un legame arg-ile, e conseguente formazione di una catena pesante (371 aminoacidi, contenente il sito di legame per il chininogeno ad alto peso molecolare) e di una catena leggera (248 aminoacidi, contenente il sito attivo). La callicreina può attivare anche il plasminogeno.

Il *chininogeno ad alto peso molecolare* è costituito, nella sua forma attiva, da una glicoproteina a singola catena, con un p.m. di 120.000 dalton. Il chininogeno forma nel plasma complessi bimolecolari con la precallieina e il fattore XI, ai quali si lega in modo irreversibile.

Quando il fattore XII viene a contatto con una superficie carica negativamente, viene adsorbito da essa e subisce una trasformazione conformazionale che lo rende più sensibile all'azione proteolitica della callicreina e della plasmina. Così si verifica una reciproca attivazione tra fattore XII e precallieina, con formazione di fattore XIIa e callicreina (fig. 1); questa ultima stacca la bradichinina dal chininogeno. La callicreina e il chininogeno, privati della bradichinina, si staccano dalle superfici a carica negativa, permettendo così il legame di altre molecole di fattore XI e di precallieina. In particolare quando il fattore XI si viene a trovare vicino al fattore XIIa: ne subisce l'attivazione enzimatica; il fattore XIa rimanendo adeso alle superfici a carica negativa inizierebbe quindi la serie di reazioni che caratterizzano la fase intrinseca della coagulazione. Così si comprende come per un'ottimale attivazione della coagulazione *in vitro* è necessaria la presenza di tutti e quattro i f. di c. anche se alcuni aspetti fisiopatologici risultano non chiariti; ad es. l'enzima fisiologicamente responsabile dell'iniziale clivaggio del fattore XII, non è stato ancora identificato. Il ruolo svolto in condizioni fisiologiche dai f. di c. nell'attivazione della coagulazione, non è ancora ben conosciuto; tuttavia, sappiamo per certo che i soggetti con carenza assoluta di fattore XII, di precallieina o di chininogeno ad alto peso molecolare non presentano manifestazioni emorragiche, mentre una lieve sindrome emorragica caratterizza il deficit di fattore XI.

Il sistema dei f. di c. svolgerebbe quindi un ruolo importante soprattutto in alcune situazioni fisiopatologiche, come la coagulazione intravascolare disseminata (v.*), le sepsi (v.**), gli stati di shock (v.; v.**).

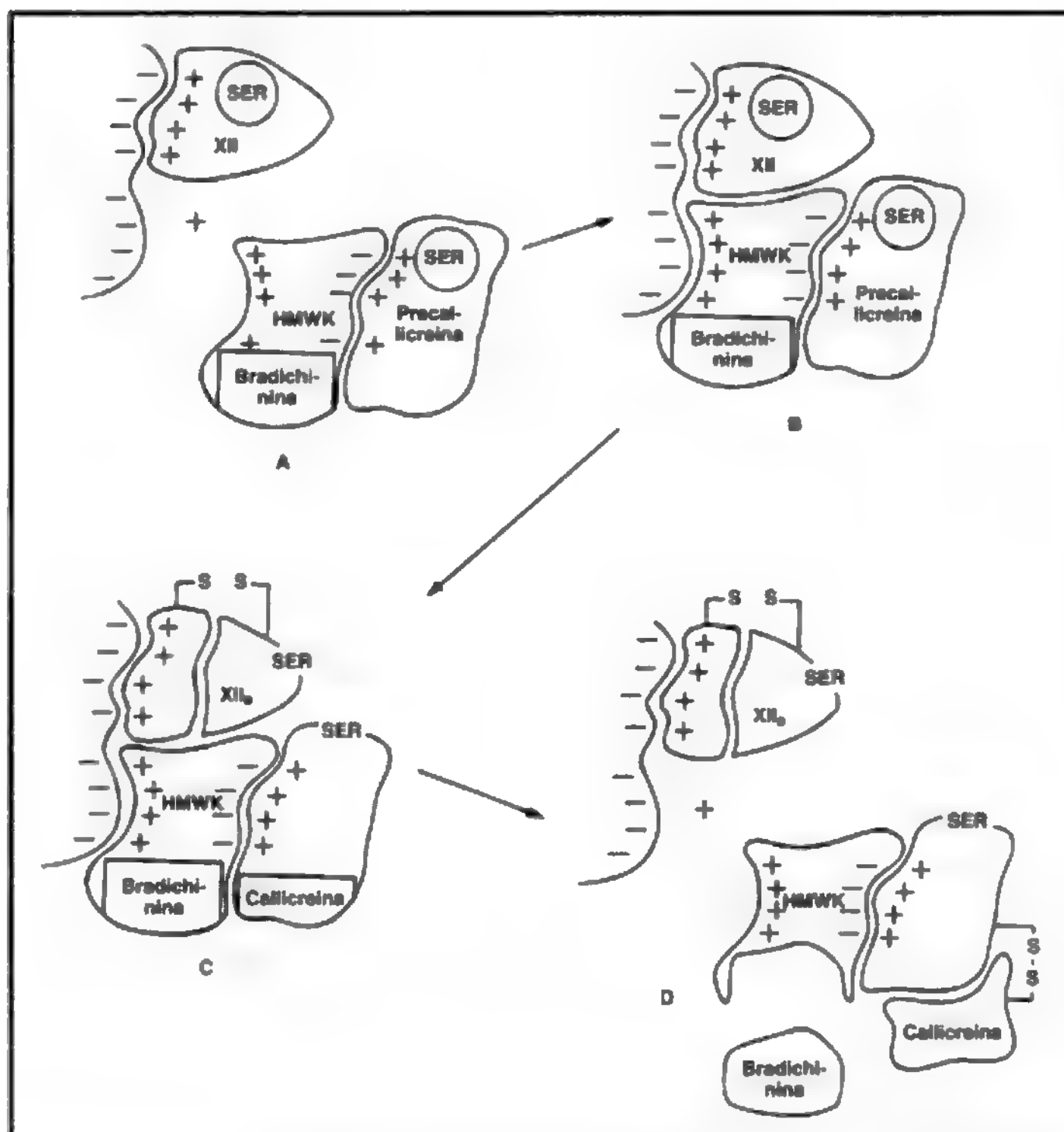


Fig. 1. Attivazione del f. di c. SER) serina, HMWK (High Molecular Weight Kininogen) chinogeno ad alto peso molecolare. Per semplicità non è riportato il complesso fattore XII/HMWK (Da Verstraete, 1991, modificata e ridisegnata).

Bibliografia

- Chung D. W., Fujikawa K. *et al.*, *Biochemistry*, 1986, **25**, 2410.
 Dunn J. T., Silverberg M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 1779.
 Fujikawa K., Chung D. W. *et al.*, *Biochemistry*, 1986, **25**, 2417.
 Kitamura N., Kitagawa H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 8610.
 Nemerson Y., in Williams W. J., Beutler E. *et al.* eds., *Ematologia*, 1991, edizione italiana, McGraw-Hill, Milano.
 Oue B. G., Davie E. W., *Biochemistry*, 1986, **25**, 1525.
 Verstraete M., in Haber E., Braunwald E. eds., *Thrombolysis. Basic Contributions and Clinical Progress*, 1991, Mosby, St. Louis.

GIUSEPPE M. GANDOLFO E LAURA CONTI

FATTORI DI CRESCITA [v. Agg. I, coll. *2973-2982]

SOMMARIO

Definizione e introduzione (col. 2160). - **Biochimica dei fattori di crescita e dei loro recettori** (col. 2164). - **Meccanismo d'azione** (col. 2167). - **Oncogeni, fattori di crescita e cancro** (col. 2169). - **Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)** (col. 2170). - **Fattore di crescita epidermico (EGF)** (col. 2170). - **Fattori di crescita fibroblastici (FGF)** (col. 2171). - **Fattore di crescita epatocitico (HGF)** (col. 2171). - **Fattori di crescita insulinosimili (IGF) o somatomedine** (col. 2171). - **Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)** (col. 2171). - **Neurotrofine (fattori neurotrofici)** (col. 2172). - **Citochine** (col. 2174). **Interleuchine (linfocine)**. - **Fattori di stimolazione di colonie (CSF, Colony-Stimulating Factors)**. - **Fattori di crescita trasformanti (TGF, Transforming**

Growth Factors). - **Fattori della necrosi tumorale (TNF, Tumor Necrosis Factors)**.

Definizione e introduzione

Oltre che nel loro ambiente naturale, le cellule viventi possono crescere in terreni di coltura appropriati. Le cellule batteriche, per es., sono in grado di proliferare in un terreno molto semplice fatto di una soluzione tampone, sali minerali e uno zucchero come fonte di energia; a volte sono necessarie piccole quantità di molecole bioregolatrici, come le vitamine. Nell'accezione più vasta, un *fattore di crescita* [f. di c.] è una qualunque molecola con un'azione specifica sulla crescita di particolari cellule. Il termine *f. di c.* ha oggi un significato più ristretto ed è sinonimo di *f. di c. peptidici*, piccole proteine altamente specifiche che regolano, in senso positivo o negativo, la proliferazione cellulare in organismi superiori. Le cellule di questi organismi sono molto più esigenti dei batteri: per coltivarle in laboratorio si utilizza un mezzo di coltura che contiene, oltre a una miscela di zucchero, sali, aminoacidi e vitamine, anche materiale biologico di composizione non ben definita. Inizialmente il materiale biologico era sangue coagulato, sostituito poi da estratti di embrione di pollo, e finalmente dal siero, il fluido che rimane dopo la coagulazione del sangue. Le cellule di mammifero private di siero smettono di crescere e si fer-

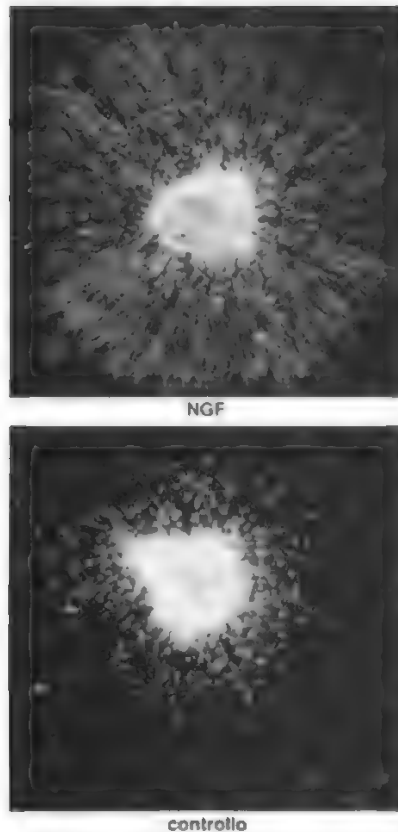


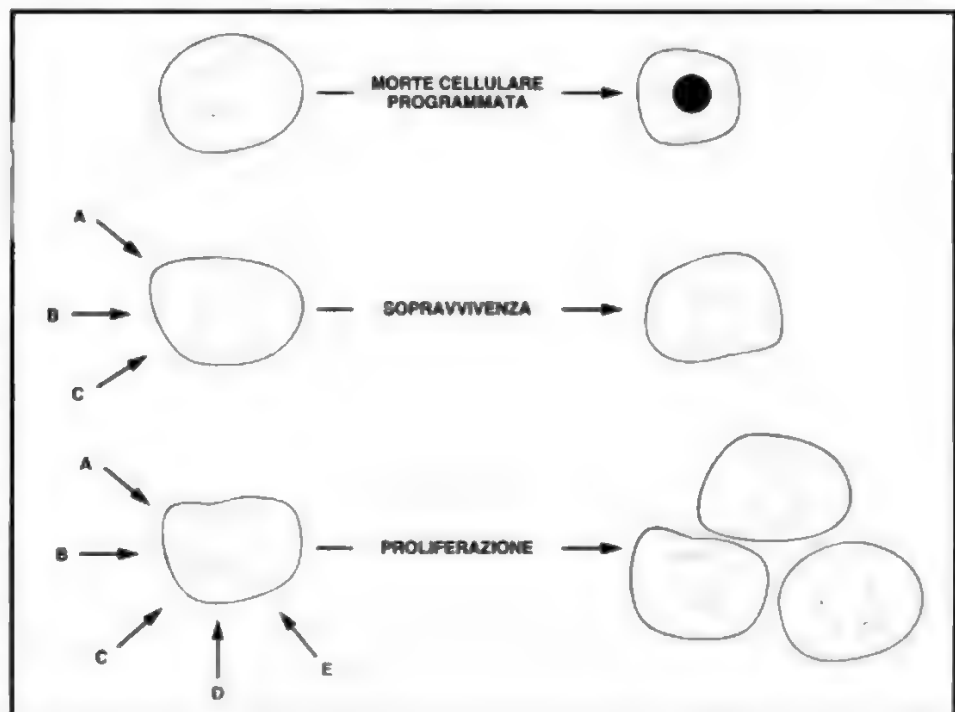
Fig. 1. Effetti del NGF sulla crescita dei neuriti. Fotografie al microscopio ottico in campo scuro di un ganglio simpatico per 48 ore con (sopra) o senza (sotto) NGF. I neuriti crescono dai neuroni simpatici solo se l'NGF è presente nel mezzo di coltura. Ogni coltura contiene anche cellule di Schwann (gliali) che sono migrate fuori dal ganglio; esse non dipendono dall'NGF per la loro crescita. La sopravvivenza neuronale e il mantenimento dei coni di crescita per l'estensione dei neuriti rappresentano due effetti distinti dell'NGF. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).

proprio f. di c. peptidici rilasciati dalle piastrine nella coagulazione. In molti casi, è oggi possibile rimpiazzare il siero nei terreni di coltura con una combinazione definita di ormoni, f. di c. e altre proteine come per es., la transferrina (v.; v.**), che serve a trasportare Fe^{3+} all'interno delle cellule. I f. di c. vengono anche chiamati *mitogeni*, termine generico che indica tutte le sostanze capaci di stimolare la proliferazione cellulare, come ad es. i lipopolisaccaridi batterici e le lectine (proteine estratte dai semi di alcune piante), indipendentemente dal fatto che questa sia la loro funzione naturale. Diversamente dagli ormoni (v.; v.**), i f. di c. non sono prodotti in ghiandole specializzate, ma sono sintetizzati da vari tipi di cellule e rilasciati in punti diversi dell'organismo, dove esercitano la loro azione. Sebbene alcuni di essi siano presenti in circolo, i f. di c. vengono in genere prodotti in prossimità del loro sito d'azione e agiscono da mediatori locali, in modo paracrina o autocrino; poiché sono presenti in quantità minime, è piuttosto difficile fare la mappa della loro distribuzione nell'organismo.

I f. di c. hanno una specificità cellulare più o meno vasta ed uno spettro d'azione molto più vasto di quanto non dica il loro nome: oltre a stimolare la proliferazione cellulare, molti di essi sono anche in grado di inibirla o di esercitare altri effetti relativi a sopravvivenza, differenziamento, migrazione o attività funzionale delle cellule. Ad es., il primo f. di c. scoperto, il f. di c. nervoso NGF (*Nerve Growth Factor*) (v. X, 733; *5366), non ha un forte effetto proliferativo, ma è necessario alla sopravvivenza e al differenziamento di particolari cellule neuronali (fig. 1); inoltre è del tutto inefficace su altre cellule quali i fibroblasti. Queste proprietà si spiegano con la presenza, sulle cellule bersaglio, di «antenne» molecolari specifiche per un singolo f. di c.; i *recettori* (fig. 2). Esistono molti f. di c. con diversa specificità cellulare per permettere all'organismo di scegliere quali cellule far crescere e/o differenziare ed in quale momento; la regolazione delle funzioni cellulari dipende spesso da una combinazione specifica di f. di c. piuttosto che da un singolo fattore.

mano in uno stato quiescente chiamato G_0 , compreso tra la mitosi e la fase S del ciclo cellulare (v. mitosi). I fattori del siero essenziali alla crescita delle cellule in coltura sono

Fig. 2. Segnalazione combinatoria. Ciascun tipo di cellula ha una serie di recettori che permette di rispondere ad una serie corrispondente di molecole segnale prodotte da altre cellule. Queste molecole segnale agiscono in combinazione per regolare il comportamento della cellula. Come mostrato qui, molte cellule richiedono segnali multipli (freccie verdi) per sopravvivere e ulteriori segnali (freccie rosse) per proliferare; se sono private di tutti i segnali, queste cellule vanno incontro a una morte cellulare programmata (apoptosi [v.***]). (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).



FATTORI DI CRESCITA

Il termine stesso f. di c., in realtà, non è proprio esatto. Queste molecole sono elementi di un codice abbastanza complesso e vanno viste come agenti multifunzionali che portano messaggi da una cellula all'altra; il significato del messaggio può non essere univoco, in quanto va interpretato solo nel contesto degli altri segnali che la cellula riceve. Il nome dei vari f. di c. (NGF, f. di c. nervoso; EGF, f. di c. dell'epidermide; TGF, f. di c. trasformante; etc. [tab. I]) deriva dal saggio biologico che inizialmente ha permesso di metterli in evidenza: in molti casi si tratta di saggi *in vitro*, che non esauriscono la funzione del f. di c. all'interno dell'organismo. Utili informazioni sul ruolo fisiologico dei f. di c. vengono oggi ottenute dall'analisi di topi nei quali il gene di un particolare f. di c., o del suo recettore, viene inattivato (topi «knock out») o viene fatto funzionare in modo da noi controllato (topi transgenici) (v. TRANSGENICI ANIMALI*).

Lo studio del meccanismo d'azione dei f. di c. ha grande rilevanza medica per numerose patologie, quali cancro, malattie neurodegenerative e malattie correlate con l'emoipoiesi o col funzionamento del sistema immune. Molecole come il TNF (*Tumor Necrosis Factor* [v. sotto]), gli interferoni (v. INTERFERONE [v.; v.*]) o le interleuchine (v.*; v.***) sono responsabili di molti dei sintomi dell'influenza o di infezioni virali più gravi. La caratteristica di regolare aspetti importanti della funzione cellulare agendo dall'esterno fa prospettare un *utilizzo terapeutico* diretto dei f. di c. o di piccole molecole ad azione mirata che funzionino da loro agonisti o antagonisti. In alcuni casi (per es., l'NGF ed alcune citochine [v.**]) si è già alla sperimentazione clinica. La non completa comprensione del messaggio portato dai

f. di c. ed i loro effetti pleiotropici costituiscono ancora un ostacolo per questo fine.

Biochimica dei fattori di crescita e dei loro recettori

Il tipico f. di c. è una piccola proteina secreta (mediamente 50-200 aminoacidi e p.m. compreso approssimativamente tra 6 e 40 kd), spesso prodotta anche da cellule in coltura. Solitamente deriva da una proteina precursore molto più grande, il *pre-profattore di crescita*, nella quale è presente una sequenza *leader*, che serve da segnale per la secrezione, più altre sequenze che vengono rimosse, all'interno della cellula o sulla membrana cellulare, per generare il prodotto finale. Come altre proteine secrete, i f. di c. sono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico e passano attraverso l'apparato del Golgi, dove possono subire delle modificazioni, come ad es. l'aggiunta di zuccheri; di lì sono trasportati, all'interno di vescicole secretorie, fino alla membrana cellulare (fig. 3). A questo punto sono rilasciati all'esterno della cellula, oppure possono rimanere ancorati alla membrana cellulare per mezzo di una piccola coda peptidica. La coda viene tagliata e il f. di c. rilasciato quando è necessario.

I f. di c. possono essere raggruppati in famiglie, costituite da molecole diverse che si assomigliano molto, ad es. le neurotrofine, gli IGF (*Insulin-like Growth Factors*; f. di c. *insulino-simili*), etc. I f. di c. agiscono a concentrazioni molto basse (dell'ordine dei ng/ml o addirittura pg/ml) e solo su alcuni tipi cellulari. Queste proprietà si spiegano facilmente con la presenza sulle cellule bersaglio di recettori specifici ad alta affinità di legame (costante di legame $k \leq 10^{-9} M$). Il numero di recettori per un f. di c. può variare da alcune migliaia a 500.000 per cellula in condizioni patologiche. Una singola cellula possiede recettori

TAB. I. ALCUNI FATTORI DI CRESCITA PROTEICI E I LORO EFFETTI

Fattore	Membri della famiglia	Specificità larga o stretta	Effetti rappresentativi
Fattore derivato dalle piastrine (PDGF) - tre sottotipi		larga	stimolano la proliferazione di cellule del tessuto connettivo e di alcune cellule neurogliali
Fattore di crescita dell'epidermide (EGF)	fattore di crescita trasformante α (TGF- α); proteina Lin-3 (in <i>C. elegans</i>)	larga	stimolano la proliferazione di molti tipi di cellule; agiscono da segnale induttivo nello sviluppo embrionale
Fattore di crescita insulinosimile I (IGF-I)	fattore di crescita insulinosimile II (IGF-II); insulina	larga	promuovono la sopravvivenza cellulare; stimolano il metabolismo cellulare; collaborano con altri fattori di crescita per stimolare la proliferazione cellulare
Fattore di crescita trasformante β (TGF- β) - molteplici sottotipi	attivine; proteine morfogenetiche dell'osso (BMP); proteina decapentaplegica (in <i>Drosophila</i>); proteina Vgl (in <i>Xenopus</i>)	larga	potenziano o inibiscono le risposte della maggior parte delle cellule ad altri fattori di crescita, secondo il tipo cellulare; regolano il differenziamento di alcuni tipi di cellule; agiscono da segnali induttivi nello sviluppo embrionale
Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) - molteplici sottotipi		larga	stimolano la proliferazione di molti tipi di cellule; inibiscono il differenziamento di vari tipi di cellule staminali; agiscono da segnali induttivi nello sviluppo embrionale
Interleuchina-2 (IL-2)		stretta	stimola la proliferazione dei linfociti T attivati
Fattore di crescita nervoso (NGF)	fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4)	stretta	promuovono la sopravvivenza e la crescita dei prolungamenti nervosi di classi specifiche di neuroni
Eritropoietina		stretta	promuove la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza dei precursori dei globuli rossi
Interleuchina-3 (IL-3)	fattori che stimolano le colonie emopoietiche (CSF) - molteplici tipi	stretta	stimolano la proliferazione e la sopravvivenza di vari tipi di precursori di cellule ematiche

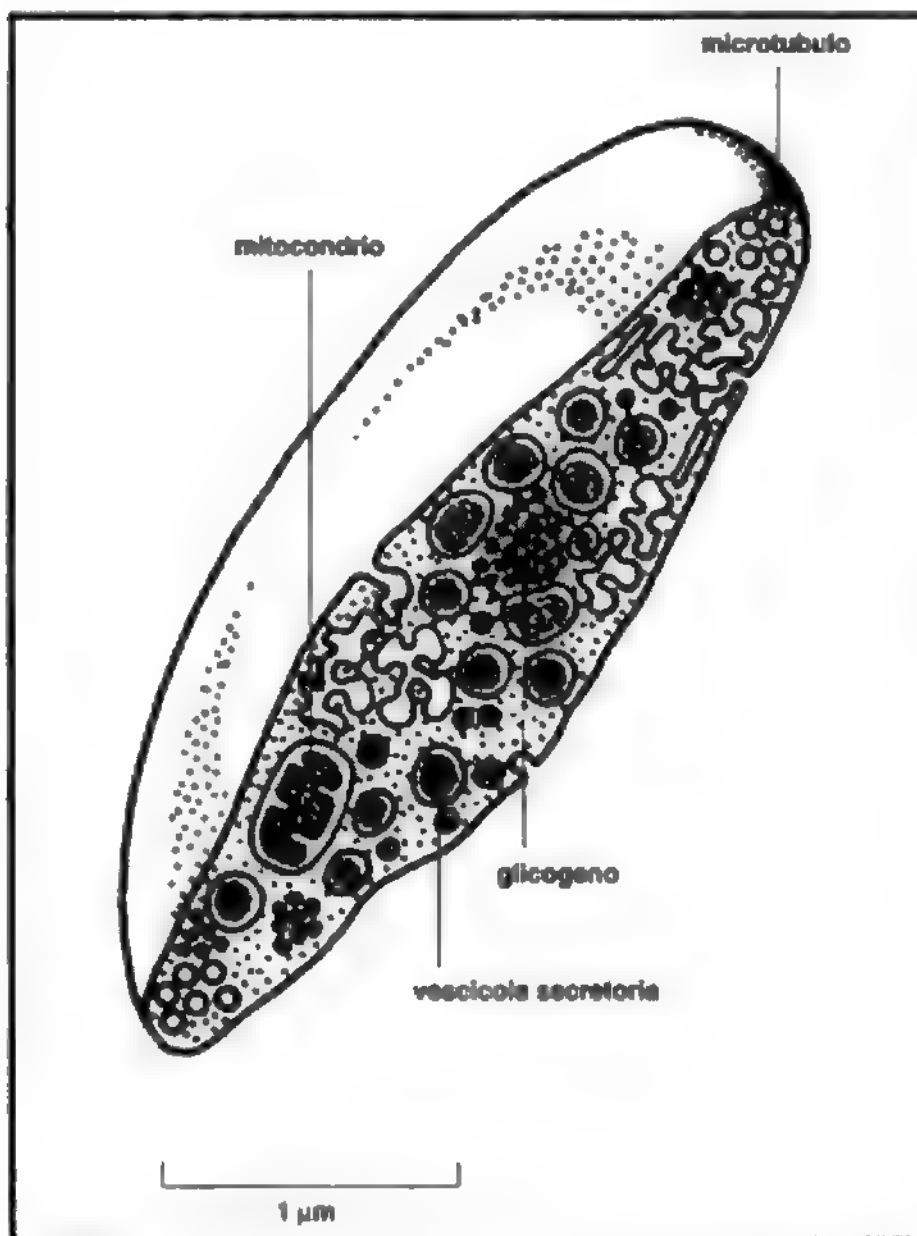
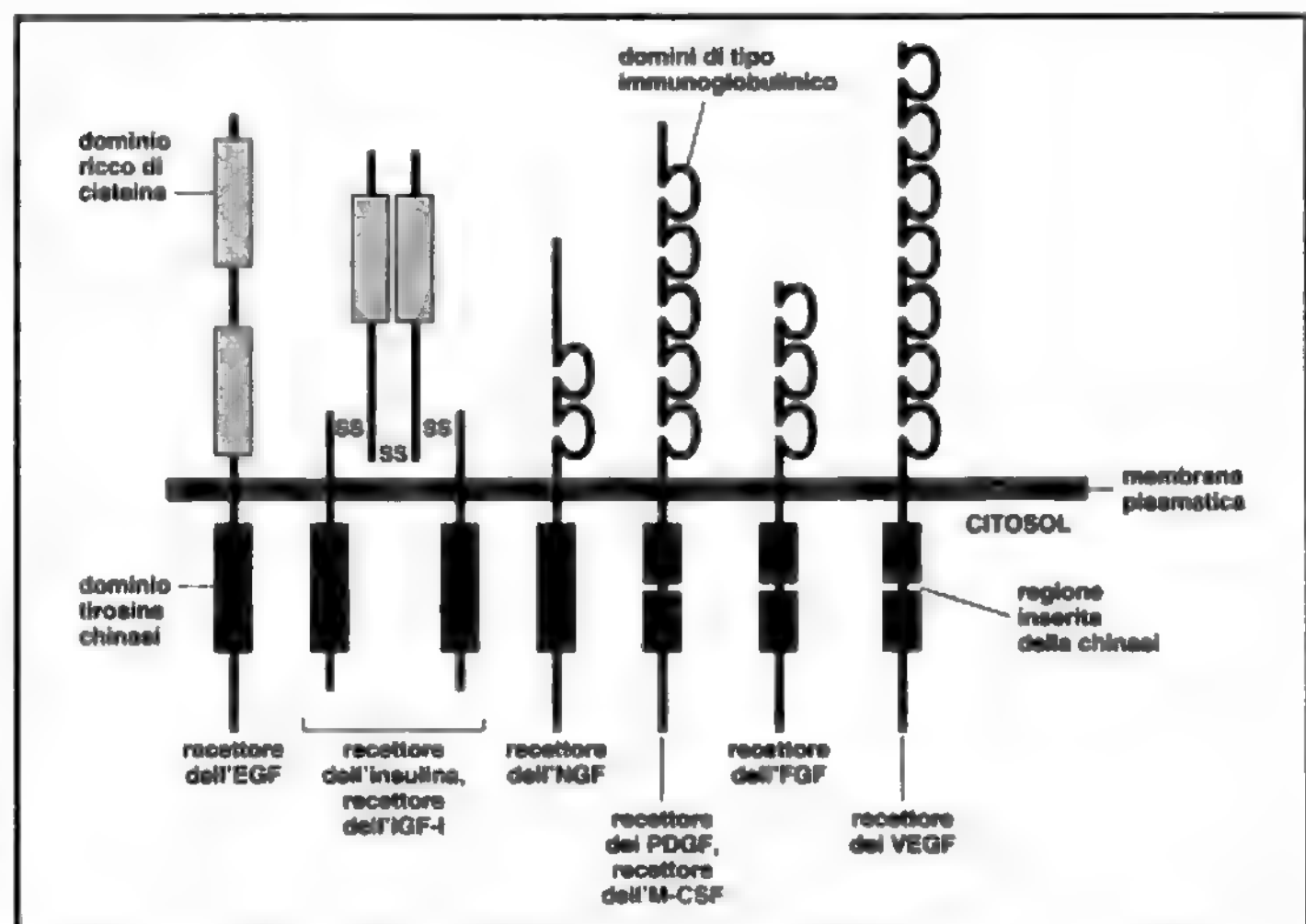


Fig. 3. I f. di c. sono sintetizzati e secreti da molteplici cellule dell'organismo. Le piastrine rilasciano vari fattori che stimolano la guarigione delle ferite. La piastrina schematizzata è aperta per mostrare le vescicole secretorie che contengono: alcune di queste contengono il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).

solo per alcuni f. di c.; inoltre, il tipo di recettori presenti può cambiare durante il differenziamento cellulare, modificando le sue caratteristiche fisiologiche.

I recettori (v.; v.º) sono in genere glicoproteine a struttura tripartita: presentano un dominio glicosilato extracellulare che lega il f. di c., un dominio idrofobico che attraversa la membrana plasmatica (dominio transmembrana) e un dominio idrofilo intracellulare addetto alla trasmissione del segnale. A volte, come per le neurotrofine e le interleuchine, esistono due o tre molecole distinte che servono da recettore per un singolo f. di c. Il recettore, protagonista della trasmissione del segnale, opera in maniera simile a un enzima allosterico: il legame col f. di c. ne modifica la conformazione e contemporaneamente l'attività. Anche i recettori vengono raggruppati in famiglie che presentano domini strutturali e funzionali simili. Nella famiglia più vasta, il dominio intracellulare ha un'attività enzimatica di *tirosina chinasi* (fig. 4), aggiunge, cioè, gruppi fosfato ai residui tirosina di alcune proteine. Tale attività è stimolata dal legame col f. di c. ed è autocatalitica: il recettore fosforila se stesso (*autofosforilazione*) oltre ad altre proteine bersaglio. Altri recettori, pur non essendo tirosina chinasi, sono associati sulla membrana cellulare ad un'altra proteina con tale attività: in tal caso il legame col f. di c. stimola l'attività tirosina chinasi della proteina associata al recettore. Altri recettori (recettore per TGF- β , *Transforming Growth Factor- β* [v. sotto]) hanno attività di serina-treonina chinasi (aggiungono gruppi fosfato a particolari residui treonina o serina presenti nelle loro proteine bersaglio), altri (CD45) di tirosina fosfatasi, altri ancora (p75, recettore a bassa affinità per le neurotrofine, e IL2R- α) non hanno attività enzimatica nota. I recettori con attività tirosina chinasi sono quelli meglio studiati; possono promuovere la proliferazione, il differenziamento o la sopravvivenza cellulare, a seconda del particolare recettore e del tipo cellulare. Nonostante la diversità delle risposte cellulari, la gran parte dei recettori tirosina chinasi attivano simili vie di segnalazione in risposta al legame col f. di c. Una volta trasmesso il segnale, il complesso recettore-f. di c. viene portato per

Fig. 4. Sei sottofamiglie di recettori tirosina chinasi. Sono indicati solo una o due membri per sottofamiglia. Il significato funzionale dei domini ricchi in cisteina e di tipo immunoglobulinico non è noto. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).



endocitosi all'interno della cellula dove finisce nei lisosomi e viene degradato. Questo processo (*down regulation*) porta a una diminuzione del numero di recettori sulla superficie di una cellula esposta a un f. di c. e fa sì che lo stimolo da questo portato sia transitorio. I recettori possono essere riciclati dalla cellula o sintetizzati *ex novo* e riesposti sulla superficie.

Meccanismo d'azione

Dopo l'esposizione ad un f. di c., si possono mettere in evidenza una molteplicità di effetti all'interno della cellula, alcuni dei quali (alterazioni nei flussi ionici e nel metabolismo dei lipidi, redistribuzione del citoscheletro, fosforilazione di proteine e alterazioni nell'apparato di sintesi proteica) sono immediati, mentre altri (attivazione di geni e produzione di nuove proteine) richiedono alcune ore (fig. 5). Questi effetti sono la conseguenza di segnali che si generano sulla superficie cellulare in seguito al legame tra un f. di c. e il suo recettore e che migrano poi nel citoplasma e nel nucleo modificando il comportamento cellulare (*trasduzione del segnale*) (v. anche: **SEGNALI CELLULARI****).

Molti componenti della rete di segnalazione dei recettori tirosina chinasi sono noti in dettaglio. La prima parte del meccanismo di trasduzione del segnale si svolge a livello della membrana, dove il recettore, attivato dal legame col f. di c. e fosforilato in particolari residui di tirosina, recluta altri componenti attraverso interazioni dirette proteina-proteina e li attiva. L'esempio meglio noto è quello dell'attivazione di una piccola proteina che lega il GTP (guanosintrifosfato), la proteina Ras (v. **PROTEINE G****); altre vie di segnalazione operano attraverso molecole diverse: JAK (Janus chinasi), PLC (fosfolipasi C), PI3K (fosfatidilinositolo 3-chinasi) (v. **ONCOGENI E PROTONCOGENI****). Si generano così vari segnali che entrano nel citoplasma e nel nucleo per vie diverse: liberazione di secondi messaggeri (diacilglicerolo e fosfatidilinositidi), traslocazione nucleare di un componente inizialmente associato alla membrana, attivazione sequenziale di proteinchinasi citoplasmatiche (cascata della MAP [Mitogen-Activated Protein] chinasi, collegata a Ras). Le cascate non sono generalmente catene lineari di trasmissione ma si ramificano, formando una complessa rete di segnalazione altamente interconnessa, assimilabile ad un circuito elettronico. Particolarmente importante è la *via della MAP chinasi*, una via di segnalazione che connette segnali esterni all'attivazione di fattori trascrizionali che controllano crescita e differenziamento della cellula modificando l'espressione dei suoi geni. Questa via di segnalazione è ubiquitaria (opera in quasi tutte le cellule dell'organismo) ed universale, essendo utilizzata da tutti gli organismi eucariotici, dai più semplici, come i lieviti, ai più complessi.

Il meccanismo di produzione di secondi messaggeri che opera sul metabolismo del *fosfatidilinositolo* (un fosfolipide di membrana) ha una chiara relazione con la trasmissione di segnali di f. di c. Il legame al recettore attiva sia l'enzima PI3K, con la produzione di fosfoinositidi dalle funzioni sconosciute, che l'enzima *fosfolipasi C* γ , il quale scinde il fosfatidilinositolo in diacilglicerolo e inositol trifosfato, molecole idrofiliche che diffondono all'interno della cellula funzionando da secondi messaggeri. L'inositol trifosfato causa il rilascio del calcio (v. **v.***; **v.****) dal reticolo endoplasmatico; il calcio stimola alcune proteinchinasi e può regolare la proliferazione cellulare. Il diacilglicerolo attiva la proteinchinasi C (enzima che è anche il bersaglio degli *esteri del forbolo* [sostanze vegetali che si legano alla proteinchinasi C e la attivano direttamente], promotori tumorali) i cui substrati sono poco caratterizzati.

È invece meno chiara la relazione tra la risposta indotta da f. di c. e l'altro meccanismo noto di produzione dei secondi messaggeri, che porta alla formazione di AMP ciclico,

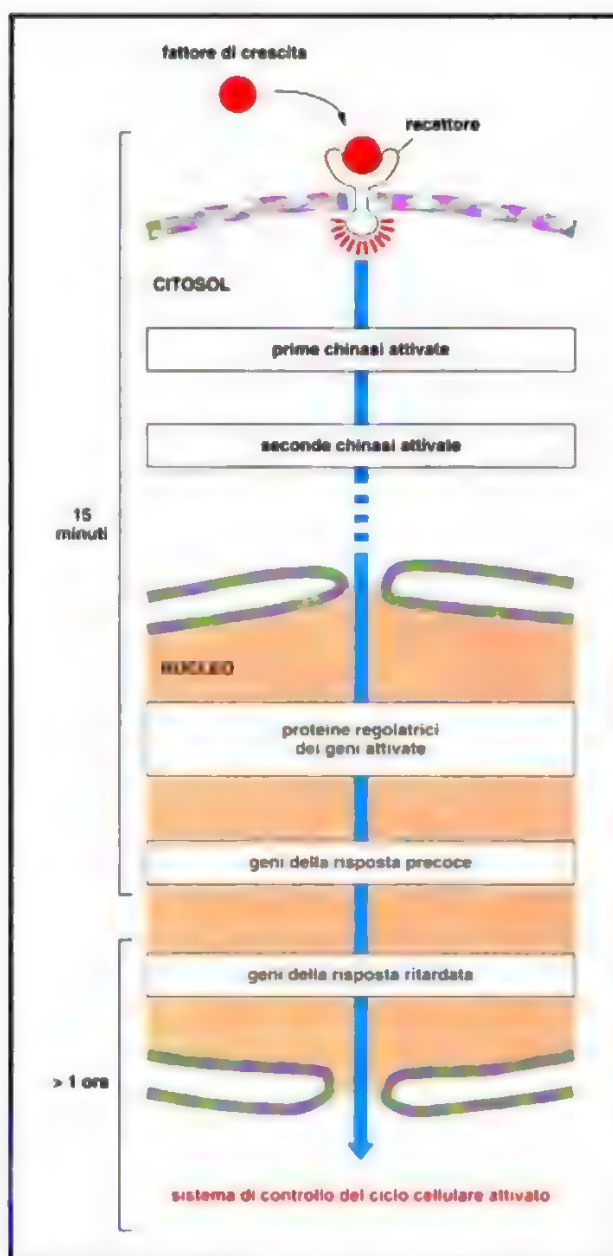


Fig. 5. Schema semplificato di una tipica via di segnalazione per la stimolazione della proliferazione delle cellule ad opera di un f. di c. Sono rappresentate alcune delle principali tappe. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).

Questa molecola regola l'attività di un insieme di chinasi, le proteinchinasi cAMP-dipendenti. Il cAMP è prodotto dall'enzima adenilato ciclasi, a sua volta regolato da proteine di membrana chiamate *proteine G* (v. **v.****), GTPasi la cui funzione dipende dal legame col GTP. Queste proteine hanno la funzione di amplificatori di segnale e fanno da intermediari tra l'enzima e particolari classi di recettori di membrana (recettori per ormoni e neurotrasmettitori, recettori olfattivi, fotorecettore rodopsina).

Le varie vie di segnalazione intracellulare attivate dai recettori dei f. di c. causano la fosforilazione di un gruppo di fattori trascrizionali che determinano l'attivazione e la re-

pressione dell'espressione di numerosi geni (si stima alcune decine). I geni della risposta precoce sono i primi ad essere attivati, 15-30 min dopo il legame al recettore, e la loro induzione non richiede sintesi proteica. I geni della risposta precoce più studiati sono gli oncogeni *fos*, *myc* e *jun* (fig. 6). I prodotti di alcuni geni della risposta precoce sono proteine regolative della trascrizione che servono per accendere l'espressione dei geni della risposta tardiva, che si osserva dopo circa un'ora. Fra i prodotti dei geni della risposta tardiva ci sono anche componenti del sistema di controllo del ciclo cellulare (ciclina e *cdk* [cyclin-dependent protein kinase]).

Oncogeni, fattori di crescita e cancro

Il cancro ha origini genetiche: al suo sviluppo contribuiscono il cattivo funzionamento o mutazioni in particolari geni che provocano una crescita cellulare incontrollata. La relazione tra f. di c. e cancro è stata messa in evidenza dallo studio degli oncogeni retrovirali (identificati inizialmente in retrovirus che causano tumori negli animali), una particolare classe di geni coinvolti nell'origine del cancro (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI²²). Gli oncogeni intervengono a livelli diversi nella via mitogenica dei f. di c.: alcuni di essi rappresentano infatti f. di c. o i loro recettori, altri le piccole proteine che legano il GTP (ad es., Ras) o altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale dei f. di c. Una classe di oncogeni che agisce nel nucleo rappresenta invece geni indotti in risposta a f. di c. È chiaro che un guasto nel sistema di segnalazione dei f. di c. è una componente importante di molti, se non di tutti, i tumori. L'alterazione può riguardare il f. di c. stesso, il suo recettore o il sistema intracellulare di trasmissione del segnale. In alcuni casi le cellule tumorali proliferano con un meccanismo autocrino, producendo, cioè, esse stesse f. di c. che ne stimolano la proliferazione: i TGF (Transforming Growth Factors: f. di c. trasformanti) secreti da alcune cellule tumorali possono costituire un esempio. Le cellule tumorali hanno a volte un numero esagerato di recettori (ad es., per l'EGF, Epidermal Growth Factor: f. di c. dell'epidermide) o hanno recettori che funzionano in maniera anomala, inviando continuamente segnali anche in assenza di f. di c.

Le nostre conoscenze sui f. di c. e sul loro meccanismo d'azione sono ancora insufficienti per permettere una terapia mirata del cancro (v. TUMORI [v. 2; v. 22]). È però in corso un'attiva sperimentazione, anche a livello clinico. In presenza di un meccanismo autocrino, si può intervenire con anticorpi contro il f. di c., a patto che questi non abbiano effetti deleteri su altre cellule. Potrebbe essere il caso dei mielomi, che producono IL-6, un potente stimolatore della

crescita di linfociti B. Anticorpi contro l'IL-6 bloccano la crescita dei mielomi *in vitro*, ma non si sa ancora se lo stesso si verifichi nell'organismo. Un'altra possibilità è quella di utilizzare in vari modi le citochine (v. 22) come immunostimolatori, per distruggere le cellule tumorali. Sono in corso in quest'ottica prove cliniche con varie interleuchine (principalmente IL-2, per la sua capacità di stimolare la produzione di linfociti killer), con TNF- α , GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) e interferone γ . I f. di c. emopoietici (CSF o Colony Stimulating Factors: fattori di stimolazione di colonie) possono essere un supporto alla chemioterapia in quanto permettono di limitare i danni al midollo osseo causati da questo trattamento e consentono di utilizzare dosi di chemioterapici più elevate e forse più efficaci. Di notevole interesse è l'utilizzazione di molecole che hanno la caratteristica di f. di c. negativi, come ad es. il TNF (Tumor Necrosis Factor: fattore della necrosi tumorale) o gli interferoni α . Questi ultimi sono utilizzati nel trattamento della leucemia mieloide cronica, del sarcoma di Kaposi, dei linfomi e di una piccola percentuale di melanomi. I cancri più diffusi nel mondo occidentale (quelli di polmoni, seno e intestino) non sono però sensibili a queste molecole.

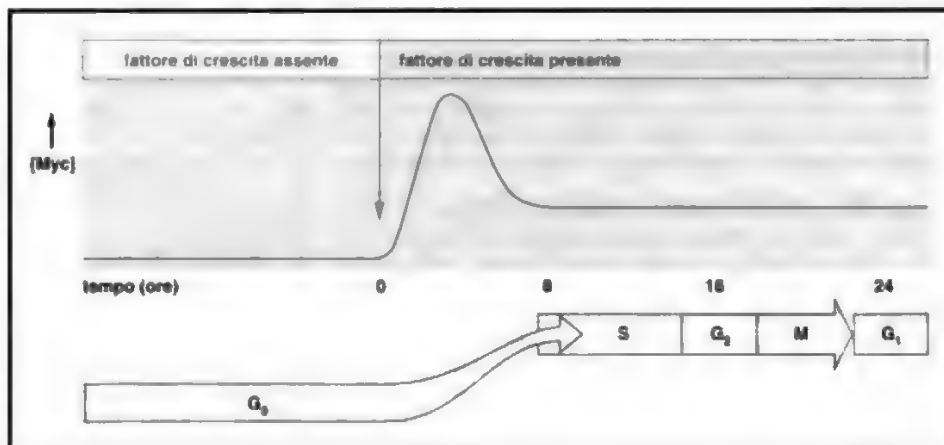
Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)

Il PDGF (Platelet Derived Growth Factor) è una glicoproteina, costituita da 2 subunità molto simili, ed è mitogeno per cellule mesenchimali (fibroblasti, cellule della muscolatura liscia e cellule gliali); un fibroblasto ha circa 10^5 recettori per PDGF. È stato uno dei primi f. di c. identificati, sulla base dell'osservazione che fibroblasti in coltura proliferano quando sono forniti di siero ma non quando sono forniti di plasma. Quando il sangue coagula, le piastrine vengono attivate e rilasciano il contenuto delle loro vescicole secretorie, che contiene vari fattori di crescita tra cui il PDGF. La sua presenza rende i fibroblasti competenti a rispondere ad altri f. di c., come EGF e IGF (v. sotto), presenti nel siero. Il PDGF rilasciato nel processo di coagulazione del sangue ha probabilmente un ruolo nella guarigione delle ferite, in particolare nella riparazione dei vasi sanguigni, perché può stimolare la migrazione e la proliferazione di cellule muscolari lisce nei vasi sanguigni danneggiati.

Fattore di crescita epidermico (EGF)

L'EGF (Epidermal Growth Factor) è stato scoperto, poco dopo l'NGF, per i suoi effetti sullo sviluppo del topo: è capace di causare l'eruzione degli incisivi e l'apertura precoce degli occhi in topolini neonati. È un peptide di soli 53 aminoacidi, il cui precursore, il pre-pro-EGF, è lungo 1200 aminoacidi e

Fig. 6. La risposta di Myc ad un f. di c. Myc è il prodotto del gene della risposta precoce *myc*. Il grafico mostra i cambiamenti della concentrazione della proteina Myc dopo un improvviso aumento della concentrazione del f. di c. ad un nuovo valore stabile, che fa uscire la cellula da G_0 e la fa proliferare. I cambiamenti nella concentrazione di Myc riflettono i cambiamenti nella trascrizione del gene *myc*, stimolati dall'esposizione della cellula al f. di c. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).



FATTORI DI CRESCITA

contiene parecchie sequenze EGF-simili. È un mitogeno, *in vitro*, per cellule dell'epidermide (ad es., le cellule basali) e per molti altri tipi cellulari; la sua azione è potenziata dal PDGF. Il suo ruolo *in vivo* non è ben chiaro. Agisce da segnale induttivo nello sviluppo embrionale. Come l'NGF, è presente in grandi quantità nella ghiandola sottomascellare, nei topi. Quantità elevate del recettore EGF (EGFR o erbB, una proteina di 1200 aminoacidi) si riscontrano in alcuni tumori umani. È nota una piccola famiglia di recettori simili all'EGFR (erbB 2-4), che sono coinvolti nella patogenesi tumorale (per es., di tumori al seno) e legano f. di c. chiamati *ereguline*.

Fattori di crescita fibroblastici (FGF)

Gli FGF (*Fibroblast Growth Factors*) costituiscono una famiglia con molti membri (9 noti finora). A livello embrionale, l'FGF ha un ruolo nell'induzione del mesoderma in embrioni di anfibi. Vari FGF sono espressi nel muscolo scheletrico. FGF1 e FGF2 agiscono *in vivo* in modo autocrino e paracrino, favorendo la proliferazione e bloccando il differenziamento terminale delle cellule miogeniche all'interno del somite, e sostenendo la migrazione dei mioblasti dal somite agli abbozzi dell'arto. Si ritiene che l'attenuazione del segnale FGF sia un prerequisito per il differenziamento terminale del muscolo. Il legame tra FGF ed eparina (o polisaccaridi simili) è importante per l'interazione col recettore. FGF1, espresso nel tessuto neuronale adulto, è anche un potente fattore neurotrofico.

Fattore di crescita epatocitico (HGF)

L'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) è una delle molecole responsabili dei fenomeni di rigenerazione conseguenti ad un danno al fegato ed ha verosimilmente un ruolo nell'omeostasi di quest'organo. Stimola gli epatociti a dividersi e la sua concentrazione in circolo aumenta molto in risposta ad un danno epatico. Agisce su vari altri tipi cellulari oltre agli epatociti. Viene anche chiamato «scatter factor» (*fattore di dispersione*) poiché ha un effetto sulla mobilità di cellule epiteliali facendo sì che queste si dissocino, disperdendosi. Questa azione sulla mobilità cellulare fa ritenere che l'HGF, o il suo recettore, possano contribuire alle metastasi tumorali.

Fattori di crescita insulinosimili (IGF) o somatomedine

Gli IGF (*Insulin-Like Growth Factors*) sono chiamati così per la loro forte somiglianza strutturale con l'insulina (la somiglianza con la proinsulina è ancora più forte). L'IGF I, che *in vitro* ha proprietà mitogeniche simili all'EGF, è lungo 70 aminoacidi, ha una omologia del 45% con l'insulina e si lega anche al recettore di quest'ultima. È capace di regolare la crescita delle cellule adipose. L'IGF I è chiamato anche somatomedina C perché stimola la crescita corporea ed è un intermediario dell'ormone della crescita; questo ormone controlla le dimensioni corporee in maniera indiretta, favorendo la comparsa nel plasma dell'IGF I e di altre somatomedine. L'IGF II è un peptide di 67 aminoacidi, la cui funzione *in vivo* non è nota; può anch'esso regolare la crescita corporea come è suggerito dall'osservazione che mutazioni nel gene portano a nanismo in topi (v. SOMATOMEDINE).

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

Il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) è coinvolto nella formazione di vasi sanguigni, processo nel quale si pensa intervengano anche altri f. di c. come EGF, FGF e PDGF. L'angiogenesi (v.**) ha luogo in molti processi fisiologici e patologici quali lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione di ferite e la crescita tumorale, dove la formazione di nuovi vasi sanguigni è necessaria perché il tumore possa espandersi oltre un certo volume. L'inattivazione del gene VEGF in topi causa anomalie embrionali nell'angiogenesi e

nella formazione delle isole del sangue; si osserva anche che cellule prive del gene VEGF hanno ridotta capacità tumorigenica. Il VEGF ha due recettori: Flt-1 e Flk-1. È coinvolto nella crescita di una varietà di tumori solidi quali tumori mammari, ovarici, carcinoma polmonare e glioblastoma.

Neurotrofine (fattori neurotrofici)

L'NGF (*Nerve Growth Factor*) è il prototipo di una piccola famiglia di f. di c. strettamente correlati, le *neurotrofine*, che comprende anche il BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), la neurotrofina-3 (NT3) e la neurotrofina 4/5 (NT4/5). I loro recettori sono composti da due molecole di-

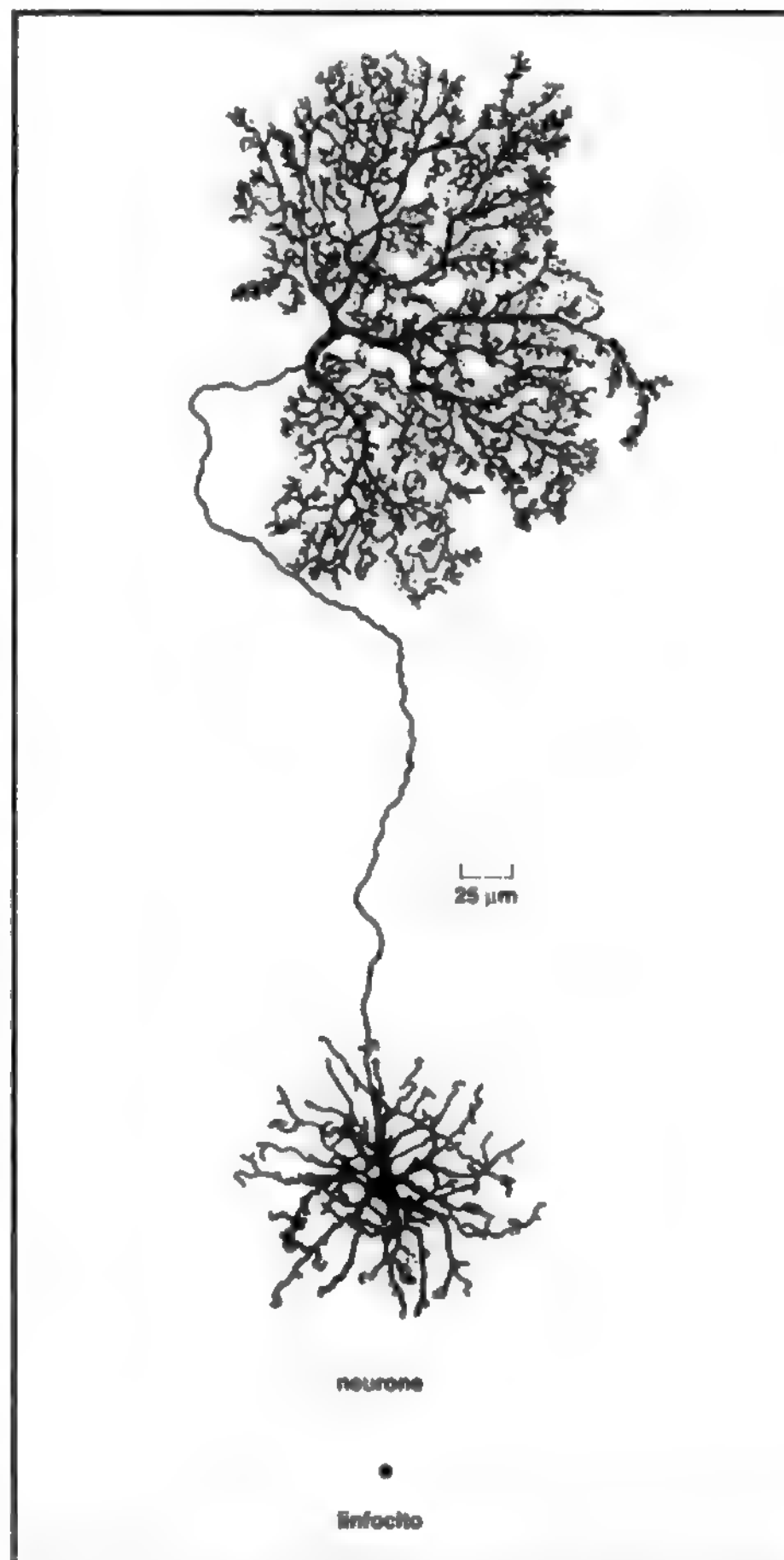


Fig. 7. I f. di c. (in particolare le neurotrofine) sono in grado di modulare la sopravvivenza dei neuroni e la plasticità sinaptica (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).

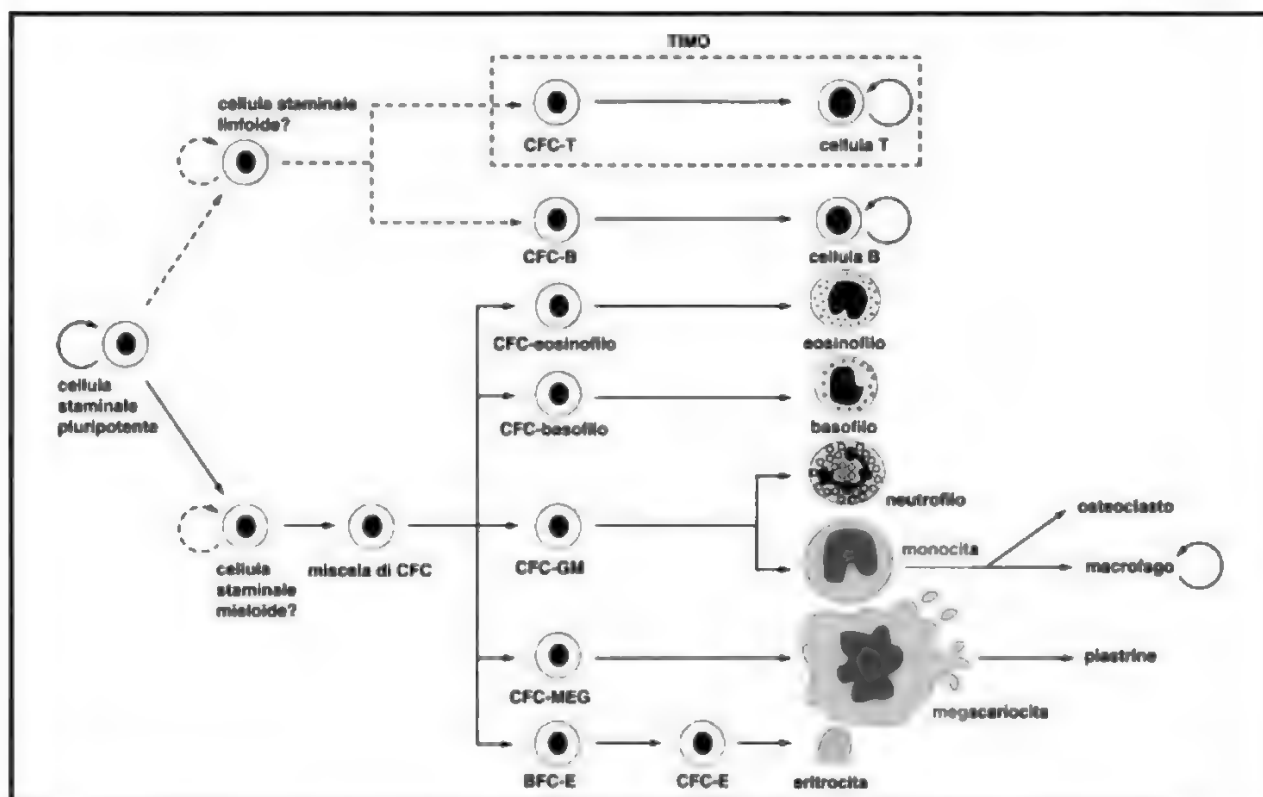


Fig. 8. Tentativo di schematizzazione dell'emopoiesi. La cellula staminale pluripotente di norma si divide non frequentemente allo scopo di produrre più cellule staminali pluripotenti (autorinnovamento) o progenitori predestinati (indicati come CFC = Colony-Forming Cells), che sono destinati in modo irreversibile a produrre uno solo o alcuni tipi di cellule ematiche. I progenitori vengono stimolati a proliferare da f. di c. specifici ma, progressivamente, perdono la loro capacità di divisione e diventano cellule ematiche differenziate in modo terminale, che di solito vivono solo alcuni giorni o settimane.

Nei mammiferi adulti tutte le cellule qui illustrate si sviluppano fondamentalmente nel midollo osseo, fatta eccezione per i linfociti T, che si sviluppano nel timo, e per i macrofagi e per gli osteoclasti, che si sviluppano a partire da monociti ematici. La parte più controversa dello schema è il punto in cui devono essere inseriti i precursori dei linfociti T e B. Le linee tratteggiate stanno a significare questa incertezza. Le cellule staminali pluripotenti danno anche origine a vari tipi di cellule che non vengono illustrate in questo schema, come le cellule NK, i mastociti e varie classi di cellule che presentano l'antigene; le vie lungo le quali queste cellule si sviluppano sono incerte. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland Publishing, New York).

stinte. Le neurotrofine permettono la sopravvivenza di insiemi distinti di neuroni del sistema nervoso centrale e periferico, sia durante lo sviluppo che nell'adulto (fig. 7). Durante lo sviluppo del sistema nervoso, molti neuroni muoiono subito dopo aver raggiunto il bersaglio. Studi con l'NGF hanno mostrato che le cellule bersaglio di particolari neuroni regolano la loro innervazione producendo quantità limitate di NGF di cui i neuroni che le innervano hanno bisogno per sopravvivere. L'aggiunta di NGF esogeno permette la sopravvivenza di neuroni che altrimenti morirebbero. Capacità simili hanno le altre neurotrofine, agendo su gruppi di neuroni diversi. La dipendenza dei neuroni dalle neurotrofine prodotte dalle cellule bersaglio ha una durata limitata nel corso dello sviluppo. La sopravvivenza neuronale nel sistema nervoso maturo è mantenuta dalle neurotrofine (BDNF e NGF) con meccanismo sia paracrino che autocrino. Oltre che agire sulla sopravvivenza, le neurotrofine regolano vari aspetti della funzione di neuroni della corteccia, come ad es. la plasticità sinaptica (v. NEUROPLASTICITÀ**), che sottende importanti funzioni psichiche, quali apprendimento e memoria. L'NGF agisce anche su cellule del sistema immune, in particolare i mastociti, di cui promuove il differenziamento e stimola il rilascio di sostanze contenute al loro interno (istamina, TNF ed altre), e una

popolazione di linfociti B coinvolti nello stabilirsi della memoria immunologica. Viene anche definito come un neuro-immuno-modulatore.

Citochine

Citochine (v.***) è il termine più generale per indicare mediatori locali per cellule del sistema emopoietico. Le citochine possono essere anche prodotte da cellule non ematiche e avere tra i loro bersagli anche cellule che non fanno parte del sistema emopoietico (in questo senso anche l'NGF si può considerare una citochina). I recettori per le citochine sono solitamente composti da due o tre subunità, una delle quali è condivisa da più recettori diversi.

Per la classificazione v. CITOCINE***; v. anche CHEMOCHINE**.

Interleuchine (linfocine)

Le interleuchine (v.*; v.***) sono citochine che mediano interazioni locali tra globuli bianchi; se secrete dai linfociti sono anche dette linfocine. Le molte interleuchine note (IL1-15, interferone γ) sono importanti nell'attivazione delle risposte immunitarie mediate da linfociti B e T e nelle reazioni infiammatorie.

FATTORI DI CRESCITA

Fattori di stimolazione di colonie (CSF, Colony-Stimulating Factors)

Il processo dell'emopoiesi, a partire da un piccolo numero di cellule capostipiti, è regolato da glicoproteine specifiche che controllano i vari stadi di maturazione, chiamate CSF (fattori di stimolazione delle colonie), termine derivato dai sistemi di colture cellulari utilizzati per studiarle (fig. 8). Alcuni di questi fattori circolano nel sangue e funzionano quindi come ormoni; altri agiscono da mediatori locali secreti, assimilabili a f. di c. I CSF hanno interesse pratico per colture di midollo. Il CSF più noto, l'eritropoietina (v.; v.*; v.**), è prodotta dal rene ed agisce da ormone: regola l'eritropoiesi promuovendo proliferazione, differenziamento e sopravvivenza dei precursori dei globuli rossi.

Fattori di crescita trasformanti (TGF, Transforming Growth Factors)

Alcune cellule tumorali producono molecole, chiamate f. di c. trasformanti (TGF), in grado di dare un fenotipo tumorale a cellule normali; questi fattori potrebbero dare una stimolazione autocrina alle cellule del tumore. Esistono due tipi di TGF, α e β , prodotti anche da cellule normali. Il TGF α è un piccolo peptide di 50 aminoacidi simile (con omologia del 40%) all'EGF, col quale condivide il recettore. Nei gliomi maligni, il TGF β è un fattore autocrino di crescita. Di solito è invece un fattore che inibisce la crescita (f. di c. negativo), attivo anche su cellule cancerose. Paradossalmente, questo «f. di c. trasformante» potrebbe essere usato per la cura del cancro. I TGF β (TGF β 1-5), insieme alle *attivine* (portatori di segnali induttivi dello sviluppo embrionale [v. ATTIVINA**]) ed alle BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*, fattori che favoriscono la formazione dell'osso), costituiscono una famiglia di proteine simili ad ampio bersaglio cellulare e dalle molteplici azioni. Possono sopprimere la proliferazione, stimolare la sintesi di matrice extracellulare, stimolare la formazione dell'osso ed attrarre le cellule per chemiotassi. Questi fattori sono secreti come complessi inattivi che vengono poi attivati per proteolisi. Durante lo sviluppo embrionale forniscono importanti segnali per la determinazione della simmetria destra-sinistra e per l'induzione del mesoderma. Fattori appartenenti a questa famiglia hanno un ruolo nella guarigione di ferite ed uno di essi è coinvolto in una forma di condrodysplasia. I loro recettori sono serina-treonina chinasi, le cui vie di segnalazione sono ancora poco conosciute.

Fattori della necrosi tumorale (TNF, Tumor Necrosis Factors)

Alla fine del secolo scorso un medico americano, W. Coley, si accorse della completa regressione di un tumore al collo di un suo paziente, in seguito a una grave infezione batterica della pelle. Questa osservazione fu la base di un trattamento del cancro con tossine batteriche (BCG e tossina di Coley) che ebbe anche un certo successo. Il principio attivo è una *endotossina*, un costituente tossico della parete batterica. Dopo molti anni ci si è accorti che l'effetto dell'endotossina è indiretto e che la regressione tumorale è causata da due fattori citotossici, il TNF e la *linfotossina*, prodotte nell'organismo trattato con la tossina batterica. La *linfotossina* (chiamata anche TNF- β) è prodotta dai linfociti T ed è omologa per il 30% al TNF (TNF- α). Quest'ultimo è prodotto nei macrofagi e nei mastociti; è identico alla *cachessina*, che inibisce gli enzimi dell'utilizzazione dei grassi ed è responsabile dell'aspetto emaciato che si ha in seguito a gravi infezioni.

Il TNF è rilasciato dai mastociti in risposta a IgE, antigeni o immunocomplessi. Mastociti e TNF sono una com-

ponente centrale nella difesa contro le infezioni batteriche. Il TNF rilasciato dai mastociti serve a reclutare leucociti circolanti con proprietà battericide ed in particolare ha un ruolo protettivo nella peritonite acuta batterica. Il TNF partecipa a risposte infiammatorie ed ha un ruolo nelle reazioni allergiche IgE dipendenti, incluso lo shock anafilattico. Diversamente da altri f. di c., che proteggono le cellule dall'apoptosi (v.**), il TNF è il capostipite di una famiglia di fattori che induce rapidamente morte cellulare. I meccanismi d'azione di questi segnali di morte sono oggetto di intensa ricerca.

V. anche: CANALI IONICI**; EMBRIOLOGIA, *biologia dello sviluppo* (v.*; v.**); INFIAMMAZIONE*; PROTEINE G**; SEGNALI CELLULARI**; TUMORI (v.*; v.**).

Bibliografia

- Alberts A. et al., *Molecular Biology of the Cell*, 3 ed., 1994, Garland, New York, London.
Bishop J. M., *Science*, 1987, **235**, 305-311.
Cross M., Dexter T., *Cell*, 1991, **64**, 271-280.
Davies A., Wright E., *Current Biology*, 1996, **5**, 723-726.
Egan S., Weinberg R. A., *Nature*, 1993, **365**, 781-783.
Feramisco J., Ozanne B., Stiles C., *Growth Factors and Transformation*, 1985, Cold Spring Harbor, New York.
Ferrara N. et al., *Nature*, 1996, **380**, 439-442.
Levi-Montalcini R., *Science*, 1985, **45**, 235-258.
Metcalf D., *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, 1984, American Elsevier, New York.
Taniguchi T., *Science*, 1996, **268**, 251-255.

SERGIO NASI

FEBBRE [v. vol. VI, coll. 916-931]

FEBBRE DI ORIGINE SCONOSCIUTA

SOMMARIO

Definizione e classificazione (col. 2176). - **Valutazione del paziente** (col. 2178): *Registrazione della curva termica*. - *Anamnesi*. - *Esame obiettivo*. - *Esami di laboratorio*. - *Altri esami diagnostici*. - **Cause più comuni** (col. 2182): *Infezioni sistemiche e locali*. - *Malattie infiammatorie non infettive*. - *Malattie neoplastiche*. - *Farmaci*. - **Cause meno comuni** (col. 2184). - **Cause della febbre di origine sconosciuta prolungata** (col. 2185). - **Orientamenti terapeutici** (col. 2185).

Definizione e classificazione

Una *febbre di origine sconosciuta* (FUO = *Fever of Unknown Origin* degli AA. anglosassoni) è per convenzione definita come un aumento della temperatura corporea di entità superiore a 38,3 °C (101 °F), rilevato in diverse misurazioni effettuate durante un periodo di almeno 3 settimane consecutive, e che rimanga privo di definizione diagnostica nonostante una valutazione completa del paziente in ambiente ospedaliero, per almeno una settimana.

Tale definizione è in gran parte sovrapponibile a quella proposta nel 1961 da Pedersdorf e Beeson al fine di poter confrontare, in base a criteri omogenei, i vari studi clinici concernenti pazienti con FUO. Si tratta pertanto di una definizione «operativa» tuttora ampiamente utilizzata che, specificando i tre criteri fondamentali per definire una FUO (entità, durata, origine oscura della febbre), permette di escludere da questa categoria numerose condizioni morbose e/o stati fisiologici.

In epoca più recente, tuttavia, il rapido sviluppo di metodiche di indagine sempre più sofisticate, la necessità di considerare anche fattori di ordine economico, l'emergenza di alcune patologie, quale l'infezione da HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), e l'aumento progressivo della percentuale di pazienti con FUO che restano «orfani» di diagnosi, hanno indotto Durack e Street (1991) alla proposta

di considerare 4 forme di FUO: 1) *FUO classica*; 2) *FUO nosocomiale*; 3) *FUO neutropenica*; 4) *FUO associata ad infezione da HIV*.

Inoltre, per porre diagnosi di FUO, sono attualmente considerati necessari e sufficienti 3 giorni di indagini complete ad esito negativo (che includano anche esami colturali con incubazione delle colture per almeno 2 giorni) effettuate in ambiente ospedaliero o nel corso di 3 visite ambulatoriali. Ciò premesso, va tenuto presente che la *FUO classica* corrisponde alla definizione originaria, ma il parametro «durata» è stato modificato. Infatti sono attualmente considerate sufficienti due settimane di febbre inspiegabile per formulare la diagnosi.

La diagnosi di *FUO nosocomiale* viene posta quando in un paziente ricoverato per eventi morbosi acuti, non febbrili, insorge febbre superiore a 38,3 °C. In questi pazienti è obbligatorio eseguire emocolture. Nel caso che lamentino diarrea, va ricercata la tossina del *Clostridium difficile* nelle feci.

Si formula diagnosi di *FUO neutropenica* quando una febbre superiore a 38,3 °C si manifesta in pazienti con neutrofili totali circolanti in numero inferiore a 500/mm³ o con neutropenia rapidamente ingravescente. Va ricordato che questi pazienti sono suscettibili ad infezioni focali da miceti (*Aspergillus*, *Candida*) e virus (CMV, *Herpes simplex*), a batteriemia ed a infezioni batteriche focali, compresa la tromboflebite settica. Le infezioni, se non adeguatamente e tempestivamente trattate, possono essere fatali in questo gruppo di pazienti.

La diagnosi di *FUO associata ad infezione da HIV* viene posta quando soggetti con infezione da HIV presentano FUO da almeno 4 settimane (se si tratta di pazienti ambulatoriali) o da almeno 3 giorni (se si tratta di pazienti ricoverati). L'infezione da HIV può indurre FUO, ma spesso sono in causa altri patogeni, fra i quali soprattutto: *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI), *M. tuberculosis*, *Toxoplasma*, CMV, *Pneumocystis Carinii*, *Salmonella*, *Cryptococco*, *Histoplasma*. In questo gruppo di pazienti la febbre

può, inoltre, essere manifestazione di linfoma non Hodgkin o di febbre iatrogena.

Viene definita *FUO prolungata* una febbre di origine ignota di durata superiore a 6 mesi. Questi pazienti non sono in genere affetti da malattie infettive ed hanno una prognosi favorevole.

È necessario ricordare che la febbre è un sintomo, non una malattia. Pertanto, qualsiasi tentativo di *classificazione «etiologica»* della febbre non può che essere rappresentato da un elenco di malattie interminabile e scarsamente utile. Nel caso della FUO, tuttavia, può essere utile un approccio «etiologico» in senso lato. È, infatti, possibile assumere che una FUO può riconoscere le seguenti cause generali: 1) *infezioni locali e sistemiche*; 2) *malattie neoplastiche*; 3) *malattie infiammatorie non infettive*; 4) *farmaci*; 5) *febbre fitizia*; 6) *miscellanea di cause meno comuni* (tab. I).

Valutazione del paziente

La valutazione del paziente con FUO è basata soprattutto su un'accurata e paziente raccolta dei dati anamnestici, su un esame obiettivo completo e su indagini di laboratorio (tab. II) e strumentali.

Registrazione della curva termica

Nei pazienti con FUO prima di tutto andrà effettuata la *registrazione della curva termica*, al fine di accertare l'effettiva presenza della febbre. Molti individui, infatti, presentano un esagerato ritmo circadiano della temperatura, o *ipertermia abituale*, senza essere affatto malati. Ipertermia abituale è spesso presente nei bambini di entrambi i sessi e nelle adolescenti. In genere una malattia febbrile autolimitantesi, spesso di natura virale, induce a frequenti misurazioni della temperatura corporea. Viene così rilevata una temperatura «anomala», soprattutto nelle prime ore della sera. Gli esami di laboratorio hanno peraltro esito negativo e la febbre non si associa ad altri sintomi (sudorazione, brividi, aumento della frequenza cardiaca...). Questa con-

TAB. I. CAUSE PIÙ COMUNI DI FUO CLASSICA

Adulto								
Autore	anno	n. casi studiati	infezioni	neoplasie	mal. infiammatorie non infettive	miscellanea	nessuna diagnosi	area geografica
Pedersdorf	1961	100	36%	19%	13%	25%	7%	Stati Uniti
Jacoby	1973	128	40%	20%	15%	17%	8%	Stati Uniti
Howard	1977	100	37%	31%	19%	8%	5%	Stati Uniti
Larson	1982	105	30%	31%	16%	10%	12%	Stati Uniti
Knockaert**	1992	199	22,5%	7%	21,5%	26,5%	22,5%	Nord Europa
Shoj**	1994	80	54%	9%	16%	4%	17%	Giappone
Bambino								
Autore	anno	n. casi studiati	infezioni	neoplasie	mal. infiammatorie non infettive	miscellanea	nessuna diagnosi	area geografica
Mc Clung	1972	99	29%	8%	11%	19%	32%	Stati Uniti
Pizzo	1975	100	52%	6%	20%	10%	12%	Stati Uniti
Lohr	1977	54	33%	13%	18%	15%	19%	Stati Uniti

** Le percentuali sono state ricalcolate, dato che gli AA. non hanno usato le stesse categorie etiologiche

dizione può essere individuata con misurazioni della temperatura ad orari precisi (ad es., alle 6 del mattino ed alle 18).

Mediante la registrazione della curva termica può essere, inoltre, esclusa la *febbre fittizia*, autoindotta mediante manipolazioni del termometro e/o inoculazione di materiale tossico o contaminato. Utili alla diagnosi di «malattia simulata» sono una storia professionale in ambiente sanitario, un'anamnesi complicata e tortuosa, l'assenza di perdita di peso, la registrazione di una curva termica che non segue il normale ritmo circadiano, il rilievo di temperature eccessive, rare negli adulti, l'assenza di alterazioni della frequenza cardiaca e respiratoria durante gli episodi febbrili, il rapido sfebbramento senza diaforesi, la negatività degli esami diagnostici e/o il ripetuto isolamento in coltura di patogeni multipli e/o inusuali. Nel sospetto di febbre fittizia, tutte le misurazioni della temperatura corporea debbono essere effettuate sotto costante sorveglianza del paziente. È utile inoltre la contemporanea misurazione della temperatura delle urine del soggetto.

Una febbre fittizia viene diagnosticata in circa il 9% dei casi di FUO prolungata. Formulare la corretta diagnosi è importante, perché questi pazienti, in genere giovani donne, presentano spesso gravi disturbi psichiatrici.

Per quanto riguarda la *curva termica*, va tenuto presente che il tipo di febbre (continua, remittente, intermittente...) ha in genere scarsa utilità diagnostica in caso di FUO. Fanno eccezione la malaria e la neutropenia ciclica. Infatti, in un paziente che presenti parossismi febbrili ben sincronizzati e/o una storia recente di viaggi in zone di endemia, può essere sospettata l'infezione malarica, anche se la conferma diagnostica necessita della dimostrazione della presenza dei parassiti nello striscio di sangue periferico.

Una febbre con periodismo di 21 giorni è suggestiva per la diagnosi di *neutropenia ciclica*. In questi pazienti vanno ricercate le lesioni ulcerative delle mucose, frequentemente presenti. Più raramente, la *febbre di Pel-Ebstein* (tipo di febbre caratterizzato da cicli di 3-10 giorni di periodi febbrili e afebbrili) aiuta a sospettare un linfoma di Hodgkin, che tuttavia esordisce più spesso con periodi febbrili non caratteristici associati a periodi afebbrili.

Anamnesi

L'*anamnesi* ha importanza cruciale nel paziente con FUO. Essa deve essere ampia ed accurata. Un primo elemento da valutare è l'*età* del paziente. Infatti, nei bambini di età inferiore a 6 anni, la causa più frequente di FUO è rappresentata da un'infezione. Nei pazienti di età compresa tra 6 e 14 anni spesso causa della FUO è una collagenopatia, una malattia infiammatoria dell'intestino o la malattia reumatica. Negli adolescenti e nei giovani adulti va sempre esclusa l'infezione da HIV. Nei soggetti anziani è frequente la polimialgia reumatica.

Un altro elemento da valutare è la *familiarità* della FUO. La presenza di FUO in altri membri della famiglia deve infatti indurre a sospettare l'esposizione ad un medesimo agente patogeno e/o una malattia ereditaria, quale ad es. la febbre familiare mediterranea.

L'*attività lavorativa* del paziente può fornire informazioni sulla possibile causa della FUO. Ad es., veterinari, macellai, addetti agli stabulari ed altro personale impegnato nella cura degli animali possono contrarre zoonosi. L'esposizione al berillio può indurre una malattia febbrile. È importante anche documentare i recenti *viaggi all'estero*, per stabilire la necessità di valutare la presenza di malattie infettive non comuni nel paese di abituale residenza del paziente. Una pregressa storia di *trasfusioni* deve far prospettare la possibilità di epatite virale, di infezione da HIV

o da CMV. Nel corso dell'anamnesi e dell'esame obiettivo va anche ricercata la presenza di *protesi e/o innesti*, che favoriscono infezioni occulte che possono manifestarsi come FUO. L'allettamento prolungato e/o interventi chirurgici recenti devono far pensare all'embolia polmonare.

Esame obiettivo

Nel corso dell'*esame obiettivo*, che deve essere molto accurato e ripetuto ad intervalli regolari, vanno soprattutto esaminati cute e mucose, linfonodi superficiali, letto ungueale, apparato cardiovascolare ed addome. Per quanto concerne i *linfonodi*, vanno esplorate anche le aree epitrocleari e la porzione mediale del braccio. Nel paziente con FUO, inoltre, va riservata attenzione particolare ai linfonodi della regione sopraclavare.

È molto importante effettuare un esame completo dell'*occhio*, anche in assenza di sintomi specifici. Una proptosi può essere infatti l'unico segno di un linfoma isolato dell'orbita, di una granulomatosi di Wegener con interessamento retroorbitale, di un neurofibroma o di un interessamento metastatico dell'orbita. Cheratopatia a banda può essere presente nel morbo di Still o nella sarcoidosi. Una cheratopatia puntata con sensazione di secchezza dell'occhio deve far pensare all'artrite reumatoide o ad altre malattie autoimmuni. Le ulcerazioni del *limbus* possono rappresentare il primo segno di una vasculite. Lesioni congiuntivali sono frequenti nel corso di numerose malattie infettive, soprattutto da virus e clamidie. Petecchie congiuntivali e retiniche sono un reperto frequente nel corso di endocardite batterica. Una uveite è presente in molte malattie sistemiche (lupus eritematoso sistemico, vasculiti, malattia da siero, sarcoidosi, toxoplasmosi, sifilide, tubercolosi, morbo di Still...). Un esame del fondo oculare può svelare tubercoli coroidali o segni di vasculite e/o endocardite.

Va ricordato che una *splenomegalia* si verifica più spesso nel corso di malattie neoplastiche (soprattutto linfomi) che infettive. Deve essere ispezionata attentamente la *regione ombelicale*, dal momento che le neoplasie addominali danno spesso metastasi precoci in questa regione, evidenziabili con la palpazione e suscettibili di biopsia in anestesia locale.

Nel paziente con FUO non va mai trascurata l'esplorazione rettale.

Va ricercata una eventuale dolorabilità sternale od ossea alla pressione, possibile indizio di osteomielite e/o malattie proliferative.

Nei soggetti di sesso maschile vanno esaminati attentamente testicoli e scroto (epididimite, neoplasie, tubercolosi, brucellosi, collagenopatie).

Esami di laboratorio

Per quanto concerne gli *esami di laboratorio*, nei pazienti con FUO vanno eseguiti tutti gli *esami di routine* (tab. II), che vanno eventualmente ripetuti ad intervalli regolari nel corso di una settimana. Gli esami da effettuare ripetutamente sono soprattutto gli *esami culturali* su sangue, urine e/o altri fluidi biologici, e la valutazione del titolo anticorpale per patogeni specifici. Va infatti tenuto presente che, nella maggior parte dei casi, l'origine della FUO è un'infezione occulta, e che pertanto gli esami culturali ripetuti (anche più di sei volte) spesso permettono la diagnosi etiologica. Nei bambini e negli adolescenti sono frequenti le infezioni silenziose delle vie urinarie. L'urinocoltura è inoltre molto importante per la diagnosi di tubercolosi, sia nei bambini che negli adulti.

Può essere necessario effettuare esami culturali di sputo, escreato, feci, liquor, e di biopsie (mai agoaspirato) di midollo osseo, fegato e linfonodi. Le colture vanno eseguite

TAB. II. ESAMI DI LABORATORIO DA EFFETTUARE NELLA FUO

a) Esami di «routine» (indispensabili)

esame emocromocitometrico completo
 conta piastrine
 esame diretto dello striscio di sangue periferico
 VES
 transaminasi, γ -GT, fosfatasi alcalina
 elettroforesi sieroproteica
 esame completo delle urine e del sedimento
 esame chimico, fisico e parassitologico delle feci
 ricerca sangue occulto nelle feci
 esami colturali (sangue, urina, feci, liquor, materiale biotico...)

b) Esami sierologici (solo in casi selezionati)

titolo anticorpale per infezione streptococcica, brucellosi, salmonellosi, psittacosi, toxoplasmosi
 titolo anticorpale per infezione da CMV, HIV, EBV
 VRDL, TPHA
 fattore reumatoide
 autoanticorpi

c) Esami istologici

per la ricerca di batteri aerobi ed anaerobi, micobatteri e funghi. Dato che alcuni patogeni hanno crescita lenta in coltura, come il gruppo HACEK (*Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Kingella Kingii*), funghi, clamidie e rickettsie, gli esami colturali devono avere una durata adeguata.

L'esame diretto dello striscio di sangue periferico è essenziale per la diagnosi di malaria, tripanosomiasi e febbre ricorrente.

Per la ricerca dei titoli anticorpali specifici è necessario congelare un'aliquota di ogni prelievo, sia per dimostrare un titolo anticorpale crescente nei confronti dei patogeni eventualmente isolati dalle colture, sia per poter ricercare una risposta anticorpale nei confronti di patogeni sospettati successivamente. Ad es., alcuni pazienti non hanno una reazione anticorpale rapida nei confronti delle spirochete.

I pazienti con FUO spesso hanno elevati livelli sierici di proteine di fase acuta (fibrinogeno, aptoglobina, ceruloplasmina, proteina C reattiva, alfa-2-globuline). Si tratta di manifestazioni aspecifiche associate alla febbre, come l'aumento della VES, la diminuzione di zinco e ferro nel siero e la neutrofilia periferica. In genere prendere in esame tali parametri è di scarsa utilità per il paziente con FUO. Tuttavia, un aumento notevole della VES deve far sospettare l'arterite temporale/polimialgia reumatica nell'anziano, oppure il morbo di Still nell'adulto.

La sierologia per le malattie autoimmuni e/o da ipersensibilità va effettuata solo se esiste un fondato sospetto diagnostico per una malattia specifica.

Altri esami diagnostici

L'utilità degli esami diagnostici non invasivi va valutata caso per caso. Alcuni esami radiologici vanno eseguiti in ogni caso (radiografia del torace, esame dell'alto addome, clisma opaco a doppio contrasto...). L'esame radiografico del torace andrebbe ripetuto, soprattutto se insorgono sintomi specifici, tenendo comunque presente che molte malattie polmonari possono non presentare alterazioni radiologiche (sarcoidosi, tubercolosi, micosi, pneumoconiosi...). Vanno, inoltre, esaminati con cura tutti gli esami radiologici ai quali il paziente si è in precedenza sottoposto. Gli esami ecografici sono molto utili per esplorare gli organi addominali, soprattutto il fegato. Inoltre questa metodica permette

lo studio dell'apparato cardiovascolare (diagnosi di valvulopatie, endocardite, mixoma atriale).

La scintigrafia con gallio è in grado di individuare le sedi di processi infiammatori e neoplastici, ma presenta una elevata frequenza di falsi negativi e falsi positivi ed una sensibilità variabile dal 35 al 75%. Il tecnezio si è dimostrato utile per la diagnosi precoce di osteomielite. Per ridurre la percentuale di falsi negativi, è consigliabile utilizzare la scintigrafia in associazione alla tomografia computerizzata e/o all'ecotomografia.

L'uso di granulociti marcati con indio permette l'individuazione delle infezioni focali, anche in soggetti con neutropenia. Purtroppo, dato l'alto rumore di fondo, questo esame non è utile per lesioni di fegato, rene e cuore. Per le lesioni a focolaio di altri organi, invece, la sensibilità può raggiungere il 95% e la specificità l'80%.

La tomografia computerizzata è insostituibile per esaminare la regione retrosternale e retroperitoneale. Non è peraltro superiore alla scintigrafia e/o all'ecografia per quanto concerne lo studio di milza, fegato, rene, surrene, pancreas, mediastino e pelvi.

La risonanza magnetica nucleare permette in genere una accurata diagnosi delle lesioni neurologiche causa di FUO, ma in caso di lesioni granulomatoze e di parassitosi del S.N.C. è preferibile lo studio mediante tomografia computerizzata, la quale permette inoltre di effettuare biopsie mirate dell'encefalo e del midollo spinale.

La linfangiografia è praticamente caduta in disuso dopo l'avvento della TC.

Gli esami diagnostici invasivi, tra i quali soprattutto la biopsia, sono spesso necessari nel paziente con FUO. La laparotomia esplorativa invece è caduta in disuso grazie alle moderne metodiche di diagnostica per immagini (ecografia, TC, RMN).

Cause più comuni

Come già accennato, una FUO riconosce le seguenti cause generali: 1) infezioni locali e sistemiche; 2) malattie infiammatorie non infettive; 3) malattie neoplastiche; 4) farmaci; 5) febbre fittizia; 6) miscellanea di cause meno comuni.

In questo capitolo saranno brevemente passate in rassegna le cause più frequenti della FUO «classica», rimandando alle singole voci dell'opera per la trattazione esauritiva.

Infezioni sistemiche e locali

Le infezioni rappresentano la causa più frequente di FUO ad ogni età, anche se la grande diffusione della terapia con antibiotici ad ampio spettro comporta l'eradicazione rapida di molti processi infettivi, a prescindere dalla loro natura.

La tubercolosi, tuttavia, resta una delle cause più frequenti di FUO. Inoltre la sua incidenza è attualmente in aumento (v. TUBERCOLOSI**), sia per l'associazione clinica con l'infezione da HIV, sia per lo sviluppo di ceppi di micobatteri resistenti alla chemioterapia antitubercolare classica, responsabili di manifestazioni extrapulmonari della malattia, quali la localizzazione splenica e/o epatica isolata.

L'endocardite batterica subacuta è un'altra importante causa di FUO. Pertanto ne andranno sempre ricercati attentamente i segni clinici. La conferma diagnostica deriva dall'ecocardiografia, che permette anche la diagnosi differenziale con il mixoma atriale. Al fine di isolare il patogeno responsabile sono indispensabili le emocolture, da eseguire dopo la sospensione di ogni terapia antibiotica, e da ripetere più volte in caso di esito negativo (anche fino a sei prelievi non consecutivi, con allestimento di colture della

durata di almeno due giorni). Nei rari casi in cui l'emocoltura, pur eseguita a regola d'arte, non permetta di identificare un patogeno (forme «abatteriemiche»), andrà comunque tentata la terapia antibiotica, considerata la prognosi infausta della malattia.

Le altre infezioni sistemiche sono raramente all'origine di una FUO, eccezion fatta per l'infezione da citomegalovirus (CMV) che spesso mima una mononucleosi. Sono più suscettibili all'infezione da CMV i pazienti che hanno ricevuto emotrasfusioni multiple o che siano stati sottoposti a trapianto d'organo. Infatti questa infezione è molto frequente nei pazienti che hanno ricevuto un trapianto di rene, con un picco di incidenza situato tra le 2 e le 20 settimane dopo il trapianto.

Le infezioni localizzate più spesso in causa nella FUO sono gli ascessi addominali (epatico, subfrenico, subepatico, pericolecistico), soprattutto in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico sull'addome nei 12 mesi precedenti la FUO. Gli ascessi epatici sono spesso insidiosi, non essendo associati ad epatomegalia, soprattutto nelle fasi iniziali. Spesso unico segno di un ascesso epatico isolato è l'aumento dei livelli sierici di fosfatasi alcalina. L'ecografia è molto utile per la diagnosi.

Le infezioni urinarie sono una frequente causa di FUO, soprattutto nei bambini e negli adolescenti. Gli ascessi perirenali sono inoltre di difficile diagnosi e spesso è necessario utilizzare ecografia, tomografia computerizzata ed angiografia. Una pielonefrite cronica può svilupparsi in assenza di piuria o con piuria intermittente.

Va tenuta presente la possibilità di sinusite cronica e di infezioni dentarie.

Malattie infiammatorie non infettive

Per quanto concerne le malattie infiammatorie non infettive, numerose collagenopatie e vasculiti possono esordire clinicamente con una FUO. Nel paziente anziano si deve considerare l'elevata incidenza di *polimialgia reumatica/arterite temporale*, patologia che esordisce con una FUO nel 15% dei casi. Una VES molto elevata, associata ad artralgie delle grandi articolazioni, a cefalea, a disturbi del visus ed a negatività degli altri test di laboratorio orienteranno la diagnosi. La conferma è fornita solo dalla biopsia dell'arteria temporale. La malattia, altrimenti invalidante, è sensibile alla terapia prolungata con basse dosi di corticosteroidi sistemici.

Nel giovane adulto, la FUO costituisce frequentemente l'esordio del *morbo di Still*. La febbre e l'astenia, inoltre, possono precedere di settimane o mesi le manifestazioni cliniche più caratteristiche dell'*artrite reumatoide*, sia nel bambino che nell'adulto. In alcuni di questi pazienti a volte compare una fugace eruzione maculo-papulare del tronco, di color salmone.

A volte una sinusite o una mastoidite con febbre rappresentano il primo segno di una *granulomatosi di Wegener*. Anche il *lupus eritematoso sistemico* ed altre connettiviti e vasculiti vanno prese in considerazione nella valutazione del paziente affetto da FUO.

Le malattie granulomatose che possono manifestarsi con FUO includono la *sarcoidosi*, l'*epatite granulomatosi idiopatica* e la «peritonite da amido». Nel caso dei granulomi epatici non caseosi, dopo aver escluso altre malattie granulomatose specifiche (ad es. tubercolosi, brucellosi, istoplasmosi), può essere utile tentare un breve ciclo di terapia steroidea. Va ricordata la possibilità di *peritonite da amido* («starch peritonitis» degli AA anglosassoni), granulomatosi con febbre che insorge dopo interventi chirurgici sull'addome, a causa della reazione infiammatoria alla polvere d'amido di cui sono cosparsi i guanti chirurgici.

Malattie neoplastiche

Tra le malattie neoplastiche che più comunemente si associano a FUO, vanno tenuti presenti i linfomi, soprattutto il *linfoma di Hodgkin* a localizzazione retroperitoneale. La caratteristica febbre di Pel-Ebstein (v. sopra) è tuttavia piuttosto rara. Occasionalmente una *sindrome preleucemica* può presentarsi con febbre ed alterazioni ematologiche atipiche. Questi pazienti vanno tenuti in osservazione per qualche mese. L'insorgenza di febbre in pazienti affetti da *mieloma multiplo* o da *leucemia linfatica cronica* deve indurre in prima istanza alla ricerca di infezioni sovrainposte.

Tra le neoplasie solide, l'*ipernefroma*, carcinoma a cellule renali la cui struttura ricorda quella del surrene, può associarsi a febbre anche elevata, e l'insorgenza di febbre in un paziente operato a causa di questa neoplasia deve far sospettare recidive locali o metastasi.

Il *feocromocitoma* può esordire come FUO anche anni prima che la neoplasia venga individuata.

Il *carcinoma del colon-retto* induce febbre in più del 10% dei pazienti, sia a causa di necrosi che di ascessualizzazione della neoplasia.

Va ricordato che la febbre «neoplastica», al contrario delle infezioni, risponde spesso alla terapia con antinfiammatori non steroidei.

Farmaci

Una febbre iatrogena non è sempre associata ad altre manifestazioni di ipersensibilità. Infatti solo nel 20% dei casi si rilevano eosinofilia periferica e/o rash cutaneo, ed è molto rara l'associazione con bradicardia e/o ipotensione. In linea di principio qualsiasi farmaco può indurre febbre nel singolo caso. I farmaci più spesso in causa, tuttavia, sono antibiotici e chemioterapici (beta-lattamine, sulfamidici, nitrofurantoina, isoniazide), antipertensivi (idralazina, metildopa, nifedipina), antiepilettici (fenitoina), chinidina, allopurinolo.

In genere la febbre si manifesta entro le prime 3 settimane di terapia e recede entro 2-3 giorni dalla sospensione del farmaco responsabile. Alcune molecole, tuttavia, tra le quali soprattutto fenitoina, metildopa ed isoniazide, possono indurre FUO anche dopo settimane o mesi di terapia. Pertanto la possibilità di FUO da farmaci va presa in considerazione anche in caso di FUO prolungata. Alcuni farmaci (penicillina, sulfamidici, isoniazide, propiltiouracile) possono indurre vasculite da ipersensibilità che si manifesta clinicamente come FUO.

La somministrazione per via intramuscolare di analgesici e vaccini può provocare FUO, anche in assenza di evidenti manifestazioni locali, come un ascesso sterile.

Cause meno comuni

Tra le cause meno comuni di FUO vanno ricordate alcune malattie ereditarie, come la *febbre familiare mediterranea (FMF)*, che va sospettata nei casi in cui una febbre intermittente inspiegabile inizia a manifestarsi fin dall'infanzia. La febbre a volte si associa a dolore toracico e/o addominale, dovuto all'infiammazione della sierosa pleurica e/o peritoneale, ad edema e/o eritema cutaneo doloroso, ad artralgie e cefalea. A volte è presente amiloidosi. Gli accessi febbrili hanno frequenza molto variabile nel singolo paziente, da due crisi alla settimana fino ad intervalli liberi della durata di anni. I test di laboratorio effettuati durante i periodi febbrili hanno esito negativo, se si eccettuano alcune alterazioni aspecifiche (leucocitosi, aumento della VES e dei livelli sierici delle proteine di fase acuta). Sebbene la FMF sia più frequente negli ebrei sefarditi, negli armeni e negli arabi, anche gli europei occidentali possono esserne affetti. La colchicina si è dimostrata utile per la profilassi delle crisi febbrili.

Un'altra causa poco comune di FUO è la *malattia di Fabry* (angiocheratoma diffuso), neuropatia periferica ereditaria legata al sesso, nella quale si ha accumulo di triossilceramide a causa del deficit di α -galattosidasi A. La malattia viene sospettata sulla base delle manifestazioni cutanee (anidrosi ed angiocheratoma del tronco, del perineo, delle natiche) ed oculari (opacità corneali). La conferma diagnostica è data dalla dimostrazione del deficit enzimatico nelle urine, nel plasma e nei leucociti del paziente.

L'*ipertrigliceridemia* si associa spesso a febbre ricorrente e dolore addominale. In questi casi una dieta appropriata risolve la febbre ed il dolore. In particolare, è l'*iperlipidemia* di tipo V a dare FUO associata a dolore addominale e pancreatite ricorrente.

La *sindrome sordità, orticaria ed amiloidosi* è una malattia familiare ereditaria associata ad episodi febbrili ed orticaria non pruriginosa. Una sordità progressiva è in genere evidente fin dalla prima infanzia, mentre gli episodi febbrili iniziano nell'adolescenza. In seguito si sviluppano amiloidosi ed insufficienza renale.

Le rarissime patologie del sistema nervoso centrale che coinvolgono il centro termoregolatore dell'ipotalamo possono essere causa di *febbre centrale*. Tali processi (neoplasie primitive o secondarie, emorragie, malattie degenerative, vascolari, metaboliche, ed infettive) inducono più spesso turbe endocrine ed ipotermia; i bambini, tuttavia, possono sviluppare ipertermia più spesso dell'adulto nel corso di queste condizioni morbose.

Una *FUO post-operatoria* può essere dovuta ad *ipersensibilità all'atotano* o a *microembolia polmonare*, che può svilupparsi in assenza di segni radiologici.

Molti pazienti che hanno subito *interventi chirurgici cardiovascolari* manifestano FUO. Circa il 6% di questi pazienti è affetto da *sindrome postpericardiotomica*, ma possono essere in causa anche infezione da CMV, riacutizzazione di una febbre reumatica pre-esistente, o emopericardio. Anche dopo *interventi di neurochirurgia* può comparire febbre, in genere dovuta ad emorragia del III ventricolo o a meningite asettica.

La *tromboflebite settica pelvica* può manifestarsi con FUO isolata, così come la *cirrosi alcolica*.

Una rara causa di FUO è la *sindrome di Schnitzler*, della quale sono stati descritti finora solo 28 casi. La sindrome, individuata nel 1974, è caratterizzata da orticaria cronica, febbre, dolore osseo, iperostosi, aumento della VES e macroglobulinemia.

Infine, rarissima causa di FUO è la *malacoplachia*, malattia infiammatoria che interessa più spesso le vie urinarie, dove è associata ad infezione da bacilli coliformi.

Cause della febbre di origine sconosciuta prolungata

Per quanto concerne le cause della *FUO prolungata*, della quale si è già fatto cenno (v. sopra), va tenuto presente che la probabilità di una malattia infettiva decresce in genere in proporzione alla durata della febbre. Infatti, il 9% circa dei pazienti con FUO prolungata ha una *febbre fittizia*, l'8% un'*epatite granulomatosa idiopatica* non associata a deficit funzionali, ed il 6% è affetto da *morbo di Still dell'adulto*.

Sebbene nel 19% dei casi l'origine della febbre resti ignota, la maggior parte dei pazienti con FUO prolungata hanno una prognosi favorevole.

Orientamenti terapeutici

In linea di principio, la terapia ottimale della FUO è rappresentata dal trattamento adeguato della malattia che ne è la causa. Pertanto, se possibile, il paziente con FUO non va sottoposto a terapia in assenza di una diagnosi precisa, obiettivo da perseguire con ogni mezzo disponibile, incluse

le metodiche biotiche, alle quali si deve fare ricorso senza esitazioni qualora esista una fondata ipotesi diagnostica.

Una terapia empirica della febbre non è giustificata nella maggior parte dei casi di FUO e potrebbe inoltre condurre ad errori e/o ritardi nella diagnosi. Valga come esempio la febbre di origine neoplastica che, a differenza di quella da infezioni, in genere risponde alla terapia con antinfiammatori non steroidei.

La terapia di supporto, che va attuata solo nei pazienti con scadute condizioni generali, deve essere condotta con cautela. La febbre cronica, infatti, induce accelerato catabolismo proteico, che può essere in parte contrastato dagli inibitori della ciclossigenasi. In ogni singolo caso deve essere valutato il rapporto costo/beneficio della terapia. In ogni caso, vanno considerati farmaci di prima scelta gli antipiretici (ac. acetilsalicilico e paracetamolo), da somministrare a pieno dosaggio e per periodi prolungati. Se tali molecole si dimostrano inefficaci, si può ricorrere in seconda istanza ad indometacina o ibuprofene. Solo se anche questo tentativo terapeutico fallisce, e dopo aver escluso un processo infettivo, si farà ricorso ai corticosteroidi sistemici (ad es. prednisone, 10 mg ogni 6 ore), la cui posologia va ridotta non appena raggiunto l'effetto terapeutico atteso.

La terapia steroidea è giustificata anche nel caso di sospetta polimialgia reumatica. La rapida e spettacolare risposta di questi pazienti a basse dosi di steroidi può confermare indirettamente la diagnosi di arterite temporale qualora non sia possibile effettuare l'esame biotico.

Una terapia empirica è giustificata e razionale anche nei casi in cui vi siano fondati sospetti clinici e/o la terapia abbia importanza cruciale. Ad es., se si sospetta un'endocardite è utile tentare una terapia breve (1-2 settimane) con penicillina ed aminoglicosidi. Analogamente, l'aspirina è indicata nel sospetto di morbo di Still; i pazienti con tubercolosi disseminata traggono giovamento da un breve ciclo di chemioterapia specifica. Gli anticoagulanti vanno utilizzati nel sospetto di malattia tromboembolica. Infine, nel caso della FUO iatrogena, può essere considerata un tentativo terapeutico la sospensione di qualsiasi terapia farmacologica.

Bibliografia

- Aduan R. et al., *Ann. Int. Med.*, 1979, **90**, 230.
 Dinarello C. A., Wolff S. M., *Fever of unknown origin*, in *Principles and Practice of infectious diseases*, 1990, Churchill-Livingstone, New York.
 Durack D. I., Street A. C., *Fever of unknown origin - reexamined and redefined*, in Remington J. S., Swartz M. N. eds., *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, 1991, Blackwell, Oxford.
 Gelfand J. A., Wolff S. M., *Fever of unknown origin*, in Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R., *Infectious Disease*, 1995, Churchill Livingstone, New York.
 Howard P. Jr. et al., *Tex. Med.*, 1977, **73**, 56.
 Jacoby G. A. et al., *New Engl. J. Med.*, 1973, **289**, 1407.
 Knockaert D. C. et al., *Arch. Int. Med.*, 1992, **152**, 52.
 Larson E. B. et al., *Medicine*, 1982, **611**, 269.
 Lohr J. A. et al., *Clin. Pediatr.*, 1977, **16**, 768.
 McClung H. J., *Am. J. Dis. Child.*, 1972, **124**, 544.
 Pedersdorf R. G., Beeson P. B., *Medicine*, 1961, **40**, 1.
 Pizzo P. A. et al., *Pediatrics*, 1975, **55**, 486.
 Shoj S. et al., *Int. Med.*, 1994, **33**, 74.
 Swartz M. N., *Fever of undetermined origin*, in *Scientific American Medicine Pocket Manual*, 1993, Scientific American, New York.
 Tripodi F., *Febbricola*, in Vella I., ed., *Enciclopedia Medica Italiana*, 1978, vol. VI, col. 979, USES, Firenze.

La ricerca bibliografica su CD-Rom è opera della Dott.ssa Sebastiani e del Dr. Silvestri (C.N.R. di Roma, Biblioteca Centrale), ai quali vanno i più vivi ringraziamenti dell'Autore.

MARGHERITA TOMASSINI

FECONDAZIONE ARTIFICIALE: V. FECONDAZIONE ARTIFICIALE (VI, coll. 1058-1064); FECONDAZIONE ARTIFICIALE* (coll. *2998-3033); FECONDAZIONE ASSISTITA** (**2187-2204).

FECONDAZIONE ASSISTITA [v. FECONDAZIONE ARTIFICIALE*, coll. *2998-3033]

Sin.: fecondazione artificiale; riproduzione assistita. - *l. assisted fecundation; artificial fertilization; artificial insemination.*

SOMMARIO

DEFINIZIONE E PREMESSA	col. 2188
INDUZIONE DELLA CRESCITA FOLLICOLARE MULTIPLA	col. 2189
DEFINIZIONE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE	col. 2191
INSEMINAZIONE INTRAONIUGALE (AIH)	col. 2191
Introduzione (col. 2191). - Preparazione del seme (col. 2191). - Tecniche di inseminazione (col. 2192). - Inseminazione intracervicale (ICI). - Inseminazione intrauterina (IUI). - Inseminazione intraperitoneale (IPI o DIP). - Inseminazione intratubarica (ITI). - Durata del trattamento (col. 2193).	
INSEMINAZIONE EXTRAONIUGALE (AID)	col. 2195
Introduzione (col. 2195). - Indicazioni (col. 2195). - Le banche del seme (col. 2196). - Tecniche di inseminazione e risultati (col. 2196).	
FECONDAZIONE IN VITRO CON TRASFERIMENTO DI EMBRIONI IN UTERO (FIV/ET)	col. 2197
Introduzione (col. 2197). - Le tappe delle tecniche di fecondazione in vitro (col. 2198): Selezione delle coppie. - Induzione della crescita follicolare multipla e induzione della maturazione ovocitaria. - Il prelievo degli ovociti. - La fecondazione in vitro e la ICSI. - Trasferimento degli embrioni in utero (col. 2201). - Tecniche di fecondazione in vitro in caso menopausa: l'ovodonazione (col. 2201). - GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer) (col. 2201). - Tecniche di biopsia embrionaria e diagnosi prenatale preimpianto (col. 2202). - Risultati della FIV/ET e della ICSI (col. 2202).	

DEFINIZIONE E PREMESSA

Con il termine *fecondazione assistita* [f.a.], che ha sostituito in questi ultimi anni quello di *fecondazione artificiale* [v.*], vengono indicate le tecniche che prevedono un qualunque grado di manipolazione dei gameti, al fine di risolvere una condizione di sterilità (v.; v.*; v.**).

Tali metodiche vengono anche indicate come tecnologie di riproduzione assistita (ART [Assisted Reproductive Technologies]), le quali possono essere schematicamente suddivise (fig. 1) in *metodiche a bassa tecnologia*, vale a dire le tecniche di «inseminazione artificiale», e *metodiche ad alta tecnologia*, vale a dire le tecniche che prevedono la fecondazione extracorporea, la FIVET (Fecondation In vitro/Embryo Transfer) appunto (fertilizzazione in vitro e trasferimento dell'embrione in utero) e le tecniche ad essa correlate come le procedure di ovodonazione (nei casi di menopausa), le metodiche di congelamento degli embrioni sovrannumerari e loro trasferimento differito in utero, le tecniche di micromanipolazione dei gameti (la ICSI: Intra Cytoplasmic Semen Injection; iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo) e degli embrioni (*hatching*: apertura della zona pellucida per favorire l'impianto; biopsia embrionaria: asportazione di una o due cellule dall'embrione, per la diagnosi genetica prima del reimpianto in utero dell'embrione stesso: cosiddetta diagnosi genetica prenatale preimpianto; v. PRENATALE DIAGNOSI*).

La messa a punto delle tecniche di fecondazione extracorporea e la possibilità di ottenere embrioni umani *in vitro*, rappresentano un evento rivoluzionario non solo nelle modalità di trattamento di condizioni di sterilità ritenute in precedenza irreversibili, ma anche nei riguardi della filosofia di approccio alla coppia con problemi riproduttivi. La

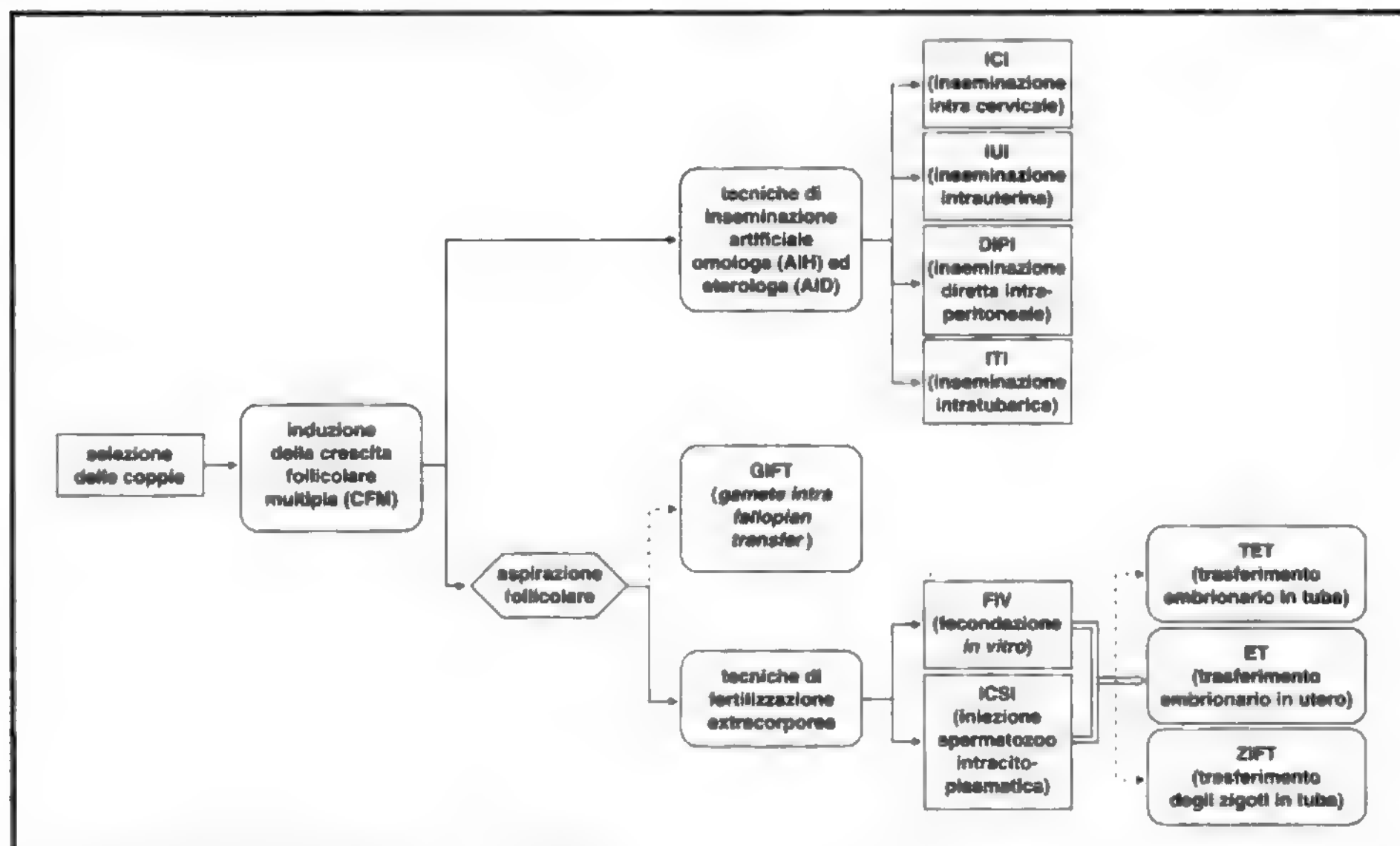


Fig. 1. Schema delle diverse tecniche di f.a.

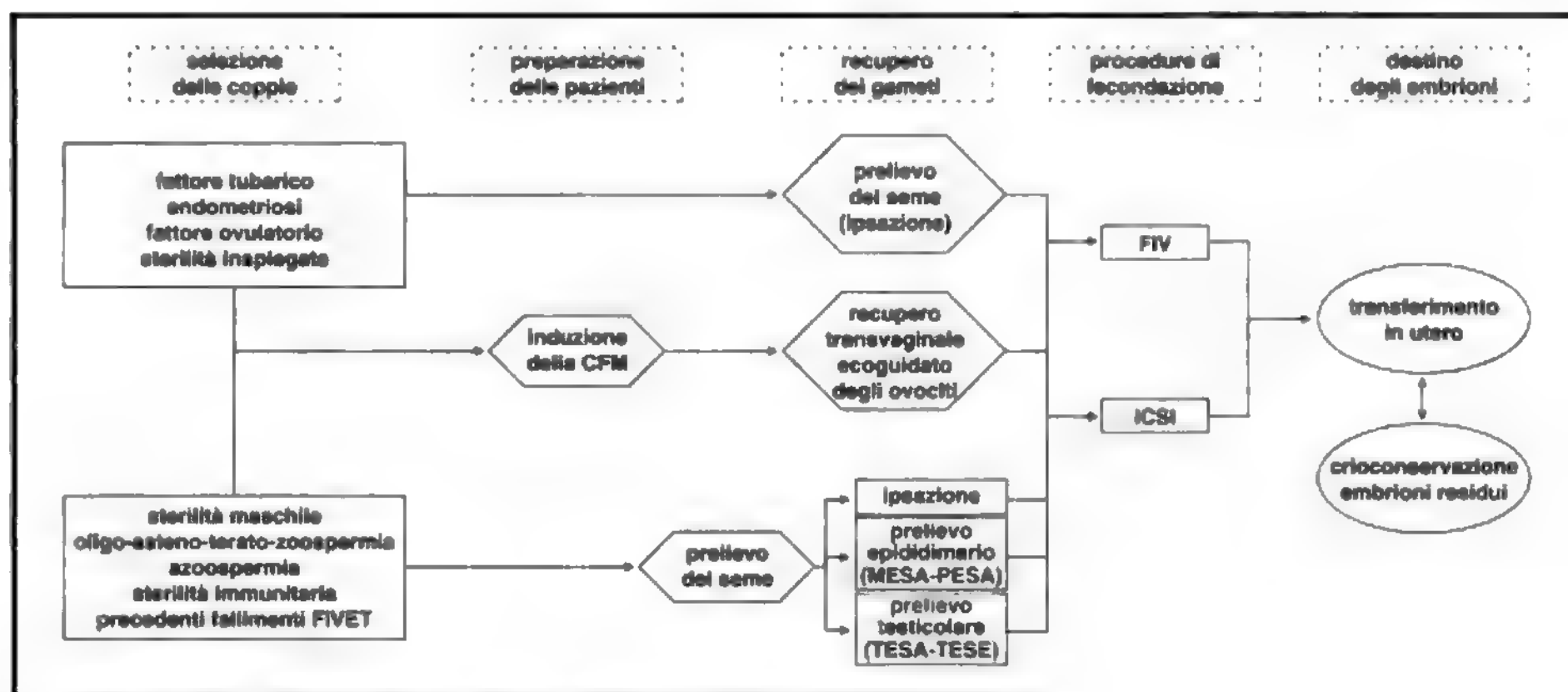


Fig. 2. Schemi di trattamento della sterilità maschile e femminile mediante f.a.

rapida diffusione di tali tecniche sempre più sofisticate di manipolazione dei gameti, ha un impatto notevole nella cultura occidentale e non solo medica. D'altra parte l'epidemiologia della sterilità umana negli ultimi trenta anni ha cambiato volto e le condizioni oggettive di una difficoltà riproduttiva richiedono, oggi più di ieri, un intervento «profondo» ed in tempi relativamente ristretti. In fig. 2 sono riportati gli schemi di trattamento della sterilità maschile e femminile mediante f.a.

Queste tecnologie, soprattutto quelle ancora in fase iniziale di applicazione clinica che prevedono la micromanipolazione dei gameti, comportano dunque implicazioni di ordine etico che richiedono una lucida valutazione degli obiettivi che si vogliono raggiungere.

INDUZIONE DELLA CRESCITA FOLLICOLARE MULTIPLA

I risultati dell'applicazione clinica delle tecniche di riproduzione assistita dimostrano univocamente che l'induzione della crescita follicolare multipla (CFM) costituisce una tappa fondamentale di tutte queste tecniche. Va sottolineato comunque che, pur condividendo gli stessi farmaci, gli stessi protocolli (tab. I) e le stesse finalità (ovvero incrementare i livelli plasmatici delle gonadotropine per sovraimporre al processo di selezione fisiologica di un singolo follicolo dominante una selezione e maturazione follicolare multipla), le strategie di induzione della CFM per le tecniche di inseminazione artificiale e per quelle di fecondazione extracorporea presentano alcune differenze.

Difatti mentre nelle tecniche di inseminazione artificiale si cerca di ottenere lo sviluppo di non più di 3-5 follicoli (per evitare il rischio di gravidanze multiple), nelle tecniche di fecondazione *in vitro* si cerca di ottenere una risposta maggiore in termini di follicoli sviluppati e quindi di ovociti a disposizione per il trattamento *in vitro*: il rischio di gravidanze multiple viene ridotto limitando il numero di embrioni trasferiti in utero.

Inoltre l'esistenza di un'ampia variabilità biologica, fra soggetti anche normovulatori, nel rispondere ad un identico stimolo esogeno, non consente la individuazione di trattamenti standardizzati ma costringe ad una personalizzazione

del trattamento e ad un attento monitoraggio ecografico e, soprattutto nei casi di fecondazioni extracorporee, biochimico, della risposta individuale alla stimolazione ormonale, per controllare la crescita e la maturazione follicolare e per evitare i rischi della *sindrome da iperstimolazione ovarica* (v. OVARICA IPERSTIMOLAZIONE, SINDROME DA**), la complicazione più temibile dell'induzione della CFM, che nei rari casi più gravi (dimensioni ovariche superiori a 12 cm, comparsa di ascite, idrotorace, ipovolemia, emocoagulazione, oliguria, turbe dell'equilibrio elettrolitico e turbe della coagulazione) può richiedere il ricovero in unità di terapia intensiva.

In generale possiamo affermare che oggi il trattamento con analoghi del GnRH e gonadotropine (FSH), con le modalità del «protocollo lungo» che prevede la desensibilizzazione ipofisaria con analoghi del GnRH a partire dal ciclo precedente l'inizio della somministrazione delle gonadotropine, è quello di scelta per qualunque tipo di fecondazione extracorporea, per l'ottimo controllo della crescita follicolare che permette il maggior numero di follicoli ed ovociti maturi ottenuti. Invece i protocolli che prevedono l'uso delle gonadotropine da sole o in associazione al clomifene citrato sono di solito quelli utilizzati per le metodiche di inseminazione artificiale. In tutti i casi la fase di induzione dell'ovulazione e maturazione degli ovociti viene comunemente ottenuta mediante la somministrazione di hCG (*human Chorionic Gonadotropin*).

Qualunque strategia si adoperi, gli obiettivi della induzione della CFM sono:

1) la maturazione di follicoli multipli, morfologicamente e funzionalmente adeguati:

TAB. I. PROTOCOLLI PER L'INDUZIONE DELLA CFM

Clomifene citrato
Clomifene citrato + FSH (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>)
FSH
GnRH (<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>) + FSH (protocollo lungo)
GnRH + FSH (protocollo corto)

FECONDAZIONE ASSISTITA

2) il recupero per via ecografica transvaginale di multipli ovociti preovulatori di «buona qualità»;

3) la sincronizzazione dello stadio di maturazione endometriale e della crescita embrionaria.

Per le difficoltà di controllo del ciclo di induzione e per la esiguità dei risultati, il citrato di clomifene da solo ed il GnRH pulsatile non sono più impiegati.

Le gravidanze multifetali dopo trattamento per l'induzione dell'ovulazione sono svolte nella VOCE GRAVIDANZA**.

DEFINIZIONE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

Per *inseminazione artificiale* si intende una complessa serie di metodiche attraverso le quali il seme maschile viene depositato in differenti tratti dell'apparato genitale femminile allo scopo di agevolare il concepimento.

Quando il seme appartiene al marito, l'inseminazione è definita intraconiugale (AIH, *Artificial Insemination with Husband's Semen*), quando viene usato il seme di donatore è definita extraconiugale (AID, *Artificial Insemination with Donor's Semen*).

Il testo che segue aggiorna quello dell'Agg. I (v. FECONDAZIONE ARTIFICIALE*, coll. *2998-3005) cui si rinvia per ulteriori informazioni.

INSEMINAZIONE INTRACONIUGALE (AIH)

Introduzione

Le indicazioni all'inseminazione intraconiugale sono molteplici, sia per cause maschili che per cause femminili. Nell'uomo esse comprendono i difetti anatomici del pene, che rendono difficile o inattuabile il rapporto vaginale, i difetti qualitativi e quantitativi dello sperma, isolati o associati, quali oligozoospermia e astenozoospermia; un ridotto volume di liquido seminale (inferiore a 1 ml); l'elevata viscosità refrattaria ai mucolitici; l'eiaculazione retrograda in vescica; l'impotenza farmaco-dipendente o neurogena.

Nella donna, l'indicazione più frequente è rappresentata dal deficit quantitativo e qualitativo del muco cervicale che normalmente rappresenta per gli spermatozoi una via di comunicazione fra vagina e cavità uterina. La carenza del muco può essere dovuta ad una riduzione delle ghiandole mucosecarnenti nella cervice, per esempio dopo l'intervento di diatermocoagulazione o conizzazione, mentre «l'ostilità» del muco che si manifesta con ripetuti PCT (*Post Coital Test*) poveri, può essere causata da infezioni batteriche o da altri microrganismi, che alterano il pH e le altre proprietà chimico-fisiche del muco, ostacolando la progressione degli spermatozoi.

Se il muco è assente, o non segue le fisiologiche modificazioni correlate all'ovulazione, volume, contenuto proteico e viscosità, le possibilità di concepimento diminuiscono.

L'inseminazione artificiale è stata anche impiegata empiricamente nelle coppie con sterilità inspiegata, che rappresentano il 15% circa delle coppie infertili. In realtà grazie al miglioramento delle tecniche diagnostiche in campo endocrinologico, e all'aumentata esperienza dell'indagine laparoscopica, buona parte di queste pazienti, la cui fertilità era definita «inspiegata», è ora appropriatamente riclassificata.

Preparazione del seme

La metodica più semplice per il prelievo del seme è l'*ipsazione*, con la raccolta del campione direttamente in un contenitore sterile monouso, tenuto a temperatura ambiente. Nei casi di eiaculazione retrograda la tecnica è più complessa e prevede il cateterismo vescicale, dopo svuotamento e lavaggio della vescica con soluzione di Ringer.

La preparazione dello sperma prima dell'inseminazione ha principalmente lo scopo di:

1) eliminare il plasma seminale dal campione;

2) aumentare la concentrazione degli spermatozoi;

3) selezionare la frazione di spermatozoi migliori in relazione al tipo di mobilità ed alla morfologia.

Diverse metodiche di preparazione del seme sono state utilizzate, con vari risultati; le più diffuse sono lo *swim up* da *pellet* e la centrifugazione su gradienti di Percoll.

Tecniche di inseminazione

Inseminazione intracervicale (ICI)

Consiste nell'introdurre mediante una cannula sottile o il dispositivo di Makler, non più di 0,5 ml di liquido seminale nel canale cervicale. Il resto dello sperma può essere raccolto in un cappuccio cervicale, che viene applicato al collo uterino, e rimosso dopo 6-8 ore dalla paziente stessa. Generalmente l'eiaculato viene utilizzato senza particolari manipolazioni, tranne che nei casi di oligospermia. Oltre alla semplicità ed al carattere poco invasivo, questo tipo di inseminazione ha il vantaggio di riprodurre più da vicino il processo naturale di reclutamento e selezione degli spermatozoi più mobili e morfologicamente normali, che di solito avviene a livello del muco cervicale.

Inoltre, l'accumulo degli spermatozoi nelle cripte endocervicali consente un afflusso prolungato di gameti mobili verso il tratto genitale superiore.

Questo fenomeno allarga la cosiddetta «finestra» d'inseminazione, in relazione all'ovulazione, paragonabile in questo caso, a quella di un rapporto naturale: ciò permette di effettuare l'inseminazione senza monitoraggio particolare del ciclo, avendo come unico riferimento lo *score* cervicale e la curva termica, con risultati di concepimento del 18-30% per coppia e del 3-4% per ciclo di trattamento.

Inseminazione intrauterina (IUI)

L'inseminazione IUI (*IntraUterine Insemination*) viene effettuata ambulatorialmente, mediante cannule flessibili molto simili a quelle utilizzate per il trasferimento degli embrioni nell'utero. Dopo disinfezione del collo, la cannula è introdotta fino a 0,5 cm dal fondo uterino ed un volume di 0,3-0,5 ml di liquido seminale pretrattato viene iniettato lentamente in cavità. La cannula viene quindi ritirata dolcemente 15-30 secondi dopo la fine dell'inseminazione e la paziente resta distesa per 15 minuti prima di riprendere una normale attività.

I limiti della tecnica sono rappresentati dalla necessità di una adeguata preparazione dello sperma, in maniera tale da evitare effetti collaterali, dalle difficoltà tecniche che a volte si possono presentare in relazione all'anatomia del canale cervicale e dell'asse utero-cervicale. L'inconveniente principale dell'IUI, però, è rappresentato da una «finestra» d'inseminazione relativamente ristretta rispetto alla tecnica intracervicale, per cui è necessario individuare con grande precisione il momento dell'ovulazione. Il razionale di questa tecnica, infatti è la possibilità di deporre nel fondo della cavità uterina una frazione di sperma di elevata qualità, vicino al punto d'inserzione delle tube, riducendo così la distanza che gli spermatozoi devono percorrere per raggiungere l'ovocita. Comunque la cavità endometriale sembra essere un ambiente ostile per la sopravvivenza degli spermatozoi ed è importante che questi abbandonino l'utero e che si portino al sito di fecondazione, nella porzione ampollare delle tube, entro un breve tempo. Ecco perché l'inseminazione deve essere sincronizzata con l'ovulazione: in condizioni ideali essa dovrà precedere l'espulsione dell'ovocita dal follicolo preovulatorio, poiché il periodo durante il quale l'ovocita è fecondabile è di circa 12 ore.

TAB. II. PERCENTUALI DI SUCCESSO DEL TRATTAMENTO CON IUI

Indicazioni	Coppie n.	Cicli n.	Gravidanze		
			Totali	% coppie	% ciclo
Fattore maschile	292	944	84	29	8,9
Fattore cervicale	110	431	44	40	10,2
Infertilità inspiegata	36	117	8	22	6,8
Totale	438	1492	136	31	9,1

Nella tab. II sono riportati alcuni dati sulla percentuale di successo con IUI.

Inseminazione intraperitoneale (IPI o DIPI)

Proposta per la prima volta da Fowler *et al.* questa tecnica di riproduzione assistita (IPI: *IntraPeritoneal Insemination*; DIPI: *Direct IntraPeritoneal Insemination*) consiste nell'iniezione intraperitoneale (nel cavo del Douglas) di spermatozoi mobili attraverso il fornice vaginale posteriore. Nella tecnica originale l'inseminazione è preceduta dalla induzione della CFM. Le indicazioni principali sono rappresentate dalla sterilità inspiegata o dal fattore cervicale. Mediante questa strategia d'inseminazione si intende evitare l'esposizione degli spermatozoi al muco cervicale ed alle secrezioni uterine ed agevolare il trasporto degli stessi in cavità peritoneale, una fisiologica destinazione per gli spermatozoi mobili depositati in vagina.

Nelle tabb. III e IV sono riportate alcuni dati sulle percentuali di successo con IPI o DIPI.

Inseminazione intratubarica (ITI)

Recentemente sono state messe a punto tecniche di trasferimento dei gameti direttamente nel lume tubarico attraverso la via ascendente cervico-uterina. Il vantaggio teorico della ITI è intuitivo e consiste nell'assicurare la presenza di una adeguata quota di nemaspermia mobili nella porzione ampollare della tuba (o in prossimità di essa) in periodo periovulatorio. La tecnica, sebbene sia di semplice esecuzione, comporta un trauma relativamente più intenso rispetto alle altre tecniche di inseminazione.

Durata del trattamento

Tutti i lavori pubblicati concordano sul fatto che la maggior parte delle gravidanze si registri durante i primi due o tre

TAB. III. TASSI DI GRAVIDANZA PER CICLO DI TRATTAMENTO DOPO DIPI (INDIPENDENTEMENTE DALLA INDICAZIONE)

	Anno	Cicli n.	Tasso di gravidanze/ciclo (%)
Fowler <i>et al.</i>	1986	56	14,3
Menard <i>et al.</i>	1988	171	12,2
Doley <i>et al.</i>	1988	51	6,0
Cimino <i>et al.</i>	1988	429	13,2
Flamigni <i>et al.</i>	1989	70	19,0
Hovatta <i>et al.</i>	1990	174	13,2
Crosignani <i>et al.</i>	1991	164	14,0

cicli di inseminazione e che la curva di concepimento tenda verso un *plateau* dopo il 5° ciclo di trattamento, oltre il quale la percentuale di successo si riduce notevolmente. Sembra opportuno, in accordo ai vari risultati, estendere il trattamento per almeno 5-6 cicli ed in caso di insuccesso eventualmente considerare il ricorso alle tecniche di fecondazione extracorporea.

I risultati dell'inseminazione intraconiugale sono molto variabili, in relazione al tipo di fecondazione effettuata e al tipo di indicazione. La percentuale complessiva di gravidanze ottenute per coppia, in media non supera, dopo 5-6 cicli, il 25% mentre la percentuale di gravidanza per ciclo raggiunge in media il 10%.

TAB. IV. RISULTATI DI DIPI IN RELAZIONE ALLE INDICAZIONI

	Coppie n.	DIPI n.	Gravidanze		
			Totali	% coppie	% cicli
Subfertilità maschile	192	228	24	12,5	10,5
Insufficienza del muco cervicale	24	26	8	33,3	30,7
Immunizzazione maschile	11	23	—	—	—
Immunizzazione maschile dopo trattamento con corticosteroidi	21	37	2	9,5	5,4
Immunizzazione femmine	8	15	—	—	—
Immunizzazione femminile dopo trattamento con corticosteroidi	19	27	2	10,5	7,4
Sterilità inspiegata	69	73	21	30,4	28,7

INSEMINAZIONE EXTRAconiUGALE (AID)

Introduzione

L'inseminazione con sperma di donatore rappresenta una possibile soluzione per coppie la cui sterilità sia dovuta al fattore maschile. Questo tipo di orientamento, soprattutto oggi, non può essere considerato un trattamento clinico della sterilità, e pertanto non può scaturire dalla decisione del medico, bensì della coppia che preferisce questo provvedimento all'adozione.

Indicazioni

Oggi, alla luce dell'introduzione nella pratica clinica delle tecniche di fecondazione *in vitro* mediante iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) dopo prelievo testicolare, delle recenti sperimentazioni cliniche di fecondazione *in vitro* utilizzando precursori (aploidi) degli spermatozoi (spermatidi) e della presenza di foci di spermatogenesi conservata anche in presenza di azoospermia secretiva con diagnosi istologica, su singolo prelievo biottico testicolare, di *sindrome a sole cellule del Sertoli*, non esistono più indicazioni assolute all'inseminazione extraconiugale.

Esistono invece una serie di indicazioni relative:

— sterilità maschile (azoospermia ostruttiva o secretiva; oligoastenozoospermie severe) dopo ripetuti insuccessi di fecondazione *in vitro* (ICSI) con gameti omologhi;

— malattie geneticamente trasmesse, dominanti o recessive (come la feniloligofrenia, la malattia di Tay-Sachs, la malattia di Von Gierke, la corea di Huntington, il retinoblastoma, etc.);

— alcuni gravi incompatibilità Rh con antecedente morte endouterina del feto (più rare dopo l'introduzione sistematica della profilassi di immunizzazione materno-fetale nella madre);

— le sterilità immunologiche dovute alla presenza di anticorpi antinemasperma (dopo ripetuti insuccessi di fecondazione *in vitro* [ICSI] con gameti omologhi).

Discutibile è invece l'indicazione in caso di donne sole o in coppie omosessuali con desiderio di prole.

Le banche del seme

Negli ultimi anni sono sorte, in diversi paesi, numerosi centri di conservazione del seme, che hanno permesso di realizzare le AID utilizzando campioni di liquido seminale congelato. Tale procedura di inseminazione eterologa con seme congelato si è resa indispensabile in considerazione della diffusione di malattie a trasmissione sessuale (malattia da clamidia, gonorrea, AIDS, epatiti E e C, etc.); i donatori vengono selezionati (oltre che per le principali malattie a trasmissione genetica) anche in relazione alle caratteristiche somatiche del donatore (altezza, colore degli occhi e dei capelli, gruppo sanguigno, etc.). Per le malattie infettive i donatori vengono esaminati all'atto della donazione del seme e di nuovo dopo sei mesi: se al secondo controllo non vengono riscontrate patologie infettive, il seme donato sei mesi prima viene considerato esente da tali patologie e può essere utilizzato.

Tecniche di inseminazione e risultati

Le tecniche di inseminazione per le AID sono le stesse descritte per l'inseminazione intraconiugale (ICI; IUI; IPI; ITI). Diversi fattori, come l'età delle pazienti, il numero di inseminazioni per ciclo (non più di tre), la mobilità degli spermatozoi post-congelamento (> 30%), possono influenzare in vario modo il successo della tecnica che rimane comunque elevato e non differisce significativamente da quello ottenuto con sperma fresco.

Le tabb. V e VI riportano rispettivamente i risultati dell'esperienza belga e francese e mostrano come la maggior

TAB. V. TASSI DI GRAVIDANZE OTTENUTE CON INSEMINAZIONE ARTIFICIALE ETEROLOGA (AID)

N. di cicli	N. di pazienti	% di gravidanza	N. di gravidanze	Tassi cumulativi di gravidanze	
				%	%
1	1.000	17	170	170	17,3
2	830	15,5	129	299	29,9
3	701	14,9	104	403	40,3
4	597	11,6	69	472	47,2
5	528	13,7	72	544	54,4
6	456	11,3	52	596	59,6
7	404	9,1	37	633	63,3
8	367	11	40	673	67,3
9	327	4,6	15	688	68,8
10	312	8,1	25	713	71,3
11	287	8,9	26	739	73,9
12	261	12,6	33	772	77,2
13	228	9,4	21	793	79,3
14	207	4	8	801	80,1
15	199	8,2	16	817	81,7
16	183	5,8	9	826	82,6
17	174	4,9	9	835	83,5
18	165	7,6	13	848	84,8
19	152	10,4	16	864	86,4
20	136	4,1	6	870	87

TAB. VI. TASSI DI GRAVIDANZA PER CICLI OTTENUTI CON INSEMINAZIONE ARTIFICIALE ETEROLOGA

Numero di cicli	21.466
Numero di gravidanze	1.839
Tassi di gravidanze	8,5

parte delle gravidanze si verifichi entro i primi 6 cicli, pur restando significativamente elevati i tassi cumulativi di gravidanza anche dopo 12 cicli di inseminazione.

FECONDAZIONE *IN VITRO* CON TRASFERIMENTO DI EMBRIONI IN UTERO (FIV/ET)

Introduzione

Nel 1978 Steptoe e Edwards hanno riportato la nascita del primo essere umano dopo fecondazione *in vitro* (FIV: *Fecundation In Vitro*) di un ovocita aspirato dal follicolo pre-ovulatorio ed il trasferimento in utero dell'embrione (ET: *Embryo Transfer*). Per la prima volta nella storia della medicina era stato possibile ottenere un concepimento in presenza di una compromissione funzionale e strutturale delle salpingi. Questo obiettivo rappresentava il culmine di una lunga serie di studi, iniziati trenta anni prima, che consentirono lo sviluppo *in vitro* di embrioni di topo e successivamente, nel 1959, la prima fecondazione *in vitro* di ovociti di coniglio.

Nel corso degli anni '80 la FIV/ET è divenuta parte integrante della medicina della riproduzione e la rapida proliferazione in tutto il mondo di migliaia di centri attrezzati per questo tipo di tecnologia ha avuto un impatto rilevante nella pratica ginecologica, nel trattamento della sterilità e nel costume: il progressivo affinamento delle tecniche di laboratorio ha permesso la messa a punto delle tecniche di crioconservazione degli embrioni soprannumerari; sono stati definiti i protocolli per le procedure di ovodonazione di cui possono beneficiare le donne in perimenopausa o in menopausa precoce; sono stati studiati, con risultati peraltro tuttora in parte largamente *sub judice*, approcci semplificativi della tecnica originale come il trasferimento in tuba dei gameti (GIFT: *Gametes Intrafallopian Transfer*), di zigoti (ZIFT) o embrioni (TET), ovviamente nel trattamento delle condizioni di sterilità in cui si disponga almeno di una salpinge funzionalmente integra.

Negli anni '90, infine, l'introduzione delle tecniche di micromanipolazione dei gameti (ICSI [*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*] iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi) ha allargato ulteriormente il campo delle indicazioni alla fecondazione extracorporea e aumentato le percentuali di successo anche in caso di indicazioni maschili al trattamento, permettendo il ricorso alla fecondazione *in vitro* nei casi di azoospermia ostruttiva (con prelievo chirurgico [MESA] o percutaneo [PESA] degli spermatozoi dall'epididimo) e persino in caso di azoospermia secretiva (con prelievo biotico [TESE] o percutaneo [TESA] degli spermatozoi dal testicolo). Del tutto recenti sono le segnalazioni di gravidanze cliniche e nascite di bambini sani dopo iniezione intracitoplasmatica di precursori immaturi degli spermatozoi a corredo cromosomico aploide: gli spermatidi (rotondi: ROSNI: *Round Spermatid Nuclear Injection*; Tesarik *et al.*, 1995; allungati: ELSI: *Elongated Spermatid Injection*) prelevati dal testicolo o reperiti nel liquido seminale.

Nella tab. VII sono riportati i tassi di gravidanza in relazione al numero di embrioni trasferiti.

TAB. VII. TASSI DI GRAVIDANZA IN RELAZIONE AL NUMERO DI EMBRIONI TRASFERITI (Registro FIVNAT 86-89)

	Numero di embrioni trasferiti				
	1	2	3	4	≥ 5
N. cicli	1970	1880	2752	2895	1087
% gravidanze	8,9	17,9	27,0	29,9	32,9

Le tappe delle tecniche di fecondazione *in vitro*

Le fasi fondamentali delle tecniche di fecondazione *in vitro* (FIV/ET) comprendono:

- selezione delle coppie;
- induzione della crescita follicolare multipla;
- prelievo degli ovociti per via transvaginale sotto guida ecografica;
- la fecondazione *in vitro* e la coltura embrionaria nei primi stadi di segmentazione;
- il trasferimento degli embrioni in utero.

Selezione delle coppie

Le indicazioni alla fecondazione *in vitro* sono molteplici. Per quel che riguarda le indicazioni femminili alla FIV/ET, oltre a quella classica (il fattore tubarico), vengono oggi considerate anche l'endometriosi, il fattore immunitario e quello ovulatorio (ad es. la LUF [*Luteinized Unruptured Follicle*] syndrome).

Tra le indicazioni maschili alla ICSI oltre le vere e proprie azoospermie, consideriamo le gravi oligoastenoteratozoospermie e il fattore immunitario. Rimane poi il vasto campo della sterilità di coppia inspiegata, v. STERILITÀ**, *sterilità di coppia*.

In tutti i casi di indicazioni relative al trattamento, comunque, a decidere per l'ammissione più o meno rapida ad un ciclo di fecondazione extracorporea dovrebbero essere alcune considerazioni come l'età del *partner* femminile (le percentuali di gravidanza diminuiscono con l'età, quindi un'età superiore ai 35 anni impone tempi rapidi di risoluzione della sterilità), la gravità della patologia causa di sterilità, la sua resistenza alle terapie mediche o chirurgiche, nonché la durata della sterilità di coppia.

Induzione della crescita follicolare multipla e induzione della maturazione ovocitaria

Dei farmaci e dei protocolli utilizzati per l'induzione della CFM abbiamo trattato in precedenza (v. sopra, coll. *2189). Va sottolineato che l'induzione della CFM è un punto centrale delle tecniche di fecondazione extracorporea considerata la necessità di ottenere un numero adeguato di ovociti maturi per il trattamento, cercando di minimizzare i rischi di insorgenza della *sindrome da iperstimolazione ovarica* (v. coll. **4298-4309; v. anche sopra, coll. **2188). Protocollo di scelta è ormai quello che prevede la soppressione dell'attività ipofisaria con analoghi del GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*; somministrati a partire dalla metà fase luteale del ciclo precedente quello di stimolazione) evitando l'insorgenza di picchi prematuri di LH endogeno e la conseguente cancellazione del ciclo; per la fase di stimolazione ovarica vera e propria vengono utilizzate le gonadotropine ed in particolare l'FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). L'induzione della maturazione ovocitaria viene effettuata con la somministrazione di hCG (*human Chorionic Gonadotropin*), 34 ore prima del prelievo ovocitario.

Il prelievo degli ovociti

Avviene ormai in tutti i centri per via transvaginale sotto guida ecografica, in anestesia locale e blanda sedazione oppure in anestesia generale. Rarissime sono le complicazioni chirurgiche legate a flogosi pelviche, a danni vascolari e conseguenti emorragie (colporragie o emoperitonei) a traumi intestinali.

La fecondazione in vitro e la ICSI

1. **IVF (in vitro fertilisation).** - Completato il recupero degli ovociti inizia la vera e propria fase di fecondazione *in vitro* che nel caso della FIV/ET «classica» prevede l'inseminazione degli ovociti maturi (che abbiano cioè raggiunto la metafase II) col liquido seminale preparato mediante successivi passaggi in terreni di coltura e successive centrifugazioni fino a raggiungere una concentrazione di circa 50.000 spermatozoi per ml con cui viene comunemente effettuata l'inseminazione *in vitro* degli ovociti prelevati.

2. **ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection).** - Nei casi in cui si debba ricorrere alla iniezione dello spermatozoo nel citoplasma ovocitario il trattamento dei gameti è molto differente. Una volta controllato il grado di maturità degli ovociti prelevati, questi vengono immersi nel terreno di coltura ed incubati a 37 °C ed al 5% di CO₂. Quindi il complesso ovocita-cumulo ooforo viene esposto ad una soluzione di ialuronidasi allo 0,1% per circa un minuto durante il quale il complesso ovocita-cumulo ooforo viene continuamente pipettato all'interno di sottilissime pipette Pasteur allo scopo di facilitare la digestione delle cellule del cumulo ooforo. Gli ovociti sono quindi sottoposti a lavaggio in terreno di coltura ed infine le cellule della corona radiata ancora aderenti all'ovocita sono rimosse mediante aspirazione all'interno di una pipetta Pasteur. Ogni ovocita viene quindi esaminato per ricercare la presenza del globulo polare e solo gli ovociti in metafase II vengono sottoposti alle procedure di fecondazione microassistita.

Contemporaneamente al recupero e al trattamento dei gameti femminili, avviene la preparazione dei gameti maschili: nei casi in cui gli spermatozoi siano presenti nel liquido seminale, questo viene preparato attraverso successive centrifugazioni (normalmente su gradienti di Percoll) allo scopo di eliminare i detriti, le cellule o altro materiale che potrebbe ostruire i sottilissimi aghi da iniezione.

Nei casi di azoospermia ostruttiva gli spermatozoi possono essere recuperati mediante prelievo epididimario (MESA: prelievo microchirurgico degli spermatozoi dall'epididimo; PESA: aspirazione percutanea degli spermatozoi dall'epididimo) mentre nei casi di azoospermia secretiva gli spermatozoi, o in loro assenza gli spermatidi come riportato

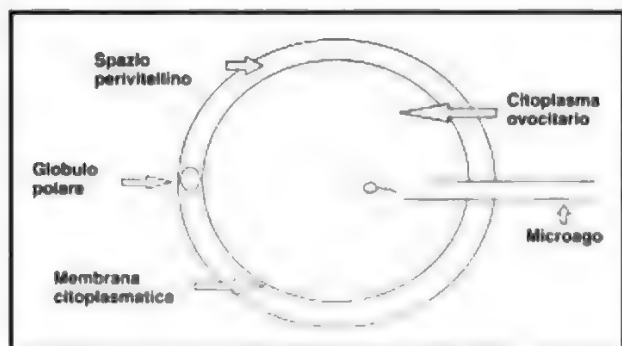


Fig. 3. Tecniche di fecondazione micro-assistita: ICSI. (Per gentile concessione del Dr. L. Rinaldi)



Fig. 4. ICSI: il micro-ago ha penetrato la membrana citoplasmatica dell'ovocita. (Osservazione Dr. L. Rinaldi)

in letteratura da iniziali segnalazioni, possono talvolta (in una percentuale di casi superiore al 50%) essere recuperati mediante prelievo testicolare (TESE: prelievo biopsico testicolare; TESA: aspirazione testicolare percutanea).

Una volta completata la preparazione dei gameti, inizia la fase di microiniezione dello spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita, che prevede l'uso del micromanipolatore che è dotato di una serie di manopole per il controllo pneumatico dei movimenti dei microstrumenti all'interno del campo ottico dell'invertomicroscopio nelle tre dimensioni.

Per la ICSI sono necessari due differenti tipi di microstrumenti: una pipetta di supporto, più spessa, per l'ovocita e una pipetta più sottile che serve per l'iniezione dello spermatozoo all'interno del citoplasma dell'ovocita. Entrambe queste pipette debbono essere preparate in anticipo mediante apparecchiature appositamente studiate. La pipetta di supporto dell'ovocita (o microsupporto) deve avere la punta di diametro leggermente inferiore al diametro medio dell'ovocita (120 µm circa); la pipetta da iniezione (il microago) deve essere molto più sottile (con un diametro interno circa 8-10 µm ed un diametro esterno di circa 11 µm) ed appuntita (con un becco di circa 16 µm di larghezza) per permettere l'azione di dissezione e/o penetrazione. Entrambe le pipette, dopo essere state sterilizzate, vengono montate sui supporti del micromanipolatore.

Viene utilizzato un vetrino a due pozzetti uno dei quali contenente circa 3 µl di sospensione di spermatozoi ricoperta di paraffina mentre nel secondo pozzetto vengono depositati gli ovociti da inseminare in una soluzione di Dulbecco con siero al 5%. Gli spermatozoi da iniettare vengono prima immobilizzati danneggiando la coda col microago e quindi vengono aspirati dal microago all'interfaccia mezzo di coltura/paraffina, avendo cura di aspirare un solo spermatozoo a partire dalla coda; lo spermatozoo viene trattenuto alla punta del microago.

L'ovocita viene quindi sorretto dal microsupporto in modo da presentare il globulo polare in posizione alle ore 6 o 12. Il microago si avvicina all'ovocita dalla posizione in ore 3 e deprime il complesso zona pellucida/oolemma verso la posizione in ore 9 fino a provocare una soluzione di continuo in tale complesso. A questo punto lo spermatozoo viene rilasciato dal microago all'interno del citoplasma ovocitario (fig. 3).

In tutti i casi di fecondazione extracorporea, a 16-18 ore dalla inseminazione si verifica se è avvenuta la fecondazione, e a distanza di 48-72 ore avviene il trasferimento degli embrioni in utero (v. sotto). Le figg. 3 e 4 schematizzano e illustrano la ICSI.

Trasferimento degli embrioni in utero

A 48-72 ore dal prelievo degli ovociti, avviene il trasferimento degli embrioni che nella maggioranza dei casi vengono trasferiti in utero. Le modifiche della tecnica originale che prevedevano il trasferimento degli embrioni in tuba (TET) a volte anche allo stadio di pronuclei (dopo cioè 18 ore dalla fecondazione) (ZIFT) non hanno finora dimostrato vantaggi reali in termini di aumento del tasso di gravidanza. In alcuni casi di ripetuti insuccessi di impianto degli embrioni trasferiti in utero è stato suggerito che alterazioni strutturali della zona pellucida, correlabili principalmente all'età della donna, possano determinare una ridotta capacità dell'embrione a sgusciare fuori dalla zona pellucida e quindi ad impiantarsi; per tale motivo è stata proposta l'applicazione di tecniche di apertura meccanica, chimica o fisica della zona pellucida, in modo da favorire il procedimento che fisiologicamente porta l'embrione, allo stadio di blastocisti, a sgusciare fuori dalla zona pellucida ed ad impiantarsi: l'utilità e le indicazioni di tale tecnica (*assisted hatching*) sono peraltro tuttora in discussione e necessitano di ulteriori ampi studi prospettici.

È orientamento comune (in alcuni paesi è norma legale) non trasferire in utero più di 3 (o al massimo 4) embrioni; in tal modo si ottiene il miglior tasso di gravidanza (tab. VII) col minor rischio di gravidanze plurime, evitando il ricorso alla pratica della *embrioriduzione* (v. GRAVIDANZA**).

Gli embrioni soprannumerari possono essere crioconservati in azoto liquido per essere successivamente scongelati e trasferiti in utero.

Tecniche di fecondazione *in vitro* in caso di menopausa: l'ovodonazione

La prima gravidanza in una donna in menopausa precoce è stata ottenuta nel 1985 e da allora il protocollo adottato, che prevedeva la preparazione dell'endometrio della donna in menopausa (ricevente) con estrogeni e progestinici così da permettere il trasferimento in utero degli embrioni ottenuto dalla fecondazione di ovociti donati da una donna sana con il seme del *partner* della ricevente, ha subito poche modifiche; le indicazioni si sono allargate spesso discutibilmente fino ad ammettere alle tecniche di fecondazione *in vitro* con ovodonazione non solo donne giovani in menopausa precoce (chirurgica o meno) e donne affette da malattie geneticamente trasmesse dominanti o recessive, ma anche donne in perimenopausa, che hanno poche o nulle possibilità di concepire, in quanto le loro riserve ovariche (numero e qualità degli ovociti) sono in procinto di essere esaurite, e persino donne in menopausa franca.

A tale proposito di recente anche in Italia la Federazione Nazionale degli Ordini dei Medici ha stabilito i 51 anni come limite anagrafico massimo della donna per accedere ad un programma di fecondazione *in vitro* con ovodonazione.

GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer)

Nel 1984 venne messa a punto la tecnica definita GIFT (*Gamete Intrafallopian Transfer*) che prevede il prelievo degli ovociti dopo CFM e l'immediato trasferimento di parte degli ovociti prelevati nelle tube «unitamente agli spermatozoi» preparati del *partner* maschile. Tale tecnica nei primi anni di applicazione ha riscosso notevole consenso tra gli operatori perché di limitato impegno per quel che riguarda il lato biologico (la fecondazione avviene nella tuba e non in incubatore: il ruolo del laboratorio è pertanto ridotto rispetto alle tecniche di fecondazione extracorporea); inoltre è questa la tecnica di fecondazione assistita più complessa accettata dall'etica cattolica che rifiuta ogni tec-

nica (pur omologa) che preveda la fecondazione extracorporea. Va peraltro rilevato come per il GIFT sia necessaria la laparoscopia (che rende la tecnica sicuramente più invasiva e meno ripetibile rispetto alle tecniche di fecondazione *in vitro*) e la pervietà tubarica; inoltre il GIFT rispetto alle tecniche di fecondazione *in vitro* non fornisce alcuna prova di avvenuta fertilizzazione: il ricorso a tale tecnica nei casi di sterilità maschile e nei casi di sterilità femminile da fattore tubarico andrebbe quindi evitato. Tali considerazioni negative hanno oggi molto ridimensionato il ruolo di tale tecnica di procreazione assistita.

Per più ampie informazioni su tale tecnica, v. FECONDAZIONE ARTIFICIALE* (coll. *3004-3005 e relative figg. 1 e 3).

Tecniche di biopsia embrionaria e diagnosi prenatale preimpianto

Gli attuali metodi di diagnosi prenatale (v. PRENATALE DIAGNOSI [v.; v.*; v.**]), come la amniocentesi precoce ed il prelievo dei villi coriali, vengono effettuati durante il corso della gravidanza; nelle coppie ad alto rischio per la trasmissione di malattie genetiche è stato proposto il ricorso alla diagnosi prenatale su embrioni ottenuti durante un ciclo di fertilizzazione extracorporea, in modo da conoscere l'assetto genetico dei singoli embrioni, riguardo alla malattia a rischio di trasmissione, prima del trasferimento in utero.

La *diagnosi prenatale preimpianto* richiede dunque un prelievo biotico dall'embrione che viene effettuato, mediante gli stessi micromanipolatori utilizzati per la ICSI, allo stadio di 8 cellule quando ancora i singoli blastomeri sono considerati totipotenti, e la successiva analisi genetica del materiale prelevato che viene effettuata mediante tecniche che prevedono l'utilizzo della PCR (*polymetase chain reaction*) e della FISH (*fluorescent in situ hybridization*). I problemi tecnici legati a questo complesso intervento sono molteplici e per la maggior parte legati alla difficoltà di ottenere una diagnosi sicura, in tempi brevi, su una esigua quantità di DNA. Inoltre il tasso di gravidanza degli embrioni saggiati come sani e trasferiti in utero è lo stesso riportato per la FIV/ET. La tecnica è dunque da considerarsi allo stadio di sperimentazione clinica anche se, nei 14 centri mondiali dove viene praticata, sono state già ottenute 50 gravidanze e la nascita di 34 bambini sani nel corso degli ultimi 5 anni. Le patologie ereditarie per le quali è in corso la sperimentazione sono quelle legate al cromosoma X, ed alcune malattie genetiche come la fibrosi cistica (limitatamente alla mutazione *delta F508*), la distrofia di Duchenne, l'X fragile, la malattia di Tay-Sachs, l'emofilia.

Risultati della FIV/ET e della ICSI

Nella tab. VIII sono riportati i dati relativi ai risultati globali della FIV/ET secondo vari registri e del Rapporto sul Bilancio Mondiale. I dati sono relativi al 1993 (USA e Canada) e al 1994 (Francia).

TAB. VIII. RISULTATI FIVET. REGISTRI NAZIONALI FRANCIA, USA E CANADA

	Francia 1994	USA e Canada 1993
N. prelievi ovocitari	19.142	27.443
N. transfers	15.103	24.410
parti per pickup	18,5%	18,6%

FECONDAZIONE ASSISTITA

TAB. IX. RISULTATI FIVET IN FUNZIONE DELL'ETÀ DELLA DONNA (Parti per prelievo oocitario)

	Francia 1990-1994	USA 1993
< 40 anni	24,7%	21,5%
≥ 40 anni	14,8%	8,6%

TAB. X. RISULTATI FIVET IN FUNZIONE DELL'ETÀ DELLA DONNA

Età	USA '88-'89	Francia '89	Dati Europei '86	Italia '91-'92
< 25	35,0	↑		
25-29	23,0	16,8	23,1	22,2
30-34	21,0	↓	24,4	21,1
35-39	19,0	15,8-11,0 (c)	21,4	18,0
40 +	12,0	8,3-2,4 (d)	14,7	12,3

a = gravidanze cliniche/embryo-transfer;

b = gravidanze cliniche/aspirazione follicolare;

c = 15,8% riferito ad età media di 36-37 anni, 11,0% riferito ad età media di 38-39 anni;

d = 8,3% riferito ad età media di 49,41 anni e 2,4% riferito ad età media > 42.

Le percentuali di successo decrescono con l'avanzare dell'età della donna (tabb. IX e X) e dopo i 40 anni la possibilità di successo appare significativamente ridotta rispetto alle donne più giovani.

Per quel che riguarda la ICSI riportiamo i dati relativi a tutto il 1993 (un anno appena quindi dopo l'introduzione nella pratica clinica della tecnica) ottenuti da una indagine mondiale condotta dalla Società Europea di Riproduzione Umana e Embriologia (ESHRE; tab. XI) e i dati relativi ai risultati ottenuti dal dicembre 1994 al luglio 1996 (tab. XII).

Come documentato dai dati riportati nelle tabelle, dopo che nel 1992 Palermo *et al.* hanno pubblicato le prime 4 gravidanze insorte grazie alla iniezione di un singolo spermatozoo nel citoplasma di un ovocita maturo, tale tecnica si è rapidamente diffusa in tutto il mondo in ragione dell'alta percentuale di successi che offre anche in condizione di gravissime patologie nemaspermiche, nonostante i dubbi sollevati sulla possibile trasmissione nella prole maschile di patologie a carico del cromosoma Y tali da determinare nel figlio le stesse condizioni di dispermia grave del padre; invece, i dubbi riguardanti un possibile lieve aumento di patologie cromosomiche a carico dei cromosomi sessuali nella prole, sorti dopo il primo anno di applicazione clinica della tecnica, non sono stati confermati dai dati successivi. Tutti da chiarire rimangono invece i dubbi relativi all'utilizzo degli spermatozoi in caso di azoospermia secretiva con arresto maturativo, anche se già tre gravidanze sono state ottenute e seguite dalla nascita di bambini sani e normoconformati. In merito alle ICSI, v. anche le considerazioni fatte nella voce EMBRIONE UMANO, INTERVENTI SULL' (coll. **1824-1825).

Bibliografia

Asch R. H., Ellsworth L. R., Balmaceda J. P., Wong P. C., *Lancet*, 1984, 2, 134.

TAB. XI. ICSI: RISULTATI CLINICI AL 31-12-1993
(Studio multicentrico ESHRE)

	Spermatozoi ejaculati	Spermatozoi epididimari	Spermatozoi testicolari
N. cicli	3.011	116	30
N. gravidanze	856	49	8
Tasso di gravidanze	29%	42%	26%

TAB. XII. ICSI: RISULTATI OTTENUTI DAL DICEMBRE 1994 AL LUGLIO 1996

	N.	%
Cicli	772	
Ovociti metafase II	5.872	
Ovociti fecondati (2 Pn)	3.512	59,2
Embrioni	3.474	98,9
Ovociti fecondati (3 Pn)	42	0,7
Ovociti danneggiati	36	0,6
Transfer eseguiti	720	93,5
Gravidanze/ciclo	174	22,5
Aborti	8	1,0

Cittadini E., Gattuccio F., La Sala G., Palermo R., *La sterilità umana*, 1993, Colesse ed., Palermo.

Cittadini E., Guastella G., Comparetto G. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1988, 3, 101.

Cittadini E., Palermo R., *Acta Eur. Fert.*, 1989, 20, 285.

Craft L., Tsigotis M., *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 1623-1626.

Devroey P., Liu J., Nagy Z. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 1457-1460.

Fishel S., Green S., Bishop M. *et al.*, *Lancet*, 1995, 345, 1641-1642.

Fishel S., Jackson P., *Preparation for human in vitro fertilisation in the laboratory*, in Fishel S., Symonds E. M. eds., *In Vitro Fertilization - Past, Present and Future*, 1986, IRL Press, Oxford, pp. 77-87.

Fishel S., Lisi F., Rinaldi L. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 497-500.

Fishel S., Timson J., Lisi F., Jacobson M., Rinaldi L., Gobetz L., *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 501-505.

French in vitro Fertilization Registry: 1994 Report, *Contracept. Fert. Sex.*, 1995, 23, 490-493.

Hamberger L., Wikland M., Nilsson L., Janson P. O., *Acta Med. Scand.*, 1982, 210, 370.

Harper J. C., *J. Assisted Reprod. Genet.*, 1996, 13, 90.

Kremer J., *Int. J. Fertil.*, 1979, 24, 53.

Lutjen P. J., Trounson A., Leeton J. *et al.*, *Nature*, 1984, 307, 174.

Menezo Y., Guerin J. F., Czyba J. C., *Biol. Reprod.*, 1990, 42, 301.

Menezo Y., Nicolet B., Herbart N., André N., *Fertil. Steril.*, 1992, 58, 977.

Moghissi K. S., *Fertil. Steril.*, 1986, 46, 13.

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Sterteghem A. C., *Lancet*, 1992, 340, 17.

Schoysman R., *J. Med. Ethics*, 1975, 1, 34.

Shrivastav P., Nadkarni P., Wensvoort S., Craft L., *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 2058-2061.

Society for Assisted Reproductive Technology and American Society for the Reproductive Medicine, Assisted reproductive technology in the United States and Canada 1993 results generated from the American Society for Reproductive Medicine Society for Assisted Reproductive Technology Registry, *Fertil. Steril.*, 1995, 64, 13-21.

Stephens P. C., Edwards R. G., *Lancet*, 1978, 2, 366.

Temple-Smith P. D., Southwick G. J., Yates C. A., Trounson A. O., De Kretser D. M., *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 1985, 2, 119.

Tesarik J., Mendoza C., Testart J., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 525.

ETTORE CITTADINI

FEGATO E VIE BILIARI [v. vol. VI, coll. 1065-1413;
Agg. I, coll. *3013-3170]

SOMMARIO GENERALE

DILATAZIONI CONGENITE BILIARI	col. 2205
INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA	col. 2213
CHIRURGICA DEL FEGATO	col. 2218
TRAPIANTO DI FEGATO	col. 2228

DILATAZIONI CONGENITE BILIARI

SOMMARIO

Generalità (col. 2205). - **Classificazione e patogenesi** (col. 2208). - **Terapia** (col. 2211).

Generalità

Il recente arricchimento della diagnostica per immagini (fig. 1; ma soprattutto v. FEGATO E VIE BILIARI* [*3033-3062; figg. 5-38]) ha dilatato l'interesse per le cosiddette «cisti biliari» intra- ed extraepatiche, dalla specialità pediatrica, in cui era sostanzialmente confinato, alla chirurgia generale. Ciò a conferma del fatto che la storia della scienza medica è intessuta di ripensamenti e di reinizi. In effetti, è oggi chiaro che le dilatazioni congenite delle vie biliari (DCB) intraepatiche e quella della via biliare principale, in un terzo dei casi associate tra loro, non sono confinate alla

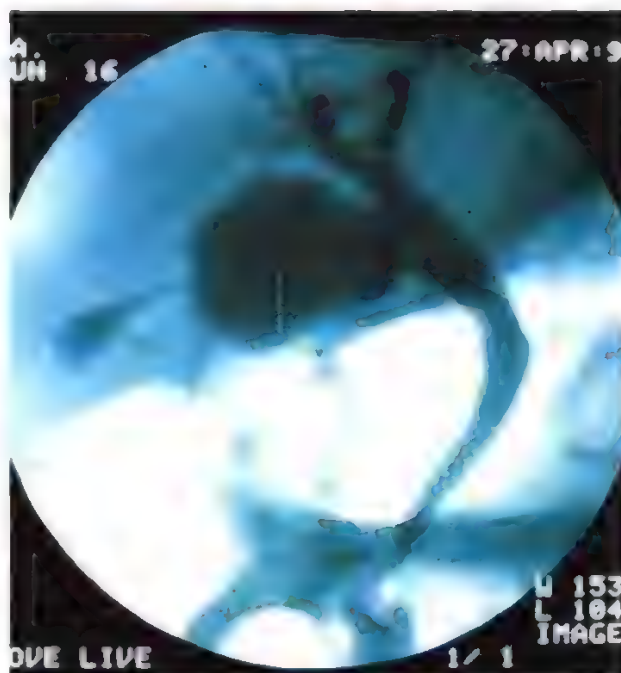


Fig. 2. Colangiografia retrograda. Esiste una dilatazione del cistico, congenita del tipo A di Giordani. La DCB cistica simula la colecisti che è invece ridotta di volume.

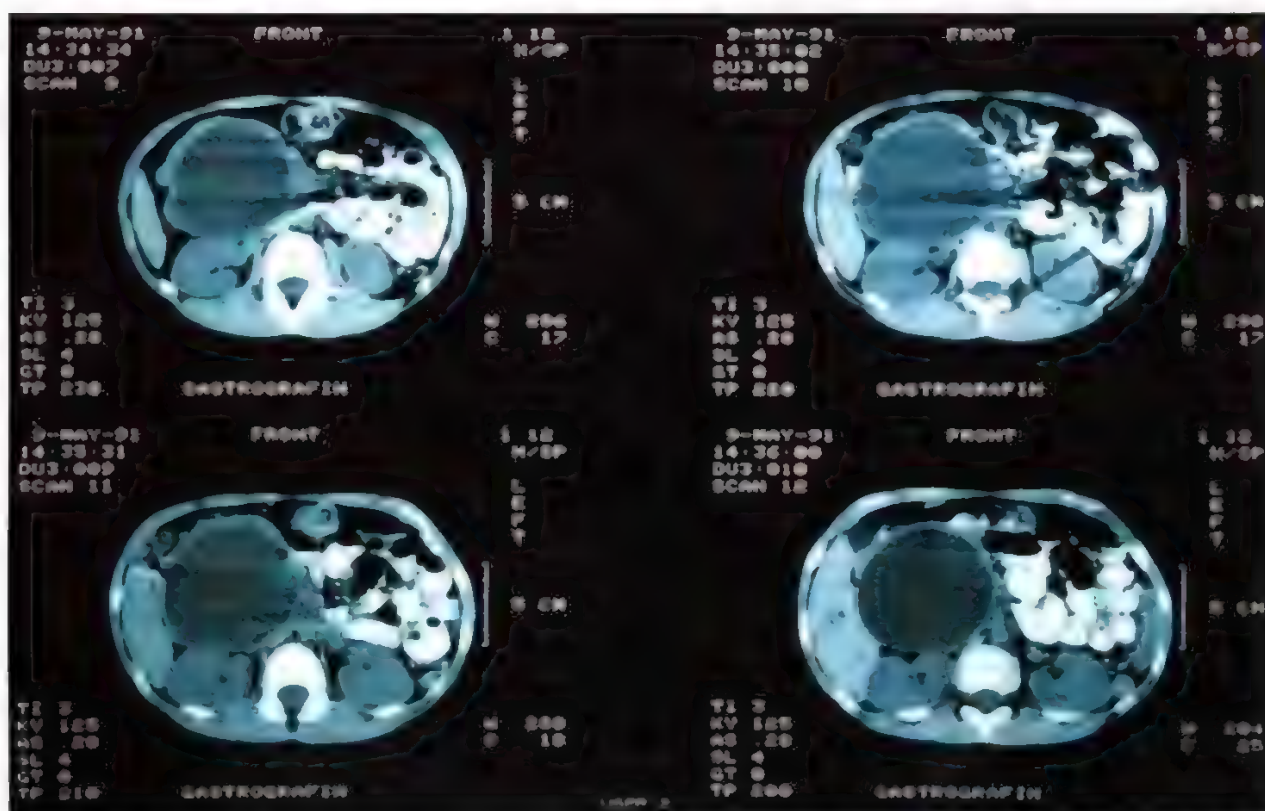


Fig. 1. TAC epatobiliare. Esiste una grande dilatazione congenita dell'epatocolodoco tipo Ia della classificazione di Todani (cfr. tab. II).

TAB. I. DILATAZIONI CONGENITE DELLE VIE BILIARI (DCB)

1. Forma extraepatica (DCBE) (tre tipi):
 - a) dilatazione epato-coledocica;
 - b) diverticolo epato-coledocico;
 - c) coledococoele.
2. Forma intraepatica (DCBI) o malattia di Caroli
3. Forme associate (sindromi dismorfiche)

giovane età, ma possono invece restare silenti o paucisintomatiche per sempre o a lungo, fino a tarda età, quando una complicanza le mette in evidenza. Le congenitopatie dilatative delle vie biliari interessano qualsiasi livello dell'albero biliare, compreso il dotto cistico, che fino al 1965 (Stoppa *et al.*) si riteneva esente da tali condizioni morbose (fig. 2).

Nelle regioni asiatiche, dove sono più frequenti, le «cisti biliari» hanno un'incidenza clinica dello 0,01% e un'incidenza autoptica dello 0,02%. È certamente approssimato per difetto il profilo statistico di qualche migliaio di casi che si evince dalla letteratura. Questa patologia rara non può essere comunque trascurata dal chirurgo. Fa parte dell'aneddotica medica ripetere che è proprio la chirurgia di per sé la principale complicanza delle cisti biliari.

Solo trenta anni fa, in epoca precedente lo sviluppo delle

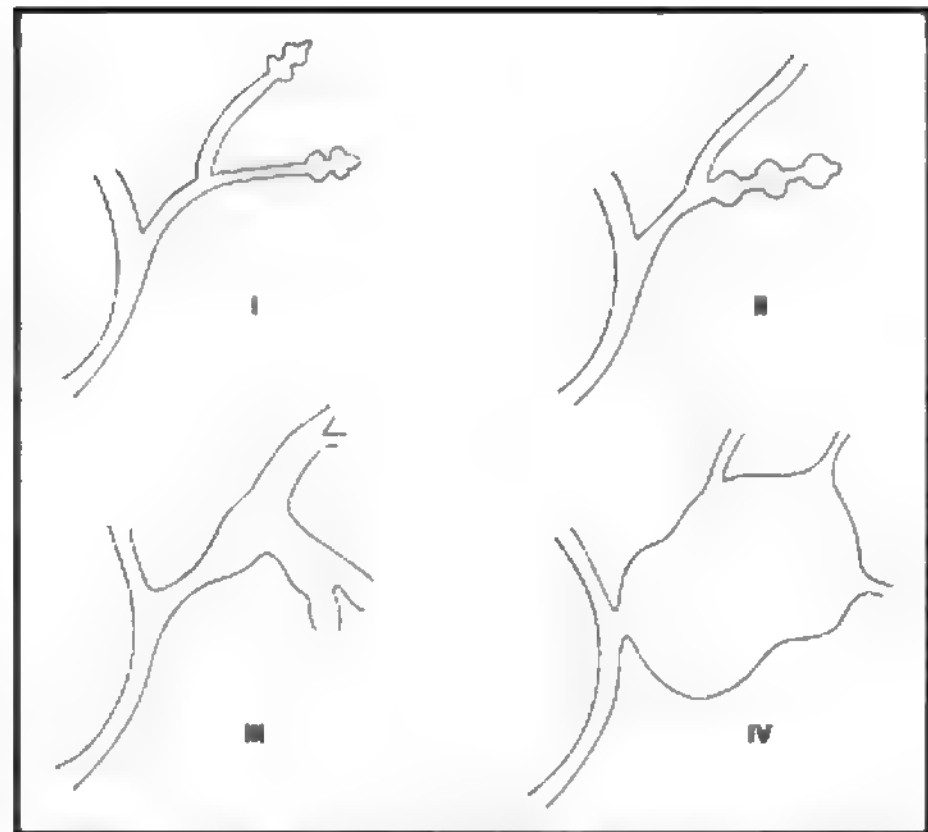


Fig. 4. La malattia di Caroli: i vari tipi di dilatazione biliare intraepatica. In sede sottocorticale (tipo I) le dilatazioni sono eccezionali e hanno 2-10 mm di diametro. A livello dell'unità epatica (tipo II) si presentano a «grappolo d'uva» con cavità di 2-3 cm di diametro (14%). A livello segmentario (tipo III) le ectasie biliari assumono aspetti fusiformi (43,7%). A livello di un intero emisegato (tipo IV), la dilatazione biliare può assumere l'aspetto di una grossa cisti semplice e pluriacellulare (18,7%).

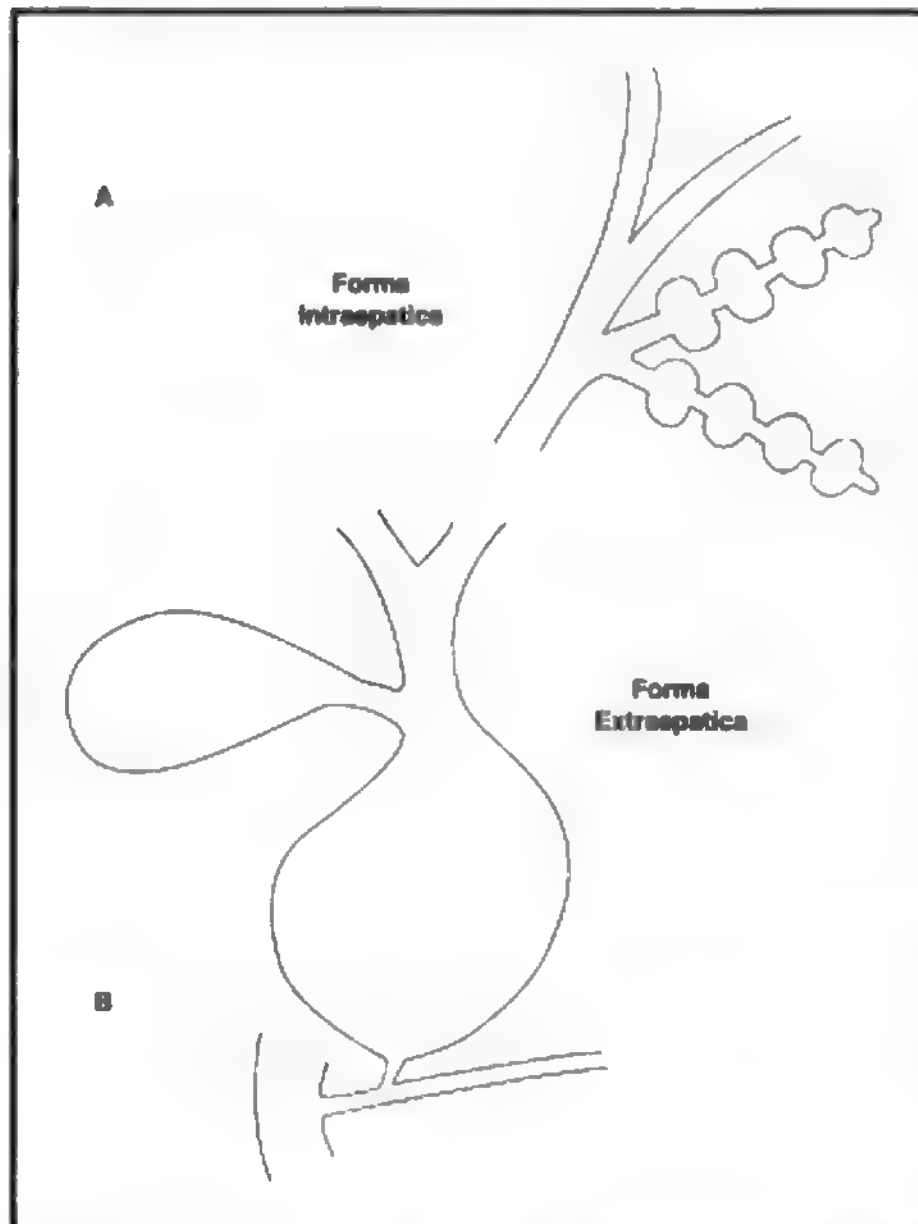


Fig. 3. Le dilatazioni congenite delle vie biliari. Possono essere distinte in due forme fondamentali: A) la forma intraepatica o malattia di Caroli, B) la forma extraepatica, che a sua volta comprende tre tipi di lesione (dilatazione dell'epatocoleddo, diverticolo dell'epatocoleddo, coledococoele). Sul piano genetico e patogenetico, le due forme sono profondamente diverse, anche se possono risultare associate.

tecniche per immagini, Oliver (1958), nella collana dedicata da Mondor alla chirurgia delle vie biliari, riteneva scusabile la mancata diagnosi clinica di «cisti del coledoco», ma non quando «le ventre ouvert, un kiste du cholédoque ne soit reconnu tel qu'après des dissections longues, laborieuses, choquantes et anatomiquement dévastatrices, la principale cause de la mortalité». Oggi la diagnosi può essere formulata, anche in epoca prenatale, già dal 90° giorno, e la terapia, specie in emergenza, non è più soltanto chirurgica.

Classificazione e patogenesi

Nella tab. I e nella fig. 3 sono rispettivamente riportate la classificazione delle dilatazioni congenite delle vie biliari e una rappresentazione schematica delle dilatazioni delle vie biliari.

La «cisti» biliare intraepatica, trova citazione già all'inizio del secolo (1906) per opera di Vachel e Stevens, ma è consuetudine identificarla con la descrizione prodotta da Caroli, nel 1958. Tant'è che essa è comunemente detta *malattia di Caroli* (fig. 4), quando la varietà scritta dall'autore

TAB. II. LE DILATAZIONI CONGENITE DELLE VIE BILIARI (DCB) SECONDO TODANI

Tipo I	Dilatazioni dell'epato-coledoco a) cistiche totali b) cistiche segmentarie c) fusiformi totali
Tipo II	Diverticolo dell'epato-coledoco
Tipo III	Coledococoele
Tipo IV	Dilatazioni multiple a) extra- intraepatiche b) solo extraepatiche
Tipo V	Dilatazioni uniche o multiple della via biliare intraepatica (malattia di Caroli)

incide solo nel 13% dei casi. Più datata, è del 1723, la descrizione di «cisti» epatico-coledocica redatta da Vater. Solo dopo 254 anni, nel 1977, Todani ne distingue tipi e varianti tutt'ora accettate (fig. 5; tab. II).

Interessante e a noi coeva, è la proposizione embriogenetica di Henry *et al.* (1987) che distingue le «cisti» biliari a trasmissione autosomica recessiva (come quelle della via biliare extraepatica, la malattia di Caroli, localizzata e diffusa, e la fibrosi epatica primaria) tutte sempre originariamente comunicanti con l'albero biliare e quindi a contenuto biliare, dalle cisti semplici, dalla policistosi epatorenale e dai complessi di Von Meyenburg, che invece non comunicano con le vie biliari, non contengono bile e sono a trasmissione autosomica dominante. Senza escludere le rare malformazioni complesse, con aspetti specifici delle due varietà cistiche, biliare ed epatica.

Ciò premesso appare evidente che non è semanticamente corretto insistere nel definire «cisti» le suddette malformazioni, sia perché cisti non sono, ma diverse anomalie dilatative dell'albero biliare, sia per l'aspetto specifico che assumono, che è globiforme solo nel 77% dei casi, mentre negli altri è cilindrico o a fuso.

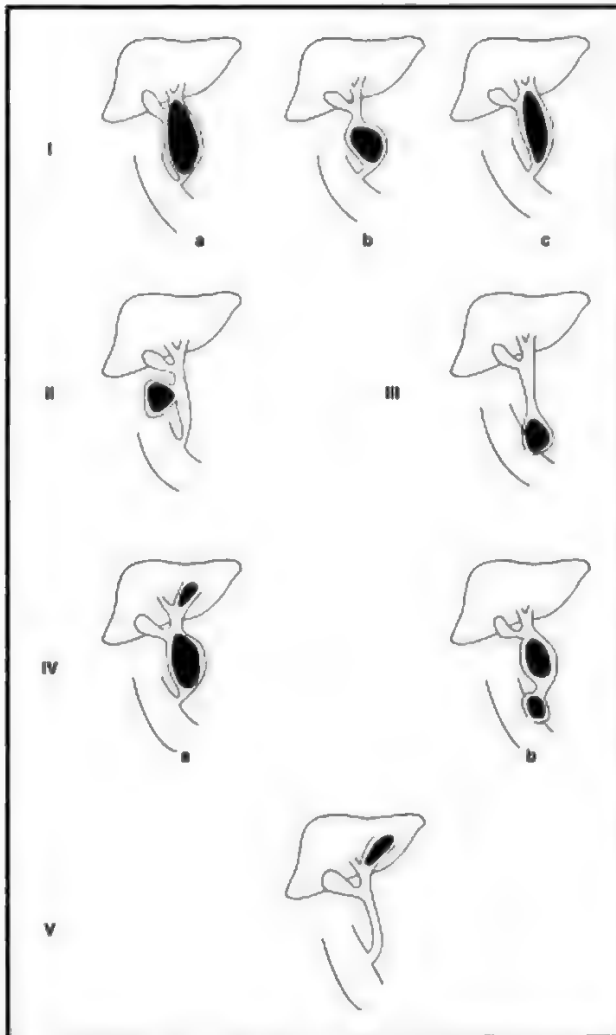


Fig. 5. Classificazione delle DCB secondo Todani (cfr. tab. II).

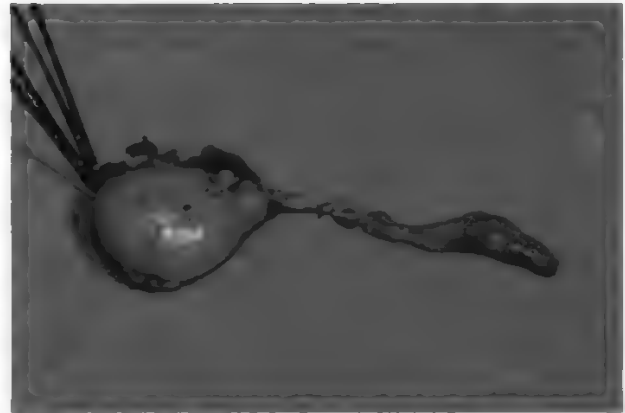


Fig. 6. DCB dell'epatocoledoco con annessi cistico e colecisti, tipo Ib della classificazione di Todani. (Osservazione Giordani).

Il tipo globiforme (fig. 6), che si sviluppa prima dei 12 mesi di vita, quando non sono ancora presenti le fibre elastiche, ed è dovuto alla distensione per l'aumento pressorio che consegue alla chiusura dei dotti biliari, non promuove mai la pancreatite. Il tipo cilindrico o fusiforme, che è dovuto all'attivazione da reflusso del sistema enzimatico pancreatico, sviluppa invece la complicanza pancreatica.

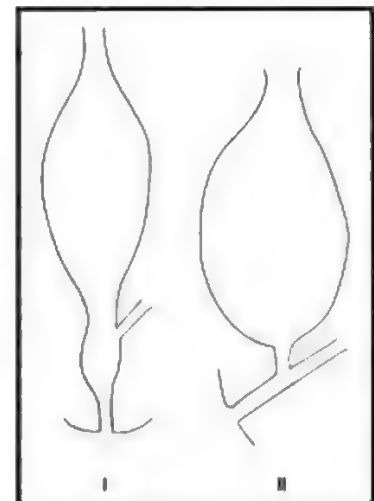
In occasione del 94° congresso della Società Italiana di Chirurgia proponemmo (Giordani, 1992a) di abbandonare il termine «cisti» e di adottare quello di dilatazione congenita biliare (DCB) intra- (I) ed extra (E) epatica.

Ricordiamo che la forma intraepatica (DCBI) è comunemente conosciuta come malattia di Caroli (per la trattazione V. FEGATO E VIE BILIARI*, malattia di Caroli *3105-3108).

È improbabile una patogenesi comune delle DCB intra- ed extraepatiche, poiché la DCBI è legata ad un errore di formazione e la DCBE è collegata nel 96,2% dei casi, ad un canale comune bilio-pancreatico, lungo e stretto (*narrow segment*), che in poco meno del 50% dei casi si associa ad una disembriopatia della giunzione biliopancreatica. Fattori questi alla base del rallentamento del flusso biliare e del reflusso biliopancreatico, ritenuti i più comuni meccanismi patogenetici (fig. 7).

È difficile credere che queste anomalie dipendano da un singolo gene, quando piuttosto vien fatto di pensare a com-

Fig. 7. I due tipi principali di anomalia della giunzione coledocovo-pancreatica. A sinistra: tipo I o P-C: il dotto pancreatico sbocca nel coledoco; è favorito il reflusso bilio-pancreatico (pancreatiti), manca un netto segmento stenotico del coledoco terminale, la dilatazione epato-coledocica è di tipo fusiforme. A destra: tipo II o C-P: il coledoco sbocca nel dotto pancreatico; è favorito il reflusso pancreatico-biliare (colangiti ascendenti), presenza costante del segmento stenotico, la dilatazione epato-coledocica è di tipo cistico.



pleSSI condizionamenti genetici, come testimonierebbe la coppia di gemelle omozigoti, citata da Uchida (1992), una sola delle quali affetta da DCBE a monte di un tratto coledocico stenotico e con uno sbocco biliopancreatico anomalo. Secondo un'ipotesi suggestiva, la *common channel syndrome* (CCS) insorgerebbe intorno alla VIII settimana di sviluppo embrionario, quando la giunzione pancreatobiliare, che all'epoca è ancora fuori della parete duodenale, smette di migrare verso il lume enterico.

Terapia

Nelle dilatazioni congenite delle vie biliari, gli episodi febbrili ricorrenti, le colangiti, il dolore, la compromissione pancreatica, depongono a favore dell'impiego della chirurgia derivativa cisto-enterica, già universalmente adottata, e che oggi non può trovare spazio, fatta eccezione per i casi di emergenza e se si intende passare poi ad un procedimento exeretico. Ma allora il reintervento può risultare indaginoso ed emorragiparo, quando in emergenza l'esperienza sembra orientare al semplice abbattimento della pressione duttale, con manovre poco invasive, come la papillosfinterotomia endoscopica e il drenaggio naso-biliare, o il drenaggio biliare percutaneo (Giordani, 1992b).

Il triplice proponimento terapeutico formulato da Longmire *et al.* nel 1982: cistodigiunostomia secondo Roux, evacuazione della cisti-dilatazione della stenosi, intubazione a lungo termine; resezione epatica e/o resezione della via biliare principale, va riletto in termini exeretici e in prima istanza. Anche quando per l'esistenza di sinechie con i vasi, la liberazione del piano posteriore della DCBE comporta una fase delicata, ma sempre effettuabile con il ricorso allo slaminamento e/o alla mucoclasia della «fettuccia» biliodutale residua, e quando la resezione epatica deve estendersi ad un emifegato.

L'exeresi, ora conducibile nei giovani e in casi selezionati, anche per via video-laparoscopica (Farello *et al.*, 1995), ha aperto una nuova era nel trattamento di questa patologia: ma essa stessa può proporre l'avvio di complicazioni. Fra queste primeggia la stenosi della anastomosi bilioenterica, non di rado dovuta ad un'ischemia del moncone epatico residuo, privato del proprio corredo vascolare arterioso, molto sottile ed a decorso assiale. Questa stenosi è oggi trattabile con una serie di provvedimenti di recupero come la dilatazione con il palloncino per via transperietoepatica o attraverso una tasca enterica locata nel sottocutaneo e allestita previamente con il capo distale dell'ansa esclusa (fig. 8), ovvero con manovre radioguidate o perendoscopiche, come l'applicazione di drenaggi e *stent* metallici espansibili. Manovre del tutto solutrici di condizioni d'emergenza e preparatorie all'intervento chirurgico in elezione.

In soccorso di questi rari casi, sono giunti i trapianti di fegato, avviati già da tempo dal gruppo di Pittsburg (v. FEGATO E VIE BILIARI, *trapianto dal fegato* [v.*; v**]).

Bibliografia

- Allani D. *et al.*, Trapianto di fegato nelle DCB, in Giordani M. ed., *Le dilatazioni congenite delle vie biliari*, 1995, Delfino, Roma.
 Caroli J., *Sem. Hép. Paris*, 1958, **14**, 496-502.
 Farello G. A., Cerofolini A., Bergamaschi G., Rebonato M., DCB del coledoco: trattamento video-laparoscopico, in Giordani M. ed., *Le dilatazioni congenite delle vie biliari*, 1995, Delfino, Roma.
 Giordani M., Patologia cistica, intra ed extraepatica delle vie biliari, *S.I.C.*, 1992 a, Roma, vol. 3.
 Giordani M., Scozzarro A., Thorel F., Policistosi biliare in-

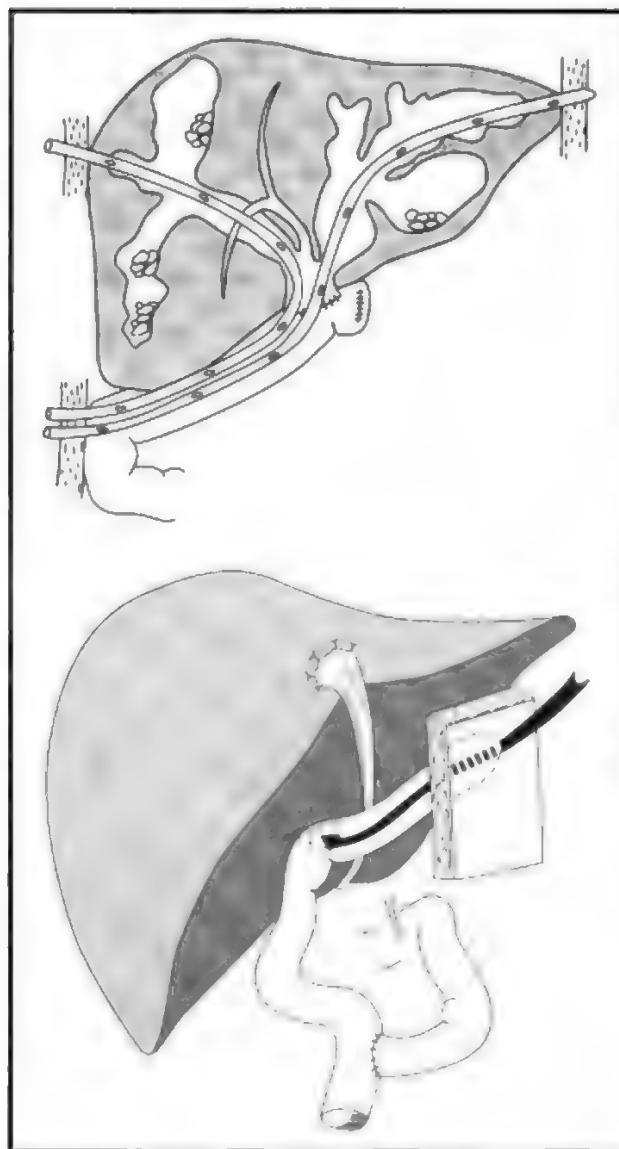


Fig. 8. Varietà di drenaggi transperieto-enterico-biliari. In alto, dopo un'anastomosi epatico-digiunale terminolaterale; in basso, dopo resezione epatica e bilio-digestionostomia terminolaterale con enterocutaneostomia di servizio. I drenaggi transepatici mantenuti a lungo termine consentono di praticare lavaggi ripetuti, efficaci per eliminare i detriti e i calcoli residui con lunghe remissioni della sintomatologia colangitica.

- traepatica (Caroli bilaterale), *Atti S.I.C.*, 94° congr., 1992 ed., Roma.
 Giordani M., *Le dilatazioni congenite dell'albero biliare*, 1995, Delfino, Roma.
 Henry X., Marasse E., Stoppa R. *et al.*, *Chir.*, 1987, **113**, 834.
 Longmire W. P., Mandolia S. A., Gordon H. E., *Ann. Surg.*, 1971, **174**, 711-726.
 Oliver C., *Lyon Chir.*, 1958, **54**, 771.
 Stoppa R., Marty G., Issad H., Djilali G., *Med. Acad. Chir.*, 1965, **67**, 179-188.
 Todani T., Watanabe Y., Narusue M. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1977, **134**, 236-269.
 Uchida M., Tsukahara M., Fuji T. *et al.*, *J. Ped. Surg.*, 1992, **27**, 1563.
 Vater A., *Dissertatio Inauguralis Medica: Univ. Libr.*, 1723, Edinburg, 70. II.

MARIO GIORDANI

INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA

[V. FEGATO E VIE BILIARI, VI, 1301-1313;
TOSSICOSI EPATICA*, *7154-7167]

SOMMARIO

Definizione (col. 2213). - **Etiologia ed epidemiologia** (col. 2213): **Virus**. - **Farmaci**. - **Avvelenamenti**. - **Altre cause**. - **Patogenesi** (col. 2216). - **Quadro clinico** (col. 2216). - **Terapia** (col. 2217).

Definizione

Il concetto di *insufficienza epatica acuta* (IEA) ha subito nel corso degli ultimi anni una profonda revisione critica. Ciò ha consentito di definire parte dei fattori etiologici responsabili di questa complessa sindrome, che rimane tuttavia ancora scarsamente conosciuta dal punto di vista patogenetico e di difficile controllo terapeutico.

L'IEA è una sindrome clinica drammatica e devastante, che insorge improvvisamente in un paziente senza preesistente malattia epatica. La sindrome è determinata dalla necrosi massiva del parenchima epatico ed è caratterizzata dall'insorgenza di encefalopatia (v. TOSSICOSI EPATICA*) e dalla perdita delle normali funzioni del fegato [f., soprattutto quella di sintesi dei fattori della coagulazione. Essa è potenzialmente reversibile ma, nella maggior parte dei casi, la prognosi è infausta. L'IEA deve essere distinta dall'insufficienza epatica terminale che compare nel paziente affetto da malattia cronica del f., nel quale la perdita della funzione epatocitaria e l'insorgenza dell'encefalopatia sono generalmente più gradualmente e prevedibili e spesso caratterizzate da fasi alterne di remissione e riacutizzazione, in relazione al decorso della malattia di base.

L'IEA si distingue, in base alla rapidità di insorgenza della sindrome, in due diverse forme: 1) *fulminante*, quando il coma epatico compare entro due settimane dall'insorgenza dell'ittero; e 2) *subfulminante*, quando il coma epatico compare in un periodo compreso tra la seconda e l'ottava settimana dall'insorgenza dell'ittero. Tale distinzione, pur arbitraria, è utile dal punto di vista clinico, poiché le due forme differiscono in parte per l'etiologia e la prognosi.

Etiologia ed epidemiologia

Le cause note di IEA sono riassunte nella tab. III. I virus epatitici, i farmaci e gli avvelenamenti sono le cause più comuni. In una modesta percentuale dei casi non è possibile individuare l'agente scatenante.

Virus

L'epatite da virus (v.**) rappresenta di gran lunga la causa prevalente di IEA, essendo responsabile del 60-75% dei casi in tutto il mondo. Tutti i virus epatitici sono virtualmente in grado di indurre un'IEA. Ciò si verifica con frequenze molto diverse da virus a virus, in relazione alla diversa patogenicità ed alle diverse aree geografiche di endemia.

L'attribuzione etiologica certa di un episodio di IEA ad un virus epatitico si ha solo quando è possibile documentare la presenza di anticorpi di classe IgM diretti verso componenti virali. Utilizzando tale criterio, si osserva che i virus maggiormente implicati sono il virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite delta (HDV), mentre il virus dell'epatite A (HAV) e dell'epatite E (HEV) sono responsabili di una minoranza dei casi; il virus dell'epatite C (HCV) interviene solo in una minoranza dei casi (le segnalazioni di epatite acuta fulminante sono rarissime).

La maggior parte dei casi di IEA compare in soggetti HBsAg-positivi. Essa non è tuttavia sempre imputabile al virus HBV. Esistono almeno quattro possibilità etiologiche, e cioè che la sindrome sia dovuta: 1) ad infezione con il solo

HBV; 2) a coinfezione tra HBV e HDV; 3) a superinfezione da HDV in portatore «apparentemente sano» di infezione da HBV; 4) infine, a sovrapposizione dell'HBV con uno o più agenti infettivi noti o ignoti.

Le differenze cliniche tra queste forme sono minime e spesso non discriminabili. La prognosi dell'IEA da HBV e da HBV/HDV è generalmente grave, con mortalità superiore all'80% dei casi. Poiché nel 40-50% delle IEA che si osservano in pazienti positivi per HBsAg vi è evidenza di infezione da HDV — dato molto superiore alla prevalenza di anticorpi anti-HDV nei portatori di HBsAg —, si ritiene che l'infezione HBV/HDV comporti un aggravamento della prognosi rispetto all'infezione da solo HBV.

Prima della scoperta del virus HCV, circa il 20-40% dei casi di IEA veniva attribuita, in via presuntiva, a epatiti «non-A, non-B». Mancavano peraltro totalmente *marker* virologici e altri fattori di rischio noti. Attualmente, mentre è chiaro che circa l'80% delle epatiti acute post-trasfusionali «non-A, non-B» sono dovute ad HCV, non altrettanto può dirsi delle IEA prima classificate come «non-A, non-B». L'HCV infatti è raramente causa di un'epatite acuta clinicamente rilevabile. Ciò rende spesso difficile individuare il momento di esordio dell'infezione. A ciò si aggiunga che il riscontro di IgM anti-HCV è ritenuto di scarso significato diagnostico. I dati disponibili suggeriscono peraltro che l'HCV non svolga un ruolo di primo piano nella genesi dell'IEA, per lo meno come agente unico. È possibile però che l'HCV abbia maggiore importanza in associazione all'infezione da HBV. L'IEA di tipo «non-A, non-B» o comunque a «sierologia negativa» ha una prognosi grave, con mortalità di circa l'80%, ed è generalmente caratterizzata da un decorso di tipo subfulminante.

TAB. III. CAUSE DI INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA

Virus	
HBV	
HDV	
HAV	
HEV	
HCV (raramente)	
(Herpesvirus 1)	
(Citomegalovirus)	
(Adenovirus)	
Farmaci	
Danno tossico	
Ipersensibilità	
Reazioni idiosincrasiche	
Tossine	
Idrocarburi	
<i>Amanita phalloides</i>	
Solventi	
Cause ischemiche	
Malattia veno-occlusiva del fegato	
Infarto miocardico	
Embolia polmonare	
Sindrome di Budd-Chiari	
Cause metaboliche	
Malattia di Wilson	
Steatosi gravidica acuta	
Sindrome di Reye	
Cause neoplastiche	
Neoplasie maligne infiltranti il fegato	
Cause infettive	
Tubercolosi disseminata	
Ascesso amebico	

In Italia, l'HAV è responsabile dell'1-2% dei casi di IEA. Dati simili sono stati riportati in altri paesi europei e negli U.S.A., mentre prevalenze più elevate sono state riscontrate in Inghilterra (sino al 5%) ed in Cile, soprattutto tra i bambini. Si calcola che lo 0,1-0,3% dei casi di epatite acuta da HAV evolva in IEA. Poiché in molti paesi, tra cui l'Italia, l'endemia da HAV è in diminuzione grazie al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, l'incidenza di casi di IEA imputabili ad HAV è anch'essa in diminuzione. Tra i diversi virus epatitici, l'HAV è quello che determina l'IEA con prognosi più favorevole (guarigione spontanea nel 40% dei casi).

L'HEV è implicato nell'insorgenza di IEA soprattutto in Asia ed Africa. Questo virus enterico si trasmette, al pari dell'HAV, per via oro-fecale ed è causa di rilevanti epidemie. Tipicamente determina IEA nelle donne gravide, nelle quali l'infezione raggiunge una mortalità del 40%.

Altri virus potenzialmente epatitici, come il virus di Epstein-Barr, l'herpesvirus I, il citomegalovirus, e gli adenovirus sono stati occasionalmente implicati come agenti etologici di IEA, spesso in associazione a terapie immunosoppressive.

Farmaci

La tossicità da farmaci è la principale causa non infettiva di IEA, essendo responsabile di circa il 20% dei casi. Tale evenienza può essere dovuta ad un effetto tossico dose-dipendente del farmaco, ad ipersensibilità allergica od a reazione di tipo idiosincrasico. La sindrome è più frequente nei soggetti di età superiore a 40 anni ed assume generalmente un decorso di tipo subfulminante. Pur trattandosi di un'evenienza relativamente rara, la sindrome può essere causata da un gran numero di farmaci. Tra questi, quelli più spesso responsabili sono il paracetamolo (prototipo di danno tossico dose-dipendente), l'isoniazide (prototipo di reazione idiosincrasica), gli antinfiammatori non steroidei, l'alotano, gli antidepressivi triciclici, i sulfamidici. Una lista dei farmaci che sono stati implicati in reazione idiosincrasica o da ipersensibilità è riportata nella tab. IV. L'IEA da paracetamolo, relativamente poco frequente in Italia, è la causa più frequente di morte per suicidio in Gran Bretagna, malgrado sia disponibile un antidoto efficace come l'aceticisteina. Il danno da paracetamolo è tipicamente potenziato dal digiuno e dalla contemporanea assunzione di alcool o di farmaci «induttori enzimatici», come i barbiturici.

La prognosi dell'IEA da farmaci è generalmente molto grave, con mortalità eccedenti il 90%, ad eccezione dei casi dovuti ad isoniazide ed a paracetamolo. Poiché il decorso della sindrome è spesso aggravato dal protrarsi dell'assun-

zione del farmaco, la pronta sospensione dell'agente causale può essere determinante nel salvare la vita del paziente.

Avvelenamenti

L'IEA può essere dovuta ad avvelenamenti accidentali da agenti chimici o da tossine vegetali. Tra i primi sono gli avvelenamenti da idrocarburi fluorati, come il tricloroetilene ed il tetracloroetano, che determinano danno epatico e renale acuto. Tra le seconde, è tipico l'avvelenamento dovuto all'ingestione del fungo *Amanita phalloides*, che ogni anno causa un non trascurabile numero di morti, specie in Italia, Francia e California (v. FUNGHI VELENOSI).

Altre cause

Altre cause, meno frequenti, di IEA sono rappresentate da: 1) lesioni vascolari responsabili di ischemia epatica acuta, come l'infarto miocardico, l'embolia polmonare, la sindrome di Budd-Chiari acuta, la malattia veno-occlusiva in corso di chemioterapia o dopo trapianto di midollo osseo; 2) neoplasie responsabili di infiltrazione epatica con ischemia da ostruzione vascolare e/o sinusoidale; 3) malattie metaboliche, come l'esordio acuto di un morbo di Wilson od una steatosi acuta in corso di gravidanza; 4) malattie infettive, come una tubercolosi disseminata o un ascesso amebico.

Patogenesi

Anche nei casi in cui è possibile identificare il presunto agente causale, il meccanismo di insorgenza dell'IEA rimane per lo più oscuro. La somiglianza del quadro clinico indotto dalle varie cause e la frequente comparsa di un quadro «simil-shock» suggerisce che siano in gioco fattori comuni, indipendentemente dall'etiologia. È possibile che l'endotossinemia, costantemente presente, ed il conseguente abnorme rilascio di citochine, siano almeno in parte coinvolti. Tuttavia, rimane oscuro il motivo per il quale solo una piccola parte dei soggetti esposti al fattore etiologico sviluppa l'IEA, mentre la maggior parte sviluppa una malattia blanda o rimane indenne. Tra le diverse ipotesi formulate, è da segnalare quella della possibile precipitazione massiva di immunocomplessi a livello dei sinusoidi, con conseguente necrosi ischemica degli epatociti. Un tale meccanismo «iperimmune» potrebbe essere in causa nella sindromi indotte dall'HBV, attraverso l'eliminazione troppo rapida delle particelle virali. Altre ipotesi plausibili sono rappresentate dalla sommazione del danno citopatico diretto o immunomediato indotto da più virus o da virus e tossine. La mancata conoscenza dei moventi patogenetici ha di fatto impedito di individuare forme terapeutiche efficaci nel trattamento dell'IEA, ad eccezione del già citato caso dell'avvelenamento da paracetamolo.

Per quanto riguarda le patogenesi dell'encefalopatia epatica che consegue all'IEA, si rimanda alla voce TOSSICOSI EPATICA* (Agg. I, coll. *7154-7167).

Quadro clinico

La diagnosi deve essere posta o sospettata con prontezza, poiché nella maggioranza dei casi la sopravvivenza del paziente dipende esclusivamente dalla possibilità di eseguire, entro poche ore o giorni, un trapianto di fegato. Il quadro clinico è caratterizzato dall'insorgenza, in un soggetto in precedenza sano, di malessere e nausea, seguiti da ittero ingravescente e deterioramento dello stato mentale che evolve in coma di grado IV. La rapidità degli eventi, che può portare un soggetto sano alla morte in un periodo di 2-10 giorni, spesso non consente di raccogliere un'anamnesi accurata. Il quadro clinico può essere confuso con quello di una sepsi da gramnegativi. L'esame obiettivo mette in evi-

TAB. IV. PRINCIPALI FARMACI RESPONSABILI DI INSUFFICIENZA EPATICA ACUTA DA IPERSENSIBILITÀ O DA IDIOSINCRASIA

Cause frequenti	Cause rare
Isoniazide	Ketoconazolo
Alotano	Carbamazepina
Fentonia	Ofloxacina
Valproato	Labetalolo
Sulfonamidi	Flutamide
Amiodarone	Imipramina
Propiltiouracile	Niacina
Disulfiram	Interferone-α

denza l'ittero e talora la mancata ottusità dell'area epatica alla percussione, indice di drastica riduzione della massa del fegato. I casi subfulminanti hanno un esordio più lento, spesso associato alla comparsa di danno renale e hanno una prognosi quasi sempre sfavorevole.

La conferma del sospetto diagnostico di IEA si ottiene sulla base del riscontro di una gravissima compromissione della capacità coagulativa del sangue (attività protrombinica inferiore al 10-20%) e di una marcata elevazione delle transaminasi. Nelle fasi successive le transaminasi possono però ridursi, non riflettendo più la gravità della sindrome. Altri rilievi di laboratorio sono l'iperbilirubinemia, l'iperammoniemia, la riduzione delle piastrine e l'aumento della creatinina, entrambi questi ultimi fattori prognostici negativi, poiché indicano il possibile sovrapporsi di coagulazione intravascolare e di danno renale. Al contrario, l'eventuale aumento dell' α -fetoproteina rappresenta un fattore prognostico favorevole, spia di ripresa rigenerativa del fegato.

I pazienti con IEA di tipo fulminante sviluppano nel 75-80% dei casi edema cerebrale, evento poco frequente quando il decorso è di tipo subfulminante. L'edema cerebrale dipende dall'alterazione delle membrane cellulari e della permeabilità della barriera emato-liquorale. Esso determina ipertensione endocranica con riduzione della perfusione cerebrale ed ischemia cerebrale. Nei pazienti che sopravvivono, per recupero spontaneo della funzione epatica, o perché sottoposti a trapianto di fegato, possono residuare danni neurologici dovuti al prolungarsi della fase ischemica. Per tale motivo in alcuni centri ove si esegue il trapianto di fegato viene monitorizzata la pressione intracranica. L'uso di diuretici, particolarmente di quelli osmotici come il mannitolo, sembra essere l'unico mezzo terapeutico parzialmente in grado di contrastare l'edema cerebrale. Altre misure terapeutiche proposte, come il cortisone, il pentobarbital o l'iperventilazione, sono risultate inefficaci.

Molti pazienti presentano emorragie digestive o cutanee, che richiedono il ricorso a trasfusioni di piastrine e plasma fresco. Queste misure sono tuttavia inefficaci al di fuori di una sindrome emorragica, anche in presenza di grave piastrinopenia e disturbo coagulativo.

Terapia

Il trattamento medico dell'IEA ha come unico scopo quello di «guadagnare tempo» nella speranza che si verifichi uno dei due soli eventi risolutivi, il recupero funzionale dell'organo o il trapianto di fegato. In loro assenza l'evoluzione della sindrome è invariabilmente infausta e, pertanto, ogni misura terapeutica deve ritenersi inefficace. Tutti gli approcci terapeutici cosiddetti «eroici» si sono rivelati alla lunga non risolutivi. La lunga lista di terapie inefficaci comprende i corticosteroidi, l'eparina, l'insulina, il glucagone, l'emodialisi ed altri metodi di filtrazione del plasma o del sangue. L'utilità delle prostaglandine endovenose è in corso di verifica. Recentemente sono stati sviluppati sistemi bioartificiali costituiti da colture di epatociti suini in appositi supporti che consentono la filtrazione del sangue. L'uso di tali sistemi ha dato risultati incoraggianti nel cane ed è in sperimentazione nell'uomo. Un altro settore di ricerca in forte espansione è quello dei fattori di crescita epatocitaria. Sono stati individuati numerosi fattori di crescita, alcuni dei quali, sequenziati e prodotti in forma pura, sono attualmente in studio come potenziali farmaci. Se efficaci, potrebbero incrementare il numero dei pazienti che vanno incontro a rigenerazione epatica spontanea.

La terapia medica attuale consiste essenzialmente in misure di terapia intensiva. È fondamentale che il paziente con IEA sia prontamente avviato ad un centro per i tra-

pianti di fegato e possibilmente mantenuto in reparto di terapia intensiva. I livelli di glicemia e di elettroliti debbono essere monitorizzati per la tendenza all'ipoglicemia ed all'alcalosi respiratoria. Utile la somministrazione di H_2 -antagonisti per prevenire possibili ulcere da stress. Gli squilibri pressori debbono essere controllati senza eccessivo ricorso alla dopamina, che può aggravare l'ipossigenazione periferica. Antibiotici a largo spettro devono essere somministrati secondo necessità. L'uso di aminoacidi ramificati per via endovenosa è possibile, sebbene controverso. L'encefalopatia epatica va controllata mediante somministrazione frequente di lattuloso via tubo naso-gastrico e/o clistere.

Il trapianto di fegato eseguito in urgenza è l'unica forma di terapia risolutiva. Se necessario, il trapianto può essere eseguito anche senza tenere conto della compatibilità ABO tra donatore e ricevente. Ciò comporta tuttavia il 50-60% di indicazioni al re-trapianto con un organo compatibile. I risultati attuali del trapianto in urgenza indicano una sopravvivenza a distanza nel 50-65% dei casi, inferiore quindi a quella dei trapianti elettivi, ma ben superiore alla probabilità di sopravvivenza dei pazienti con IEA non sottoposti a trapianto. Le cause più frequenti di insuccesso del trapianto di fegato eseguito in urgenza sono la non-funzione primaria dell'organo, la decerebrazione e le infezioni.

V. anche: FEGATO E VIE BILIARI, *trapianto del fegato* (Agg. I, coll. *3126-3170; Agg. II, coll. **2228-2251).

Bibliografia

- Angelico M., Capocaccia L., *Dig. Dis. Sci.*, 1991, **36**, 775.
Bernueau J., Rueff B., Benhamou J.-P., *Semin. Liver Dis.*, 1986, **6**, 97.
Ede R. J., Williams R., *Semin. Liver Dis.*, 1986, **6**, 107.
Gimson A. E. S., O'Grady J., Ede R. J. et al., *Hepatology*, 1986, **6**, 288.
Lee W. M., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 1862.
Lee W. M., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 1118.
O'Grady J. G., Gimson A. E. S., O'Brien C. J. et al., *Gastroenterology*, 1988, **94**, 1186.

MARIO ANGELICO

CHIRURGIA DEL FEGATO

[v. vol. VI, coll. 1313-1326; Agg. I, coll. *3075-3097]

SOMMARIO

Progressi nelle acquisizioni fisiopatologiche: la tolleranza del fegato all'ischemia (col. 2218). - **La valutazione della riserva funzionale epatica** (col. 2219). - **Le novità nella tecnica delle epatectomie** (col. 2221); **Esclusione vascolare totale**. - **Come estendere i limiti delle epatectomie: l'embolizzazione portale preoperatoria** (col. 2223). - **La chirurgia epatica «estrema»** (col. 2226).

Progressi nelle acquisizioni fisiopatologiche: la tolleranza del fegato all'ischemia

È largamente dimostrata la buona tolleranza del fegato all'ischemia normotermica anche per periodi che eccedono i 60 min. In un f. normale ed in un paziente normovolemico il clampaggio temporaneo del peduncolo epatico all'ilo (*manovra di Pringle*) non determina ripercussioni emodinamiche importanti; le alterazioni bioumorali per clampaggi entro i 60 min consistono in un aumento degli enzimi di citonecrosi fino a 10-13 volte i valori normali, ed in minor misura in un aumento della bilirubina e della fosfatasi alcalina. Tutte queste alterazioni rientrano costantemente nella norma entro le prime settimane dall'intervento e non sembrano essere in relazione con la durata del clampaggio, inferiore o superiore a 30 min, fino a periodi di ischemia di 60 min.

Il clampaggio del peduncolo epatico è una manovra molto utile in chirurgia epatica per limitare le perdite ema-

tiche e ridurre le richieste di trasfusioni che rappresentano uno dei principali fattori connessi con la morbidità postoperatoria (Gozzetti *et al.*, 1995). Tuttavia i dati che si riferiscono alla tolleranza del f. all'ischemia riguardano esperienze cliniche o sperimentali su f. normali. Nei f. alterati per epatite cronica o cirrosi o colestasi cronica o steatosi massiva, l'ischemia prolungata può costituire un danno severo sul parenchima responsabile di insufficienza epatica postoperatoria. Per limitare il danno da ischemia, Makuuchi ha proposto il clampaggio intermittente del peduncolo epatico seguito da brevi periodi di riperfusione (Makuuchi *et al.*, 1987). L'effetto protettivo del clampaggio intermittente è stato dimostrato in studi sperimentali sul ratto (Isuzaki *et al.*, 1992) ed è largamente impiegato nella pratica clinica, nella chirurgia del f. cirrotico. Tuttavia le conseguenze del danno epatico da ischemia da riperfusione non sono a tutt'oggi chiare.

Un contributo alla comprensione degli effetti fisiopatologici dell'ischemia epatica deriva da una serie di studi sperimentali *in vitro* su cellule isolate, *ex vivo* nel fegato isolato e perfuso di ratto ed *in vivo*. Nell'animale da esperimento periodi di ischemia intermittente, quando comparati con periodi di ischemia continua della stessa durata, riducono la sofferenza cellulare in termini di incremento degli enzimi di citonecrosi e inoltre riducono la deplezione energetica e lo stato antiossidante tissutale. Inoltre il periodo di riperfusione è caratterizzato da una ridotta formazione di radicali liberi dell'ossigeno e di una diminuita liberazione di enzimi di citonecrosi (Gasharrini *et al.*, 1994). Uno studio clinico randomizzato recente ha confermato la migliore tolleranza del clampaggio intermittente in termini di aumento postoperatorio degli enzimi di citolisi e nei pazienti cirrotici, in termini di incremento della bilirubinemia e della comparsa di insufficienza epatica postoperatoria (Pierangeli e Belghiti, 1996).

Questi risultati inducono a non prolungare il periodo di ischemia nel f. cirrotico e confermano la tendenza a preferire il clampaggio intermittente.

La valutazione della riserva funzionale epatica

La valutazione preoperatoria della funzionalità epatica è indispensabile nella programmazione delle resezioni epatiche estese e particolarmente nella chirurgia del f. cirrotico. La classificazione di Child-Pugh (v. tab. I, coll. *1599-1600 dell'Agg. I) è il metodo più immediato e comune per determinare l'entità della insufficienza epatica, basato su parametri di laboratorio semplici e facilmente realizzabili (bilirubina, albumina, attività protrombinica), sulla presenza di ascite e sulla valutazione dell'encefalopatia e dello stato nutrizionale. Tuttavia questo sistema di valutazione non è sempre completo e corretto. I livelli sierici di bilirubina possono dipendere da altri fattori non in rapporto con l'insufficienza epatica (ostruzione biliare, colangiti, malattie colestatiche croniche). Le stesse considerazioni possono valere per l'albumina e per l'attività protrombinica che può risultare alterata per un ridotto assorbimento intestinale di vitamina K; la valutazione dell'encefalopatia e dello stato nutrizionale possono risultare influenzate dal singolo osservatore.

Nell'ultimo decennio si è cercato di precisare l'entità dell'insufficienza epatica con test funzionali più affidabili come il test all'aminopirina, la clearance dell'indocianina verde, il *redox tolerance test*, oltre al più convenzionale test al galattoso. Tuttavia questi test risultano più complessi e possono essere alterati in presenza di condizioni che si possono associare all'insufficienza epatica come l'ascite o l'ittero.

Più recentemente sulla base dell'esperienza dei donatori d'organo per trapianto, è stato introdotto il test alla lido-

caina per la valutazione della riserva funzionale epatica (Oellerich *et al.*, 1987). La lidocaina è metabolizzata quasi esclusivamente dagli epatociti, a livello del citocromo P450 e trasformato in monoetilglicinexilidide (MEGX). Quindici min dopo un'iniezione a bolo di 1 mg/kg di lidocaina i livelli di MEGX vengono dosati in un unico prelievo ematico e quantificato in ng/ml. Il dosaggio con l'immunofluorescenza è rapido e semplice, con costi limitati. I valori di MEGX superiori a 50 ng/ml vengono considerati normali, tra 25 e 50 ng/ml mediamente ridotti ed inferiori a 25 ng/ml fortemente ridotti.

L'iniezione di lidocaina nei dosaggi previsti dal test è praticamente scevra da effetti collaterali. Nella nostra esperienza 200 pazienti con varia patologia epatica sono stati valutati con il test alla lidocaina in associazione con altri esami convenzionali che includono i parametri della classificazione di Child.

La tab. V riporta i risultati di questa indagine in pazienti affetti da tumori maligni primitivi del fegato in assenza di epatopatia cronica, di metastasi epatiche ed in un gruppo di 112 pazienti cirrotici. Il 95% dei pazienti cirrotici avevano un MEGX alterato, mentre solo il 20% dei non cirrotici avevano un MEGX ridotto. Viceversa i parametri della classificazione di Child nel gruppo dei pazienti cirrotici studiati (la maggior parte dei quali [80 casi] candidati ad una resezione epatica e quindi con «buona» funzione epatica residua) risultano alterati nel 73% per la bilirubina, ed in meno del 50% dei casi per l'albumina e l'attività protrombinica. Il MEGX test è quindi risultato altamente sensibile per dimostrare un epatopatia cronica. I valori di MEGX inoltre non sono risultati costantemente correlati con la classificazione di Child (tab. VI). Ottanta pazienti nel gruppo dei cirrotici considerati risultavano Child A. Di questi solo 8 avevano un valore di MEGX inferiore a 50 ng/ml, mentre 16 avevano valori di MEGX molto ridotti, inferiori a 25 ng/ml. Il MEGX test è risultato costantemente ridotto nei pazienti Child B e C. In questo ultimo gruppo [32 casi] nessun paziente aveva un MEGX superiore a 50 ng/ml. Cinquanta dei pazienti cirrotici studiati hanno avuto una resezione epatica segmentaria per epatocarcinoma. I pazienti con MEGX ridotto hanno avuto una incidenza di complicanze postoperatorie legate all'insufficienza epatica (ascite, infezioni, ittero) decisamente maggiore rispetto ai pazienti con MEGX più elevato e non in rapporto con l'estensione della resezione epatica.

Il test della lidocaina inoltre può essere utile in caso di insufficienza epatica acuta da epatite fulminante o da insufficienza epatica conseguente ad ampie resezioni di fegato.

TAB. V. ALTERAZIONE DEI PARAMETRI LABORATORISTICI IN 200 PAZIENTI CON DIVERSA PATOLOGIA EPATICA. I NUMERI ESPRIMONO, IN PERCENTUALE, LE VARIAZIONI DEI SINGOLI PARAMETRI DI LABORATORIO

	Epatocarcinoma %	Metastasi %	Cirrosi %	Altro %
GOT	15,5	15,4	79,5	27,7
GPT	1,6	15,4	70,9	33,6
Fosfatasi alcalina	29,3	40,9	49,4	31,3
GGT	57,4	73,1	59,1	39,6
Bilirubina	52,9	53,8	73,1	57,1
Ammonio	20,0	25,0	57,1	33,3
Albumina	14,0	6,9	48,1	28,6
P.T.	14,3	0,0	34,6	7,1
Colinesterasi	0,0	0,0	61,1	21,5
MEGX	23,0	21,1	95,1	28,2

TAB. VI. VALUTAZIONE DEL MEGX IN PAZIENTI CIRROTICI (112 CASI). CINQUANTA DI QUESTI PAZIENTI SONO STATI SOTTOPOSTI A RESEZIONE EPATICA SEGMENTARIA PER EPATOCARCINOMA

Classificazione di Child	MEGX (ng/ml)	N. casi	Operati	Complicazioni post-operatorie
CHILD A (80 casi)	> 50	8	8	0
	25-50	56	24	5 (21%)
	< 25	16	15	11 (73%)
CHILD B e C (32 casi)	> 50	0	0	0
	25-50	2	0	0
	< 25	30	3	3 (100%)

In queste condizioni il test permette una rapida valutazione del danno epatico non influenzata dalle infusioni di liquidi o di plasma fresco che possono alterare i parametri di laboratorio convenzionali.

Il test alla lidocaina ci sembra molto sensibile per diagnosticare la presenza di una epatopatia cronica e più fedele della classificazione di Child per quantificare l'entità dell'insufficienza epatica.

La valutazione «funzionale» nei pazienti cirrotici deve comunque comprendere anche lo studio di altri organi come cuore, polmone e reni. Anche il diabete può influenzare la comparsa di complicanze postoperatorie. Queste ultime inoltre possono spesso essere in relazione con altri fattori che dipendono dall'atto chirurgico di per sé in termini di trauma chirurgico, prolungati clampaggi del peduncolo epatico, devascularizzazione di aree di parenchima, quantità di parenchima asportato con il tumore e necessità di trasfusioni perioperatorie.

Le novità nella tecnica delle epatectomie

Esclusione vascolare totale

La tecnica introdotta da Healey e popolarizzata da Huguet (Huguet *et al.*, 1978) consiste nel clampaggio del peduncolo epatico all'ilo e della vena cava al di sopra e al di sotto del f. in modo da escludere completamente la circolazione epatica, sia quella afferente dal peduncolo glissoniano che quella reflua dalla vena cava. L'esclusione vascolare consente di operare su un parenchima completamente esangue ed è indicata in presenza di situazioni particolari: le indicazioni elettive sono rappresentate dalle lesioni neoplastiche che infiltrano la vena cava o la convergenza cavo-sovraepatica; le indicazioni opzionali sono tutte quelle situazioni a rischio emorragico particolarmente importante come i tumori voluminosi posteriori o le lesioni che sconfinano da un emifegato all'altro e che richiedono un'epatectomia allargata, ed inoltre i tumori del lobo caudato a rischio di lesione della vena cava. L'esclusione vascolare è stata impiegata nella nostra esperienza in meno del 5% delle resezioni epatiche.

Le conseguenze emodinamiche dell'esclusione vascolare totale del f. sono ben note e consistono in una diminuzione dell'indice cardiaco (v. CUORE, IV, 1697) dal 30 al 60% e della pressione capillare polmonare, mentre aumentano la frequenza cardiaca e le resistenze vascolari periferiche, fattori questi ultimi che compensano le ripercussioni sulla pressione arteriosa sistemica. Diversi elementi concorrono a modificare la risposta individuale al clampaggio vascolare come il volume del sangue circolante, la funzione cardiaca, oltre che la presenza di circoli collaterali porto-sistemici e cavo-cavali e l'intensità della risposta vasocostrittrice. Le variazioni individuali al clampaggio comportano la neces-

sità di eseguire sistematicamente un test di clampaggio prima di iniziare la sezione del f. Un monitoraggio anestesio-logico completo, che includa la determinazione dell'indice cardiaco e della pressione capillare polmonare, è indispensabile nella programmazione degli interventi in esclusione vascolare totale del f. Prima di iniziare il test di clampaggio bisogna correggere un'eventuale ipovolemia o una condizione di anemia preesistente il momento del clampaggio. Durante la prova del clampaggio bisogna escludere interferenze con farmaci dell'anestesia (come gli alogenati che possono dare un effetto di vasodilatazione) e non bisogna infondere amine vasocostrittrici né intensificare ulteriormente il riempimento. Il limite accettato è una riduzione della pressione arteriosa non al di sotto del 30% del valore prima del clampaggio.

La tolleranza emodinamica al clampaggio è generalmente buona a condizione di rispettare alcuni accorgimenti particolari per i quali si rivela fondamentale la collaborazione con l'équipe anestesio-logica. Nei pazienti con corretto riempimento vascolare e senza una situazione di anemia, l'intolleranza emodinamica al clampaggio può dipendere da una cardiopatia preesistente o da un trattamento cronico con β -bloccanti che alterano la risposta vasocostritttrice e riducono la frequenza cardiaca. Il più delle volte comunque l'alterazione emodinamica è in rapporto con una tecnica non corretta del clampaggio per cui il f. continua a ricevere una quantità di sangue che resta intrappolata nel parenchima creando una situazione di sequestro ematico. Generalmente in queste condizioni il sangue deriva da una collaterale della vena cava, vena diaframmatica posteriore o vena surrenalica destra, non compresa nel clampaggio cavale. In questo caso il f. appare congesto e la resezione condotta in queste condizioni può risultare fortemente emorragica.

L'intolleranza emodinamica al clampaggio in assenza di un problema tecnico o di una corretta assistenza anestesio-logica è poco frequente e può osservarsi nei pazienti con cardiopatia ischemica o con cardiopatia indotta da chemioterapia prolungata o dall'uso di β -bloccanti che riducono l'adattabilità cardiaca alla caduta della volemia. Una intolleranza emodinamica reale al clampaggio, con caduta dell'indice cardiaco di oltre il 50%, può indicare la necessità di associare un clampaggio aortico al di sotto dei pilastri diaframmatici. È da sottolineare tuttavia che il clampaggio aortico prolungato comporta un rischio importante di ischemia renale ed intestinale. Un'altra soluzione più logica in questi casi è l'applicazione di un *bypass* venoso alimentato da una Bio-Pump* come si realizza comunemente nel trapianto di f.

Su 31 casi di esclusione vascolare totale del f. nella nostra esperienza solo una volta si è dovuto rinunciare all'epatectomia dopo un test di clampaggio in una paziente di 65 anni con cardiopatia ischemica. Un parenchima epatico normale tollera una esclusione vascolare fino a 45 min. Recentemente Huguet e collaboratori e Hannoun e collaboratori hanno dimostrato che il clampaggio può essere prolungato, per situazioni particolari, anche oltre un'ora (Hannoun *et al.*, 1993; Huguet *et al.*, 1992). Tuttavia l'attività citolitica postoperatoria è significativamente maggiore dopo esclusione vascolare rispetto al semplice clampaggio del peduncolo e aumenta con la durata del clampaggio. La funzione epatica deve essere normale e molte riserve vengono avanzate a proporre una esclusione vascolare nei pazienti cirrotici e nei pazienti con ostruzione biliare, ad es. nel caso dei tumori dell'ilo (Thomas *et al.*, 1990). L'esclusione vascolare resta quindi una procedura complessa che richiede una assistenza anestesio-logica adeguata ed è da riservare a situazioni particolari di epatectomie più difficili in partico-



Fig. 9. Esclusione vascolare totale del f.

lare in presenza di un interessamento cavale da parte dei tumori epatici.

La tecnica dell'esclusione vascolare prevede una ampia mobilitazione della vena cava retroepatica. Il ligamento dorsale della vena deve essere sezionato in modo da esporre completamente la vena e valutare la presenza di una collaterale diaframmatica posteriore che può sboccare più distalmente nella vena cava. Si seziona il peritoneo che ricopre il bordo sinistro della vena cava restando in contatto con la vena e quindi la si circonda con un passalacci al di sopra e al di sotto del fegato. Il *clamp* inferiore deve essere posizionato molto obliquo sulla vena cava in modo da escludere la vena surrenalica destra: un lungo *clamp* di De-Bakey è particolarmente adatto a tale scopo. Segue il posizionamento del *clamp* sul peduncolo epatico. Sul versante del peduncolo glissoniano bisogna ricercare la presenza eventuale di una arteria epatica sinistra sul versante superiore del legamento epatogastrico: questa arteria deve essere clampata separatamente. Segue il posizionamento del *clamp* sulla vena cava sovraepatica che viene applicato comprendendo una porzione di diaframma ed avendo cura di chiudere con il clampaggio le vene diaframmatiche destre e sinistre e la vena diaframmatica posteriore. È importante che le estremità dei due *clamps* cavali giungano a toccarsi per escludere in tal modo tutte le collaterali venose (fig. 9). Talora, per situazioni particolari in presenza di tumori voluminosi che infiltrano la vena cava o la loggia surrenalica, l'esposizione della vena cava retroepatica non è agevole ed il posizionamento del *clamp* distale avviene senza poter riconoscere lo sbocco della vena surrenalica destra. In questo caso è particolarmente utile il test di clampaggio con valutazione dell'aspetto del f.

Come estendere i limiti delle epatectomie: l'embolizzazione portale preoperatoria

Una epatectomia destra convenzionale è perfettamente tollerata da un f. normale. Anche le epatectomie per traumi, quando tutto il parenchima asportato è sano, non si complicano con segni di insufficienza epatica se non si sono

verificate ischemie prolungate del parenchima o ipotensioni o trombosi portale. Il rischio di insufficienza epatica dopo epatectomia esiste invece se il f. è colestatico o in presenza di epatopatia cronica e soprattutto di cirrosi. Il rischio di insufficienza epatica postoperatoria è da considerare in caso di epatectomia allargata, estesa di un emifegato a uno o più segmenti dell'emifegato controlaterale, in particolare in presenza di un tumore a sede centrale, quando nella porzione da asportare esiste una quota importante di parenchima integro, o se il lobo epatico controlaterale non è ipertrofico.

L'embolizzazione di un ramo portale allo scopo di determinare l'ipertrofia compensatoria del lobo epatico controlaterale nella programmazione di una resezione epatica allargata è stata proposta da Kinoshita *et al.* (1986) e Makuuchi *et al.* (1990). A tutt'oggi esistono più di 100 casi riportati nella letteratura mondiale di epatectomie estese, precedute da embolizzazione portale.

Le basi fisiopatologiche di questa procedura si fondano sugli effetti del flusso portale sulla rigenerazione epatica. La legatura di una branca portale nell'animale da esperimento comporta l'atrofia dell'emifegato corrispondente e l'ipertrofia dell'emifegato controlaterale. Lo stesso fenomeno è noto nell'uomo in caso di trombosi neoplastica di un ramo portale nei tumori dell'ilo epatico.

Gli effetti dell'embolizzazione portale sperimentale sono stati studiati recentemente da Tanaka: ad una settimana dall'embolizzazione il f. controlaterale raddoppia mediamente il suo peso; parallelamente si dimostra un aumento dell'indice mitotico e della sintesi del DNA degli epatociti e un incremento di quasi il doppio del numero delle cellule di Kupffer (Tanaka *et al.*, 1994).

La tecnica preferita per l'embolizzazione è la via percutanea transepatica con l'inserimento di un catetere che dal recesso di Rex viene spinto fino al ramo destro o alle sue branche di divisione anteriore e posteriore. Le sostanze embolizzanti maggiormente impiegate sono il Gelfoam®, il cianoacrilato ed infine le spirali metalliche associate a Gelfoam. Nella nostra esperienza si è data la preferenza alle spirali metalliche che hanno il vantaggio di un agevole controllo radiologico. Dai dati della letteratura il maggiore e più stabile effetto embolizzante sembra ottenersi con il cianoacrilato mentre l'embolizzazione con solo Gelfoam determina più spesso una chiusura incompleta o la ricanalizzazione secondaria della branca portale.

La tolleranza all'embolizzazione è buona. Sul piano clinico non sono state registrate mortalità o complicanze legate alla metodica. Una reazione febbrile modesta è riportata nella maggior parte dei casi, ma con risoluzione spontanea entro 3-7 giorni. Sul piano laboratoristico si osserva costantemente un aumento, seppur lieve, degli enzimi di citonecrosi nei primi giorni dopo il trattamento. Sul piano anatomopatologico non si osservano alterazioni macroscopiche nell'emifegato embolizzato. All'esame istologico dopo embolizzazione con cianoacrilato, si ha una estensione della trombosi fino alle branche portali più periferiche con spesso un infiltrato periportale e fibrosi. La necrosi epatocitaria periportale è rara.

L'aumento massimo di volume del f. residuo si ottiene verso la 40°-50ª giornata dopo embolizzazione con Gelfoam® ed entro il primo mese usando il cianoacrilato. Il volume del fegato residuo aumenta maggiormente dopo cianoacrilato (mediamente del 69%) che non dopo Gelfoam probabilmente in rapporto con il maggior effetto embolizzante del cianoacrilato. Un periodo di 3-4 settimane sembra quindi la distanza ottimale da far intercorrere tra embolizzazione ed epatectomia. L'ipertrofia si osserva sia nei f. non cirrotici che nei pazienti cirrotici. L'incremento volumetrico

è più limitato nei pazienti diabetici. Le serie cliniche più consistenti provengono dall'Estremo Oriente (Kawasaki *et al.*, 1994; Nagino *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1986). Tutti gli studi clinici segnalano una buona tolleranza dell'embolizzazione; l'ipertrofia compensatoria del f. controlaterale è particolarmente evidente quando si realizza un'embolizzazione che sia risultata completa. La morbosità e la mortalità postoperatoria segnalate dopo epatectomia preceduta dall'embolizzazione sono perfettamente accettabili considerato che si tratta di exeresi allargate.

Le indicazioni all'embolizzazione portale preoperatoria restano le epatectomie estese in presenza di un f. residuo di volume ridotto. In presenza di un f. non cirrotico si tratta essenzialmente delle exeresi che non conservano che i segmenti 2-3 ed eventualmente il lobo caudato. Un'indicazione ottimale è costituita dai tumori estesi localizzati nei segmenti centrali del f. che comportano l'exeresi di una massa importante di tessuto sano (fig. 10). Una indicazione particolare sono i colangiocarcinomi dell'ilo epatico che comportano una epatectomia allargata al lobo caudato ed una anastomosi bilio-digestiva (Kawasaki *et al.*, 1994; Makuuchi *et al.*, 1990); in questi casi il rischio di insufficienza epatica legata alla decurtazione parenchimale è aggravato per effetto della colestasi. La metodica è consigliabile se si programma una epatectomia maggiore in f. cirrotico o in presenza di metastasi epatiche multiple lobari quando è richie-

sta una epatectomia destra allargata associata a resezione a cuneo (*wedge resection*) sul lobo sinistro.

La chirurgia epatica «estrema»

Questo termine è stato introdotto recentemente ad indicare resezioni per lesioni voluminose complesse la cui exeresi comporta lunghi periodi di ischemia, superiori a 90 min. o che impongono resezioni e ricostruzioni vascolari a carico del peduncolo glissoniano o delle vene sovraepatiche del fegato restante.

Questa chirurgia si avvale di alcuni supporti tecnologici che derivano dalle tecniche del trapianto come il *hypass* venoso e il sistema di perfusione ipotermica. Le tecniche impiegate si distinguono a seconda che il f. venga mantenuto nella sua sede nell'ipocondrio destro senza interruzione dei peduncoli vascolari (chirurgia *in situ*) o se il f. viene esteriozzato con sezione del peduncolo caule (chirurgia *ex situ*) o se il f. viene completamente rimosso dall'addome con sezione del peduncolo afferente ed efferente e la resezione viene eseguita *su banco* con successivo reimpianto del f. come per un trapianto abituale (chirurgia *ex vivo* o autotrapianto).

La chirurgia *ex situ* si realizza con una esclusione vascolare totale e perfusione ipotermica del f. per poter prolungare l'ischemia epatica di oltre 90 min. La metodica riprende la tecnica descritta da Fortner nel 1974 (Fortner *et*

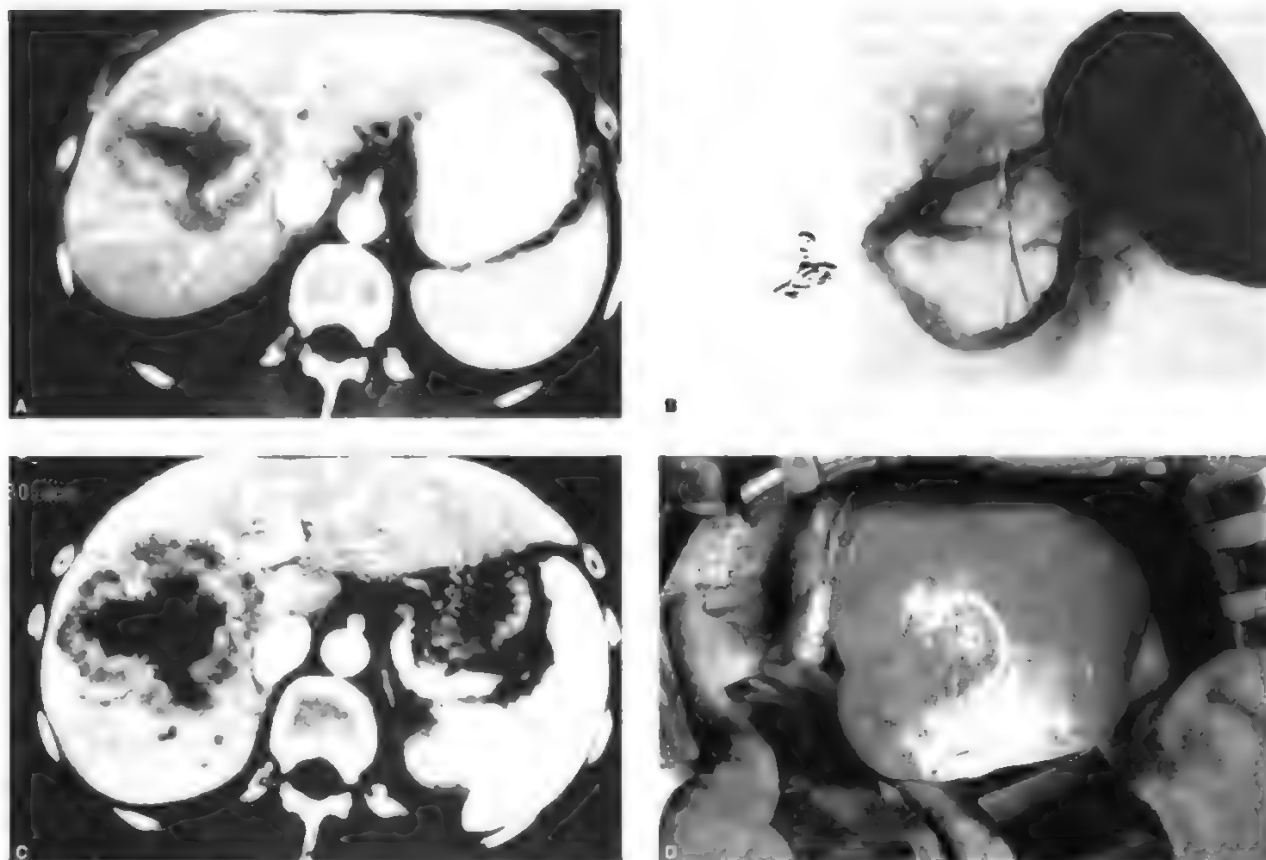


Fig. 10. Embolizzazione portale preoperatoria per voluminosa metastasi centro-epatica. A) TC preoperatoria: la metastasi occupa il 4°, 5° ed 8° segmento epatico. B) Embolizzazione del ramo destro della vena porta con iniezione di spirali metalliche e Gelfoam. C) Controllo TC a 20 giorni dal trattamento. È evidente l'ipertrofia compensatoria del lobo sinistro. D) A un mese dall'embolizzazione, il paziente è stato operato di epatectomia destra allargata al 4° segmento. Il paziente ha avuto un decorso regolare ed è stato dimesso 10 giorni dopo l'intervento.

al., 1974). Le alterazioni indotte dall'ischemia sulla funzione epatica sono perfettamente reversibili, in particolare le alterazioni coagulative e l'attivazione della fibrinolisi. Per ottenere un raffreddamento omogeneo del f. è stata realizzata una guaina in plastica che avvolge l'organo dove circola acqua fredda. La tecnica si realizza come per l'esclusione vascolare convenzionale, clampando la vena cava al di sotto del f., il peduncolo glissoniano e la cava sovraepatica. L'immissione della soluzione ipotermica avviene incannulando la branca portale o arteriosa dell'emifegato da resecare con un catetere siliconato. Il deflusso è assicurato praticando una incisione sulla vena cava sottoepatica a monte del clamp. Il liquido di conservazione proposto è la soluzione di Wisconsin (v. FEGATO E VIE BILIARI*, col. *3151, tab. XV) come per la perfusione del f. da trapiantare; prima della riperfusione il f. dovrà essere lavato con una soluzione di Ringer lattato o di albumina per rimuovere l'eccesso di potassio.

La chirurgia *ex situ* è proposta per lesioni voluminose che invadono la vena cava a livello dell'ilo sovraepatico quando si prevede un'ischemia di lunga durata e quando si rende necessaria la ricostruzione di una vena sovraepatica residua parzialmente infiltrata (Hannoun *et al.*, 1991; Pichlmayr *et al.*, 1990). La vena cava ed il peduncolo glissoniano vengono clampati. Per clampaggi prolungati, al di sopra dei 90 min, è consigliabile il posizionamento di un *bypass* venoso con Bio-pump per evitare la stasi splancica e cavale. L'esteriorizzazione del f. si realizza sezionando all'origine le tre vene sovraepatiche; il peduncolo glissoniano è lasciato intatto. La sezione può compiersi a livello della vena cava se lo sbocco delle vene sovraepatiche è infiltrato. La resezione si compie sul f. perfuso; se si è resa necessaria una resezione del tronco sovraepatico del f. restante, questo viene ricostruito con un *patch* venoso e reimpiantato sulla vena cava come per un trapianto di f. ridotto di volume.

L'autotrapianto di f. consiste in una chirurgia extracorporea *ex vivo*. Il f. è perfuso ed esteriorizzato completamente dalla cavità addominale con sezione della vena cava e degli elementi del peduncolo glissoniano come per un trapianto convenzionale. Il *bypass* venoso è usato sistematicamente. La chirurgia resettiva e l'eventuale ricostruzione dei tronchi venosi del f. residuo procede su banco. Il f. è quindi reimpiantato come per un trapianto convenzionale e quindi rivascolarizzato con l'anastomosi portale, arteriosa e biliare. Questa tecnica, proposta inizialmente da Pichlmayr (Pichlmayr *et al.*, 1990), è riservata a lesioni complesse che da un emifegato invadono l'emifegato contiguo infiltrandone i peduncoli vascolari o a lesioni multiple bilaterali. Si tratta certamente di un procedimento di esecuzione difficile, con pochi casi descritti con successo in letteratura (Hannoun *et al.*, 1991; Pichlmayr *et al.*, 1990) e con morbosità e mortalità non trascurabili. Questa tecnica è da riservare a Centri altamente specializzati con competenza nel campo del trapianto epatico.

Per il trapianto di f. parziale, v. sotto *trapianto di fegato* (**2238-2243).

Questo Aggiornamento II vuole essere un omaggio alla memoria del Prof. Giuseppe Gozzetti, Autore del precedente capitolo sulla *Chirurgia del fegato*, apparso nell'Aggiornamento I (1991).

Bibliografia

- De Baere Th., Roche A., Vivasaur D., *Radiology*, 1993, **188**, 73-77.
 Elias D., Roche A., Vivasaur D., *Ann. Chir.*, 1992, **46**, 404-410.
 Fortner J. G., Shum M. H., Kunne D. W., *Ann. Surg.*, 1974, **180**, 644-652.
 Gasbarrini A., Colantoni A., Caraceni *Hepatology*, 1994, **21**, 1, 74.
 Gozzetti G., Mazzotti A., Gritti G. L., *Br. J. Surg.*, 1995, **82**, 1105-1110.
 Hannoun L., Balladur P., Delva E., *Lancet*, 1991, **337**, 1616-1617.

- Hannoun L., Borie D., Delva E., *Br. J. Surg.*, 1993, **80**, 1161-1165.
 Huguet C., Nordlinger B., Galopin J. J., *Surg. Gynecol. Obstetr.*, 1978, **147**, 689-693.
 Huguet C., Gavelli A., Chicco A., *Surgery*, 1992, **111**, 251-259.
 Isozaki H., Adam R., Gigon M., *Br. J. Surg.*, 1992, **79**, 310-313.
 Kawasaki S., Makuuchi M., Miyagawa S., *J. Am. Coll. Surg.*, 1994, **178**, 480-486.
 Kinoshita H., Sakai K., Hirohashi K., *World J. Surg.*, 1986, **10**, 803.
 Makuuchi M., Mori T., Gunven P., *Surg. Gynecol. Obstetr.*, 1987, **164**, 155-158.
 Makuuchi M., Thai B. L., Takayasu K., *Surgery*, 1990, **107**, 521-529.
 Nagino M., Nimura Y., Kamiya J., *Hepatology*, 1995, **21**, 434-439.
 Oellerich M., Rande E., Burdelski M., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1987, **25**, 123-130.
 Pichlmayr R., Grosse H., Hauss J., *Br. J. Surg.*, 1990, **77**, 71-76.
 Pierangeli F., Belghiti J., *HBP Surgery*, 1996, **9**, 2-25.
 Tanaka H., Kinoshita H., Hirohashi K., *J. Surg. Res.*, 1994, **57**, 687-692.
 Thomas P. G., Baer H. U., Matthews J. B., *Dig. Surg.*, 1990, **7**, 31-33.

ALIGHIERI MAZZIOTTI E ANTONINO CAVALIARI

TRAPIANTO DI FEGATO

[Agg. I, coll. *3126-3170]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2228). - **Indicazioni e risultati** (col. 2229): *Dati generali*. - *Trapianto e cirrosi da HBV*. - *Trapianto e cirrosi da HCV*. - *Trapianto e neoplasie epatiche*. - **Tecnica chirurgica** (col. 2235): *Prelievo dell'organo e legislazione italiana attuale*. - *Nuovi approcci tecnici sul paziente ricevente e tecniche alternative al bypass extracorporeo*. - *Nuove tecniche di trapianto di fegato parziale*. - *Trapianto di fegato ausiliario*. - **Terapia immunosoppressiva** (col. 2245). - **Prospettive future** (col. 2249): *Fegato artificiale (bioartificial liver)*. - *Xenotrapianto*.

Introduzione

Il trapianto epatico nell'uomo, è oggi una procedura elettiva per la maggior parte delle condizioni di insufficienza funzionale irreversibile del fegato [f.]. Il numero di trapianti si è accresciuto esponenzialmente negli ultimi anni (fig. 11) e attualmente sono oltre 2.800 i trapianti eseguiti ogni anno in Europa ed oltre 3.000 negli U.S.A., con una sopravvivenza globale che supera ampiamente il 60% a cinque anni dall'intervento. Sempre più pazienti hanno superato i 10 anni dall'intervento ed alcuni di essi si avvicinano o già superano i due decenni di sopravvivenza.

Grazie alla standardizzazione delle metodiche di espanto, alla preparazione e selezione dei pazienti riceventi e soprattutto per merito della soluzione di preservazione di Wisconsin introdotta da Belzer nel 1987, l'intervento di trapianto epatico può ormai considerarsi eseguibile in condizioni di semielezione con tempi tecnici ed anestesilogici ormai codificati.

L'introduzione recente di nuovi farmaci immunosoppressori, come il tacrolimus (FK-506 [v.*]), ha inoltre permesso un netto ampliamento delle opzioni terapeutiche a disposizione del clinico per il controllo del rigetto e nuovi studi di immunologia tendono a poter indurre una tolleranza stabile nel paziente trapiantato, così che a distanza di anni dall'intervento sia ipotizzabile una progressiva riduzione se non una sospensione dell'immunosoppressione.

Negli ultimi anni numerosi avanzamenti tecnici hanno permesso l'utilizzo di parti del f. donato per i trapianti nei bambini o anche la suddivisione del f. tra due riceventi. Nel caso delle epatiti fulminanti è stato anche possibile trapiantare solo temporaneamente un f. ausiliario, per permettere all'organo nativo di recuperare dall'insulto tossico o virale di cui era stato vittima.

La cultura dei trapianti d'organo si fa strada nella società occidentale e con essa trascina aggiornamenti legislativi e

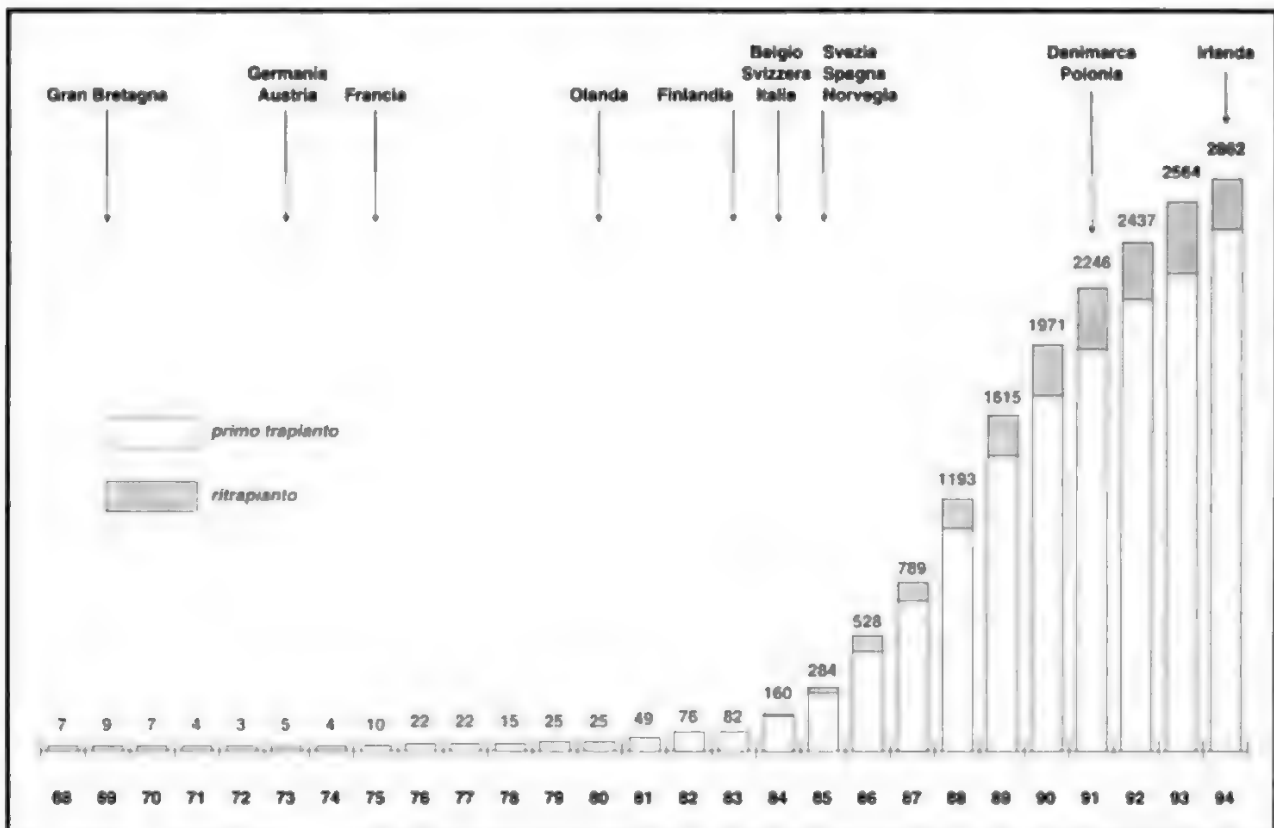


Fig. 11. Evoluzione dei trapianti di f. in Europa. Andamento dei trapianti di f. effettuati in Europa negli anni 1968-94. Le barre tratteggiate rappresentano la quota dei ritrapianti mentre le frecce (in alto) indicano la data del primo trapianto epatico effettuato nei diversi Paesi. (Da European Liver Transplant Registry, Villejuif-France, 1995, ridisegnata).

maggior sensibilità dell'intera opinione pubblica sull'argomento. Diventa cioè opinione comune che gli organi, al pari di molte altre risorse, sono patrimonio della collettività, e che per il suo bene vanno utilizzati.

Molti problemi tuttavia rimangono aperti, soprattutto a causa del sempre più ampio divario tra il numero dei donatori cadavere e quello dei teorici pazienti riceventi. Alla carenza di organi si deve supplire con una maggior programmazione territoriale, con l'incentivazione professionale nelle Rianimazioni e nei Centri Trapianto e con uno sforzo maggiore nella ricerca immunologica che permetta nel futuro, di accedere, almeno in condizioni d'emergenza, a f. artificiali o a organi di animali.

Dei principali progressi raggiunti in quest'ultimo quinquennio si darà conto in questo capitolo, rimandando all'Agg. I per il resto delle informazioni acquisite nel precedente periodo.

Indicazioni e risultati

Dati generali

Le principali indicazioni a trapianto riportate dal Registro Europeo dei Trapianti di Fegato sono nell'ordine: la cirrosi (57%), l'epatite fuminante (12%), le neoplasie epatiche (11%), le malattie colestatiche (11%), le malattie metabolico-enzimatiche (5%) e altre cause più rare (4%) (fig. 12).

Nell'ambito delle cirrosi la più frequente indicazione riguarda le forme post-epatitiche (da virus B, C e delta: 40%), seguita dalle cirrosi alcoliche (25%), le cirrosi biliari

primitive (19%), le cirrosi criptogeniche (8%), le cirrosi autoimmuni (5%) e le cirrosi biliari secondarie (3%).

Dall'analisi degli oltre dodicimila casi sino ad oggi raccolti dallo stesso Registro Europeo è possibile affermare che la sopravvivenza globale dei pazienti dopo trapianto di f. si aggira intorno al 65-70% a distanza di cinque anni dall'intervento. Notevolmente diversi sono però i risultati ottenuti per ciascuna delle varie indicazioni: essi variano dal 40% (per le neoplasie) a quasi l'80%

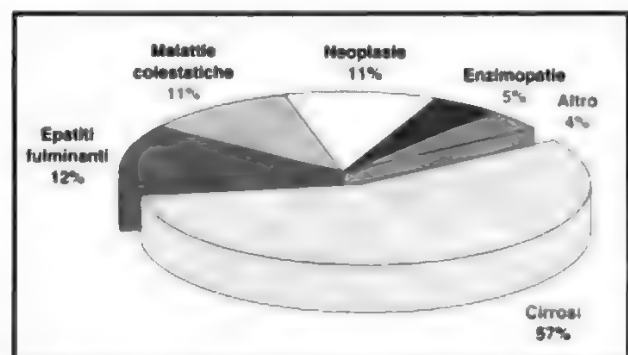


Fig. 12. Indicazioni al trapianto di f. Indicazioni a trapianto di 17095 casi eseguiti in Europa nel periodo 1968-1994. (Da *European Liver Transplant Registry*, Villejuif-France, 1995).

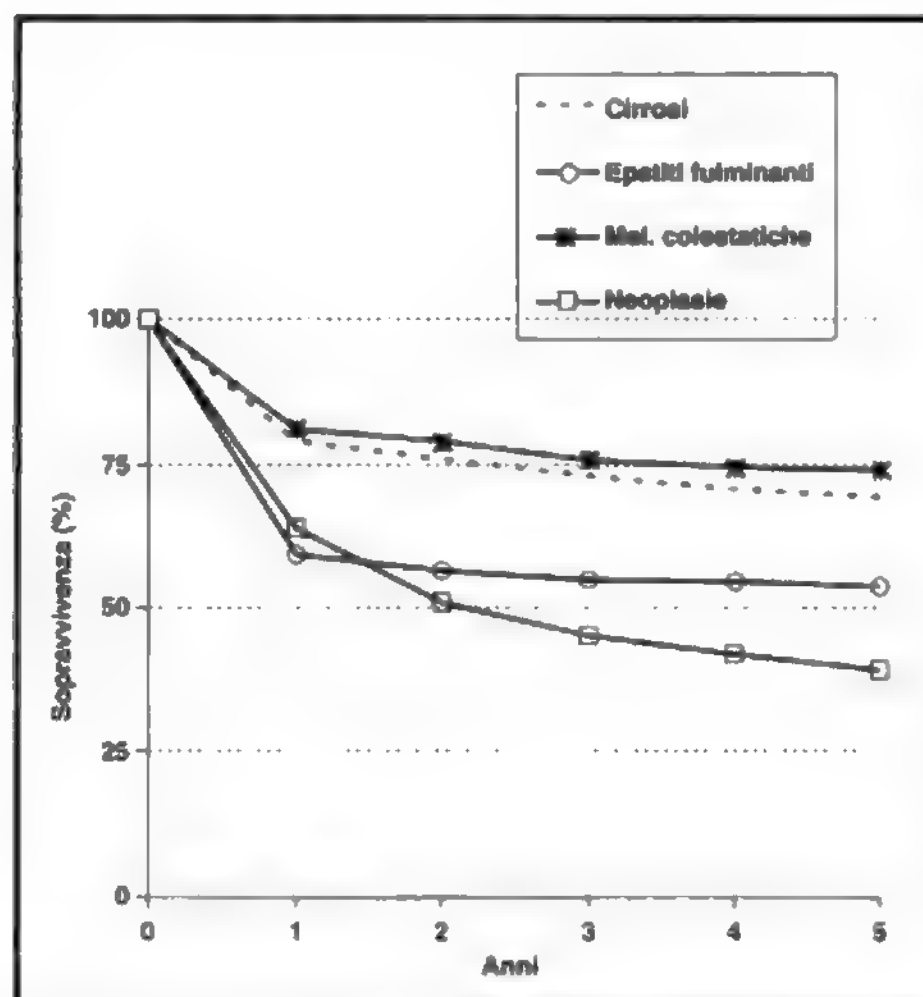


Fig. 13. Curve di sopravvivenza dopo trapianto di f. per quattro delle principali indicazioni. Si noti la similitudine del decorso post-operatorio tra i pazienti trapiantati per neoplasia e per epatite fulminante. (Da *European Liver Transplant Registry, Villejuif-France, 1995*).

per le cirrosi biliari e le malattie colestatiche in genere (fig. 13).

Per quanto riguarda le epatiti fulminanti (che presentano una prognosi severa con una mortalità maggiore dell'80% dei casi) il trapianto è diventato il principale trattamento curativo con sopravvivenze attorno al 50% a cinque anni. La principale difficoltà per questi casi risiede nel decidere in tempi idonei il «timing» dell'intervento e la stessa indicazione a trapianto, dato che alcuni pazienti possono migliorare spontaneamente grazie alle capacità rigenerative del fegato mentre altri rapidamente deteriorano e non rispondono ad alcuna terapia così da rendere urgente e quindi molto problematico il reperimento di un donatore compatibile.

Per le malattie colestatiche e quelle enzimatico-metaboliche non molto è cambiato nelle indicazioni ormai codificate e nei risultati per i quali si rimanda alla fig. 13 e all'Agg. I (coll. *3131-3135).

Alcune puntualizzazioni sono invece necessarie sulle controversie ancora aperte a proposito dell'indicazione a trapianto per le cirrosi postepatiche (tab. VII) e per i tumori.

Trapianto e cirrosi da HBV

Negli ultimi anni, con il riconoscimento di alcuni importanti fattori di rischio correlati alla recidiva del virus dell'epatite B dopo il trapianto, si è assistito ad un progressivo miglioramento dei risultati, sia in termini di sopravvivenza dei pazienti che di rischio di re-infezione del f. trapiantato. Per tali ragioni, l'atteggiamento nei confronti dei candidati a trapianto affetti da epatopatia da HBV è nettamente mutato in favore di un più esteso utilizzo della sostituzione del f. come terapia davvero risolutiva non solo a breve ma anche e soprattutto a lungo termine.

La sopravvivenza post-trapianto dei pazienti con cirrosi da HBV si aggira oggi globalmente sul 65% a cinque anni. L'Italia è una zona ad alta endemia per la frequenza dell'infezione da HBV (2,4% della popolazione, con variazioni notevoli tra lo 0,5% del Nord ed il 10% di alcune zone del Sud) ed infatti è del nostro Paese e dei paesi del Sud-Europa la più importante esperienza di trapianto epatico per questa indicazione. Numerose sono le acquisizioni a questo proposito fatte negli ultimi anni.

Un primo dato certo è che la recidiva virale nel f. trapiantato è estremamente probabile se il trapianto viene eseguito in una fase di replicazione virale attiva (cioè se è presente l'HBV-DNA nel siero del paziente candidato). La percentuale di reinfezione virale è infatti dell'85% nei pazienti HBV-DNA positivi e del 15% nei pazienti HBV-DNA negativi al momento dell'intervento.

Recenti studi che aspettano ulteriori conferme indicano che la somministrazione di nuovi farmaci anti-virali (es. lamivudina [v.**]) in attesa e subito dopo il trapianto potrebbe ottenere la riduzione del virus e l'azzeramento dell'HBV-DNA anche nei pazienti con alta replicazione, permettendo così una netta riduzione del rischio di reinfezione postoperatoria e quindi un prolungamento della sopravvivenza.

L'epatite B recidiva nel fegato trapiantato può essere infatti fatale nella sua evoluzione, e di fatto rappresenta il principale fattore limitante sulla sopravvivenza postrapianto. Proprio per evitare questa complicanza si è definitivamente consolidata la pratica di eseguire una profilassi

TAB. VII. TRAPIANTO DI FEGATO E PRINCIPALI VIRUS EPATITICI

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Famiglia	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Deltaviridae</i>	<i>Incerta</i>
Identificazione	1973	1970	1989	1977	1980
Acido nucleico	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
Genotipi	7	5	> 6	3	3
Trasmissione	oro-fecale	parenterale	parenterale	parenterale	oro-fecale
Cronicizzazione	No	Si	Si	Si	No
Oncogenicità	No	Si	Si	Sconosciuta	No
Decorso fulminante	Raro	Possibile	Raro	Non comune	In gravidanza
Vaccino	Si	Si	No	No	No
Rischio reinfezione post-trapianto	Minimo	HBV-DNA+: alto HBV-DNA-: minimo	> 90%	Basso	?

postrapianto con immunoglobuline specifiche anti-HBs allo scopo di mantenerne un titolo sierico superiore a 200-300 UI/mL. Tale profilassi, se proseguita in permanenza, permette di evitare nella gran parte dei pazienti la reinfezione del f. trapiantato.

Durante il processo di replicazione virale dell'HBV, possono prodursi a caso alcune sottopopolazioni di virus in genere difettivi per certe caratteristiche antigeniche. Uno dei più comuni in Europa è il sottotipo detto HBe-minus, a causa della sua incapacità a produrre l'antigene e (HBeAg). Per particolari condizioni di alterato equilibrio tra queste sottopopolazioni virali o per effetto della pressione immunitaria dell'ospite è possibile che nel postrapianto si sviluppino epatiti acute HBe-negative dovute ad una infezione selettiva da HBe-minus. Tali condizioni sono estremamente pericolose e possono provocare un'insufficienza fulminante dell'organo trapiantato. È possibile che il trattamento immediato con interferone possa avere un effetto positivo su queste forme, anche se più probabilmente è una viremia al momento del trapianto, $> 10^5$ genomi/Eq/mL che seleziona di per sé pazienti a più alto rischio di ripresa di epatite nel f. trapiantato.

Infine è stato provato che la coinfezione con virus Delta esercita una sorta di effetto protettivo dalla recidiva da HBV nel postrapianto. Il rischio di reinfezione è infatti per i pazienti Delta-positivi al momento dell'intervento del 50% inferiore a quello dei casi positivi per il solo HBsAg.

Trapianto e cirrosi da HCV

La cirrosi da virus dell'epatite C rappresenta già oggi almeno il 30% delle indicazioni a trapianto sia in Europa che negli Stati Uniti. Il virus C, inoltre, è coinvolto in oltre il 90% delle patologie croniche del f. una volta definite come

ad etiologia «non-A, non-B». L'HCV è un virus ad RNA caratterizzato da una estrema eterogeneità (tab. VII) e di esso sono stati sino ad oggi classificati almeno 6 genotipi diffusi nel mondo con diversa distribuzione (fig. 14; v. anche EPATITE DA VIRUS**, tab. III, col. **2011). In Italia e Sud-Europa in genere, è molto diffuso il sottotipo 1b che tra tutti è quello che ha la maggior tendenza alla cronicizzazione e la maggiore resistenza alle terapie a base di interferone.

Non essendo al momento disponibile alcun vaccino o terapia specifica, i pazienti sottoposti a trapianto epatico per cirrosi da HCV sono stati per lungo tempo solo «osservati» nel loro *follow-up* e mai trattati in profilassi, analogamente a quanto descritto per l'HBV. Ciò ha permesso di accumulare alcune conoscenze sulla storia naturale dell'infezione dopo la sostituzione del f.

Si è appreso innanzitutto che il rischio di persistenza post-trapianto del virus è altissimo e supera il 90% dei casi. È provato infatti che l'HCV permane in numerose sedi extraepatiche nonostante l'asportazione del f. (linfociti, granulociti, milza, midollo osseo) dalle quali è in grado di migrare, reinfectando il nuovo organo.

Nonostante l'alta infettività post-trapianto, il decorso della malattia a medio termine è imprevedibile: nella maggioranza dei casi essa produce una epatite cronica nel f. trapiantato del tutto asintomatica ma a volte è responsabile di rapidi deterioramenti che assumono il carattere di cirrosi o di epatiti sub-fulminanti, con perdita pressoché inevitabile dell'organo e necessità di ritrapianto (evento questo gravato nel caso dell'HCV da una più alta mortalità rispetto ai ritrapianti per rigetto cronico o per *primary-non-function*).

Nel tentativo di limitare i danni cronici sul f. trapiantato, che potrebbero ridurre la sopravvivenza soprattutto a lungo

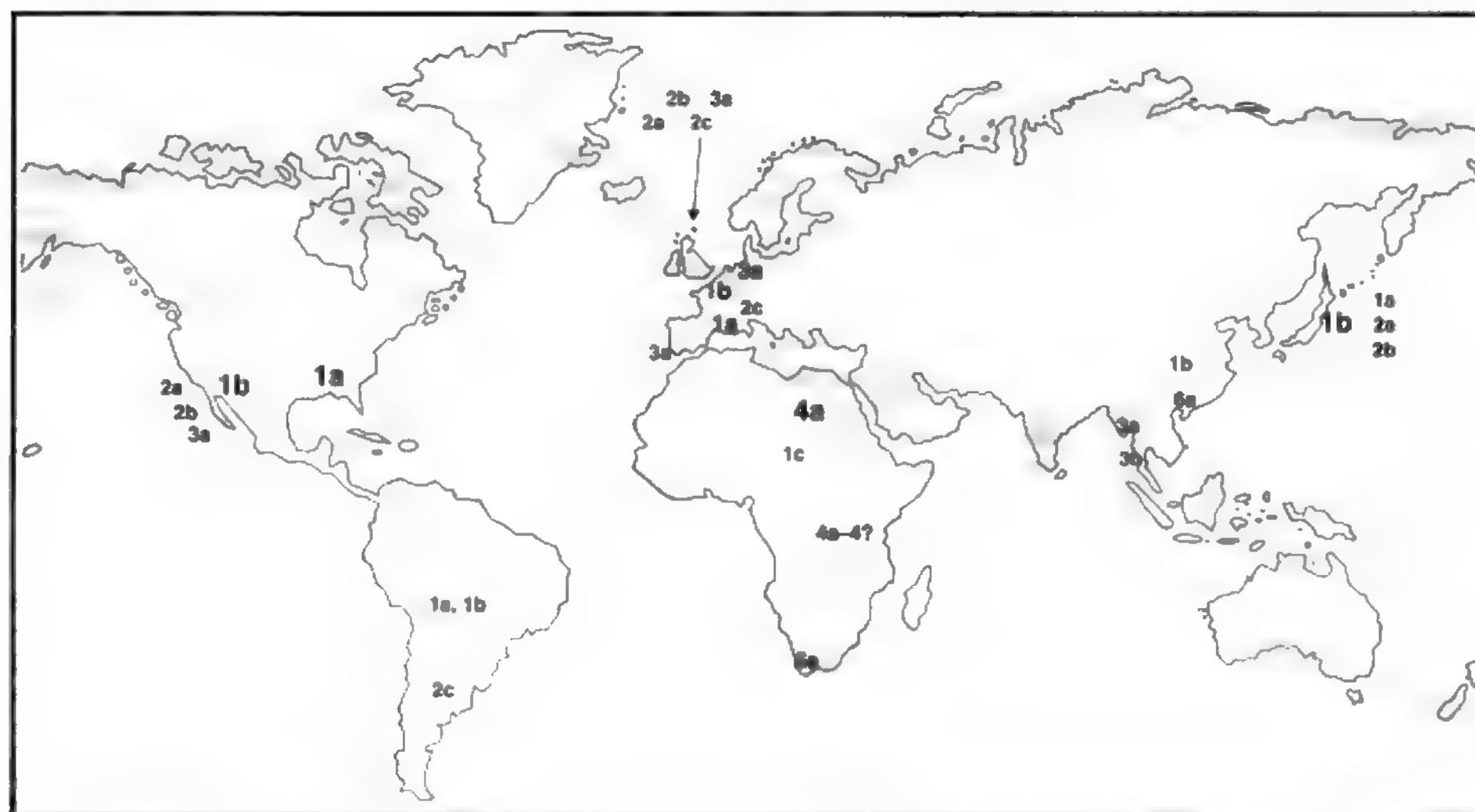


Fig. 14. Distribuzione geografica dei sottotipi di HCV. Il virus dell'epatite C (HCV) possiede una particolare distribuzione geografica dei sottotipi che risultano endemici nelle zone geografiche rappresentate. La particolare variabilità del genotipo si riflette sulle caratteristiche dell'infezione cronica in termini di aggressività biologica, oncogenicità e risposta alla terapia. Per le spiegazioni cfr. testo. (Da American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago, 1994).

termine, sono iniziati alcuni studi di profilassi per prevenire anziché curare la reinfezione posttrapianto. Iniziando cioè un trattamento prima della ricomparsa del virus si spera di limitare l'attività se non di annullarne la carica, che nell'immediato postoperatorio non può essere che minima se paragonata alla condizione di malattia cronica. È infatti certo che la percentuale di risposta ai trattamenti medici (con interferone, ribavirina, etc.) è inferiore al 20% se l'epatite cronica è già in atto, sia istologicamente che sulla base dei parametri di laboratorio. Viceversa, i risultati preliminari della profilassi o del trattamento in fase precoce sembrano produrre risultati migliori, con un tasso di liberazione dal virus C vicino al 40% dei soggetti.

Trapianto e neoplasie epatiche

L'indicazione a trapianto per l'epatocarcinoma su cirrosi ha attraversato una profonda revisione critica a partire dai deludenti risultati riportati negli anni '80 dalle maggiori casistiche mondiali (recidive neoplastiche in oltre il 50% dei pazienti e sopravvivenze non superiori al 35-40% a cinque anni).

Agli inizi degli anni '90 alcuni studi retrospettivi, riprendendo in considerazione il sistema TNM di stadiazione dell'epatocarcinoma, hanno evidenziato invece una relazione diretta tra la sopravvivenza dei pazienti dopo trapianto e lo stadio del tumore al momento dell'intervento.

Ciò ha portato al primo studio prospettico condotto in Italia con precisi criteri di selezione per gli epatocarcinomi in fase iniziale insorti su cirrosi. Il risultato di sopravvivenza globale è di un sorprendente 75% a quattro anni dal trapianto, quanto cioè è stato possibile ottenere con il trapianto per sola cirrosi epatica senza sovrapposizione neoplastica.

Questi criteri che oggi definiscono una neoplasia epatica in stadio iniziale e la rendono passibile di ottima sopravvivenza posttrapianto sono: per i noduli singoli, lesioni non superiori a 5 cm di diametro; e per noduli multipli non più di tre noduli ciascuno di diametro massimo non superiore ai 3 cm.

La netta rivalutazione del trapianto per i tumori in stadio iniziale porrà nel futuro in seria riconsiderazione la chirurgia resettiva per gli epatocarcinomi, soprattutto per le lesioni singole inferiori ai 5 cm di diametro. I risultati ottenuti dal trapianto appaiono superiori alla semplice asportazione del nodulo, anche se manca a tutt'oggi un sicuro studio randomizzato sull'argomento. In ogni caso, poiché oltre il 90% degli epatocarcinomi insorge su cirrosi postepatitiche, appare giustificata l'ipotesi che considera le neoplasie primitive come malattie dell'intero f. (che è infatti interamente coinvolto dallo stimolo oncogeno dell'infezione epatitica) e non di una sola parte, quella cioè dove si manifesta il tumore. Da questo punto di vista non sorprende l'attuale tendenza a considerare (soprattutto in giovani soggetti) il trapianto epatico anche per le lesioni reseccabili.

Tecnica chirurgica

Da un punto di vista tecnico il trapianto di f. si è evoluto notevolmente negli ultimi cinque anni. Lo sforzo principale è stato orientato a semplificare al massimo l'intervento standard creando alternative all'uso del *bypass* extracorporeo ed al reimpianto del nuovo f. Inoltre, al fine di soddisfare la crescente richiesta di trapianti pediatrici e di incrementare il numero totale degli interventi, la ricerca clinica ha raggiunto l'importante traguardo di poter trapiantare parti ridotte del f. donato (segmenti, lobi).

In questa sede verrà dato un quadro riassuntivo di questi recenti progressi, rimandando all'Agg. I (coll. *3126-3170)

per la descrizione dettagliata delle procedure usuali di espianto e trapianto di f.

Prelievo d'organo e legislazione italiana attuale

Il prelievo chirurgico degli organi da trapiantare rappresenta la prima fase di ogni intervento di trapianto. L'espansione delle indicazioni ed i risultati sempre più positivi anche a lungo termine hanno incrementato di molto la richiesta di organi per trapianto cosicché la maggioranza dei donatori è oggi «multiorgano», ovvero è utilizzata per il prelievo di quanti più organi possibili. Questo comporta la partecipazione all'intervento di espianto di svariati *team* chirurgici (chirurghi addominali e toracici, cardiocirurghi, urologi, oculisti) che procedono al prelievo secondo una tecnica ormai codificata (Agg. I, col. *3139) e che rispetta sostanzialmente una sequenza cranio-caudale negli organi da espantare (cioè cuore-polmoni-fegato-pancreas-reni-vasi-cornee). In questi ultimi anni, oltre al personale medico, si sono affermate strutture di coordinamento a carattere interregionale e figure professionali proprie dei Centri Trapianto (i cosiddetti *transplant coordinator*) che gestiscono l'organizzazione del prelievo multiorgano, il reperimento e il trasporto rapido dei pazienti riceventi, la gestione degli imprevisti organizzativi e sanitari ed il rapporto con i familiari del donatore e del ricevente.

In Italia, dal punto di vista legislativo, due nuove importanti leggi (Legge 23/12/93, n. 577 e Decreto 22/8/94, n. 582) hanno sancito i nuovi criteri per l'accertamento della morte (v. *CADAVERE***; *MORTE***, *morte clinica*). In particolare per «... soggetti affetti da lesioni encefaliche e sottoposti a misure rianimatorie...» quindi in pazienti cadaveri idonei al prelievo d'organo per trapianto, la morte viene accertata dalla presenza contemporanea delle seguenti condizioni (D.L. n. 582):

- a) stato di incoscienza;
- b) assenza di riflesso corneale, riflesso fotomotore, riflesso oculocefalico e oculovestibolare, assenza di reazioni a stimoli dolorifici portati nel territorio d'innervazione del trigemino, del riflesso carenale e della respirazione spontanea dopo sospensione della ventilazione artificiale fino al raggiungimento di ipercapnia accertata ($pCO_2 > 60$ mmHg con pH ematico minore di 7.40);
- c) silenzio elettrico cerebrale, documentato dall'EEG;
- d) assenza di flusso cerebrale preventivamente documentata in alcune situazioni particolari (bambini inferiori ad un anno, fattori clinici e farmacologici in grado di deprimere l'attività del sistema nervoso centrale, situazioni ad etiologia incerta o quando non è possibile la rilevazione dell'EEG).

Il periodo di osservazione che precede la certificazione di morte è stato ridotto a (Art. 4, D.L. n. 582):

- a) sei ore per gli adulti e i bambini in età superiore ai cinque anni;
- b) dodici ore per i bambini di età compresa tra uno e cinque anni;
- c) ventiquattro ore nei bambini di età inferiore a un anno.

Durante tale periodo si riunisce un collegio medico nominato dalla direzione sanitaria dell'ospedale dove risiede il paziente potenziale donatore d'organi, composto da un medico legale, da uno specialista in anestesia e rianimazione e da un neurofisiopatologo che verificano la coesistenza delle suddette condizioni cliniche di morte del donatore.

Nuovi approcci tecnici sul paziente ricevente e tecniche alternative al *bypass* extracorporeo

L'intervento chirurgico di trapianto ortotopico di fegato si divide classicamente in tre fasi: I: fase demolitiva (dell'epatectomia totale); II: fase anepatica (dell'assenza del fegato); III: fase ricostruttiva (dall'impianto del nuovo fegato alla fine dell'intervento).

La prima fase dell'intervento comporta l'isolamento del f. malato dalle strutture vascolari e dai suoi legamenti, come

precedentemente descritto (Agg. I, col. *3155). L'asportazione del f. deve essere eseguita col minimo degli squilibri emodinamici, coagulatori e metabolici. Tali potenziali instabilità sono infatti il principale problema (soprattutto anestesiológico) della seconda fase, detta appunto anepatica perché condotta in un paziente temporaneamente senza f.

Come noto, il principale ausilio chirurgico alla fase II è quello della circolazione extracorporea (*bypass* veno-venoso) che permette il ritorno venoso verso il cuore dalla metà inferiore del corpo e dai visceri addominali e pelvici mentre la vena cava inferiore è interrotta nel suo passaggio trans-diaframmatico verso l'atrio destro (fig. 15, A).

Negli ultimi anni sono state elaborate delle tecniche alternative al *bypass* che anche in fase anepatica permettono il mantenimento del ritorno venoso al cuore da tutto il distretto corporeo sottodiaframmatico. Schematicamente esse sono riassunte in figg. 15, B e 15, C. Come si vede, tali tecniche propongono la preservazione della vena cava inferiore retroepatica durante le manovre per l'epatectomia totale associata o meno ad uno *shunt* porto-cavale (fig. 15, C) che può essere considerato una sorta di «*bypass* interno», contrapposto a quanto è possibile ottenere «esternamente» con la circolazione extracorporea (fig. 15, A).

L'utilizzo di una di queste tecniche, in alternativa al *bypass* extracorporeo, è affidato ad una decisione chirurgico-anestesiológica presa durante l'intervento e dipendente dalla situazione anatomica, dalle condizioni di stabilità del paziente e dalle abitudini del chirurgo.

Se la vena cava retroepatica viene preservata ed il *bypass* extracorporeo evitato, vi sono due fondamentali alternative tecniche che si offrono per la fase III, cioè quella dell'impianto del nuovo f. In sintesi esse sono:

1) l'anastomosi cavale termino-laterale (tecnica *piggy-back* [figg. 16, A e 16, B]): descritta inizialmente da Calne nel 1968 e recentemente rivalutata da Tzakis, comporta la preservazione oltre che della vena cava inferiore retroepatica del ricevente anche degli orifizi delle vene sovraepatiche. L'anastomosi cavale viene eseguita termino-lateralmente sull'orifizio delle vene sovraepatiche riunite in un'unica «bocca anastomotica». L'estremità distale della vena cava del f. trapiantato viene invece chiusa a fondo cieco cosicché al termine del trapianto, il paziente ricevente diventa portatore di due vene cave retroepatiche (fig. 16, B), una nativa ed una del fegato trapiantato;

2) l'anastomosi cavale latero-laterale (fig. 16, C): descritta per la prima volta da Belghiti *et al.* (1992), comporta l'anastomosi latero-laterale tra le due vene cave inferiori in un unico sifone venoso. Prima del reimpianto, sia gli sbocchi delle vene sovraepatiche del ricevente che i monconi craniale e distale della vena cava del nuovo fegato vengono chiusi a fondo cieco.

Dopo la riconnessione cavale, il resto delle anastomosi (portale, arteriosa e biliare) segue le usuali tecniche descritte in precedenza (Agg. I, col. *3159).

Nuove tecniche di trapianto di fegato parziale

La scarsità d'organi adatti a pazienti riceventi di piccola taglia corporea o comunque in età pediatrica ha forzato la ricerca tecnica verso metodiche di «riduzione» o «divisione» di un f. adulto in segmenti o lobi trapiantabili autonomamente in quanto in possesso di totale autonomia funzionale. Ciò si è reso possibile grazie all'applicazione sempre più diffusa degli interventi di resezione epatica anche al f. donato secondo i piani anatomici di segmentazione fun-

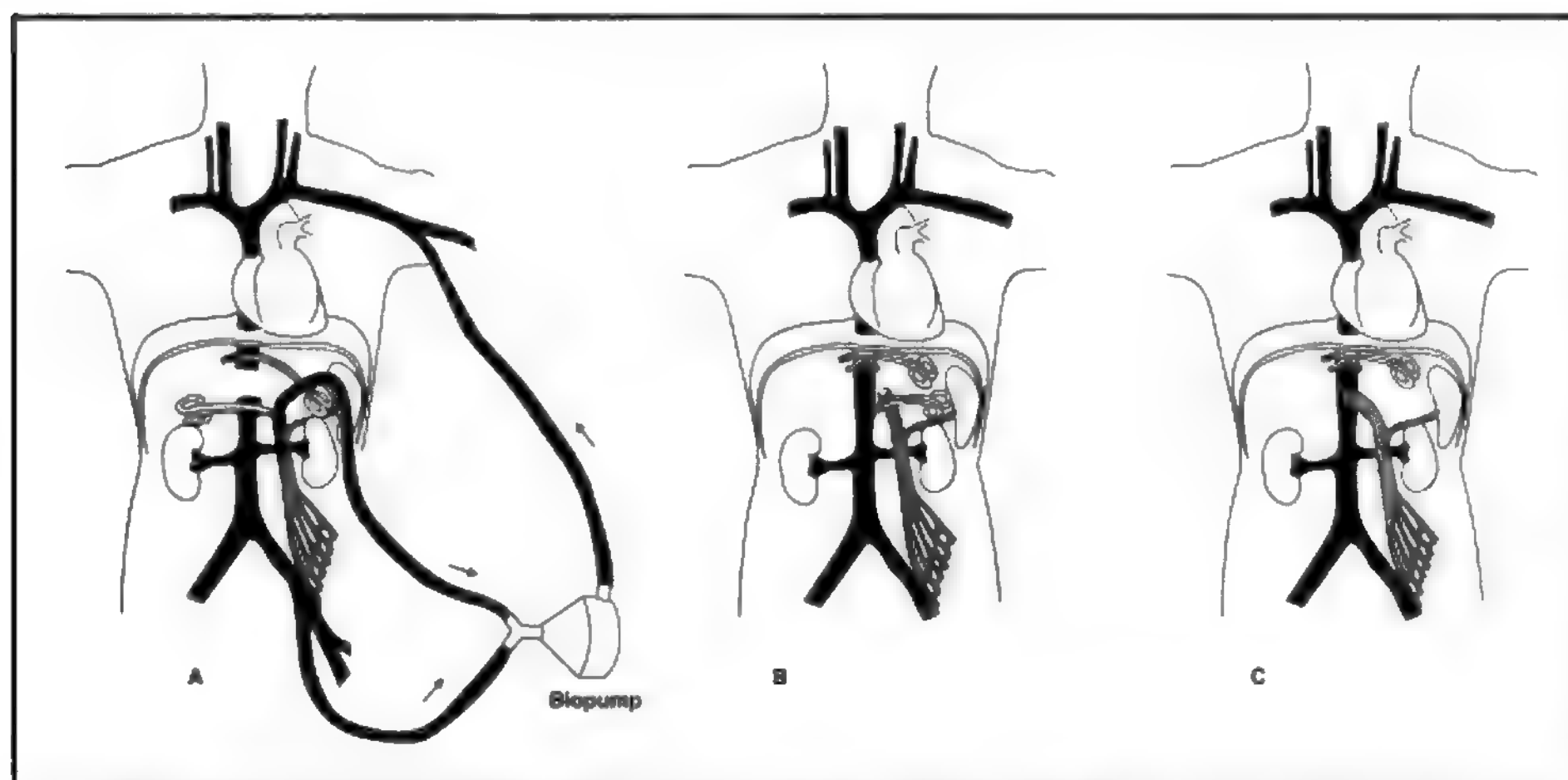


Fig. 15. Fase anepatica del trapianto ortotopico di f. Tre sono le principali alternative tecniche.

A) Circolazione extracorporea mediante l'utilizzo del *bypass* veno-venoso, che raccoglie il sangue proveniente dalla vena cava inferiore e dal circolo portale (distretto venoso sottodiaframmatico) e la convoglia in una pompa in grado di spingerlo verso la vena ascellare e quindi al cuore. La vena cava inferiore sovraepatica e la vena cava inferiore sottoepatica sono chiuse mediante pinze vascolari.

B) Tecnica di clampaggio delle vene sovraepatiche durante la fase anepatica mentre la vena cava nativa rimane pervia. La vena porta è chiusa mediante una pinza vascolare. Quest'ultima manovra è generalmente ben tollerata nel paziente cirrotico, tuttavia, a volte il clampaggio portale può causare squilibri emodinamici importanti che possono essere corretti dalla variante successiva.

C) Variante della tecnica *piggy-back* alla quale è aggiunto uno *shunt* porto-cavale temporaneo. Le vene sovraepatiche risultano sempre clampate e dalla vena cava preservata transita anche il flusso ematico refluo dal distretto splanchnico. Lo *shunt* porto-cavale viene interrotto subito prima dell'anastomosi portale col nuovo f.

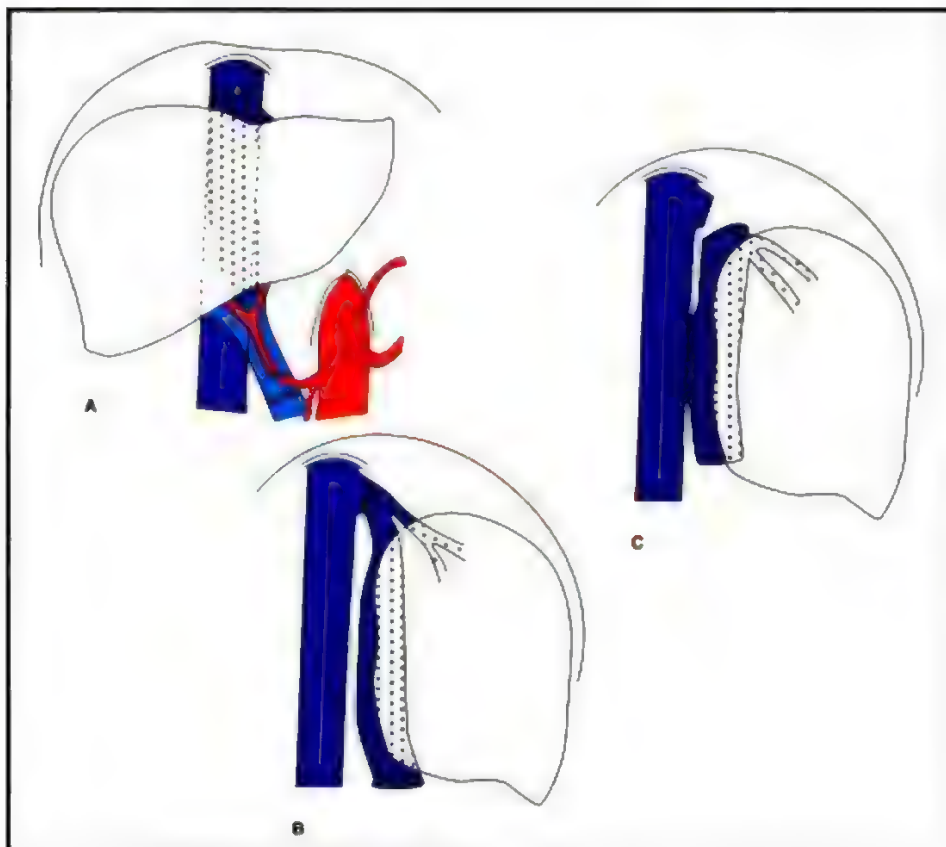


Fig. 16. Tecniche alternative per le anastomosi cavali.

A e B) Anastomosi della vena cava mediante tecnica *piggy-back*. La vena cava del f. trapiantato (evidenziata dalla puntinatura) viene suturata all'orifizio delle vene sovraepatiche del paziente ricevente mentre il capo distale è chiuso a fondo cieco. Sono evidenti inoltre l'anastomosi portale e l'anastomosi arteriosa sull'arteria epatica nativa. Il paziente, al termine dell'intervento, ha due vene cave (visione laterale in B).

C) Anastomosi cavale latero-laterale secondo Belghiti *et al.* (1992). La vena cava del f. da trapiantare viene suturata ai due estremi mentre l'anastomosi tra le vene cave viene eseguita mediante due incisioni parallele condotte longitudinalmente sui due vasi. Notare che la vena cava sovraepatica a differenza della tecnica precedente, viene chiusa.

zionale del f. codificati da Counaud e riassunti in fig. 17 (v. anche FEGATO E VIE BILIARI*, coll. *3076-3082). In questo campo, importanti novità sono rappresentate dalle seguenti tre metodiche.

1. *Fegato ridotto* («*reduced liver*»). - Tecnica introdotta alla fine degli anni '80 come soluzione per trapiantare f. di grandi dimensioni in bambini di piccola taglia, soprattutto in condizioni d'urgenza.

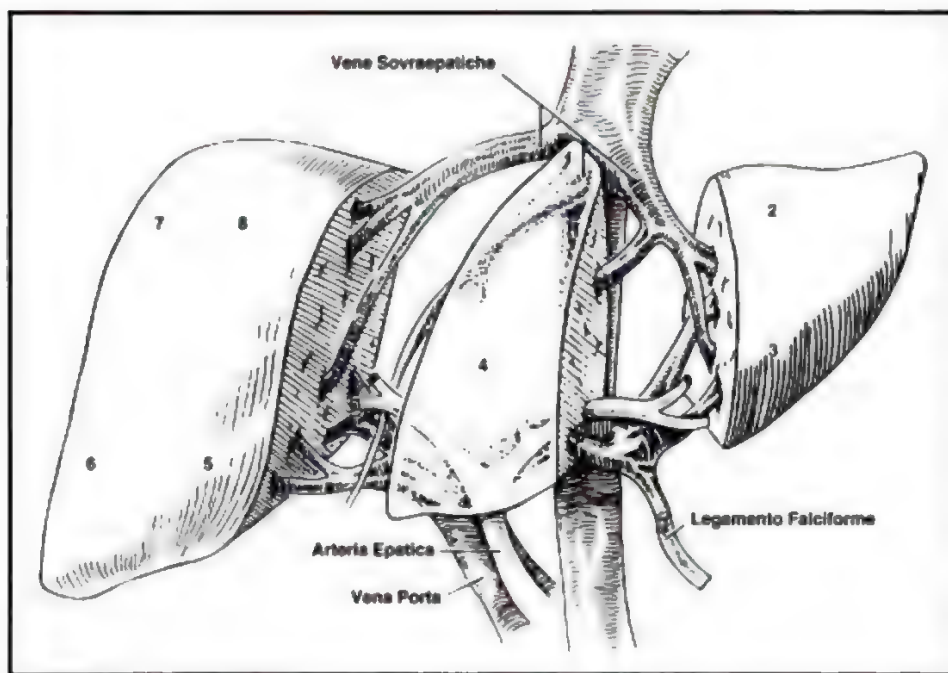


Fig. 17. Anatomia chirurgica e segmentazione del f. secondo Counaud. Il f. è funzionalmente suddiviso in otto segmenti secondo la territorialità delle strutture vascolari afferenti (rami portali ed arteriosi) ed efferenti (vene sovraepatiche e vie biliari). Nello schema sono state omesse le strutture arteriose, che comunque seguono l'andamento dei rami portali. Si noti che nella grande maggioranza dei casi la vena sovraepatica destra e a volte quella media permettono il drenaggio venoso dei segmenti epatici destri (5, 6, 7, 8) mentre la vena sovraepatica sinistra drena i segmenti sinistri (2, 3, 4). Il segmento 1 (lobo caudato), qui non illustrato, rappresenta un'unità funzionale autonoma. (Da Broelsch *et al.*, 1990).

La procedura prevede la resezione chirurgica del f. espuntato che viene ridotto *ex-vivo* al solo lobo sinistro chirurgico (segmenti II-III-IV) o anatomico (segmenti II-III) e scartando quindi il lobo destro. La procedura permette di fatto di trapiantare bambini con un rapporto di peso da 1:4 a 1:6 rispetto all'adulto donatore. La sopravvivenza di bambini trapiantati con un f. ridotto, pur con una maggiore morbosità perioperatoria, è in mani esperte sovrapponibile a quella di bambini trapiantati con f. intero sia in condizioni d'elezione (77%) che in condizioni d'urgenza (circa 50% di sopravvivenza ad un anno dall'intervento).

2. **Fegato diviso («split liver»).** - L'idea di ridurre un fegato dimensionalmente troppo grande rispetto alla taglia

del ricevente ha portato come logica conseguenza al trapianto di un unico f. in due riceventi. I primi di tali interventi sono stati eseguiti nell'uomo indipendentemente da Pichlmayr e da Bismuth negli anni '80 e sono oggi sempre più di frequente eseguiti nei Centri a maggiore attività. La procedura è molto minuziosa e consiste nel riconoscere e separare le strutture anatomiche vascolari (vene sovraepatiche, vena porta e sue prime biforcazioni, ramo destro e sinistro dell'arteria epatica) e biliari con l'ausilio anche di una arteriografia e/o colangiografia *ex-vivo*, prima del reimpianto.

Le regole anatomiche che presiedono alla divisione dei due emifegati sono illustrate in fig. 18.

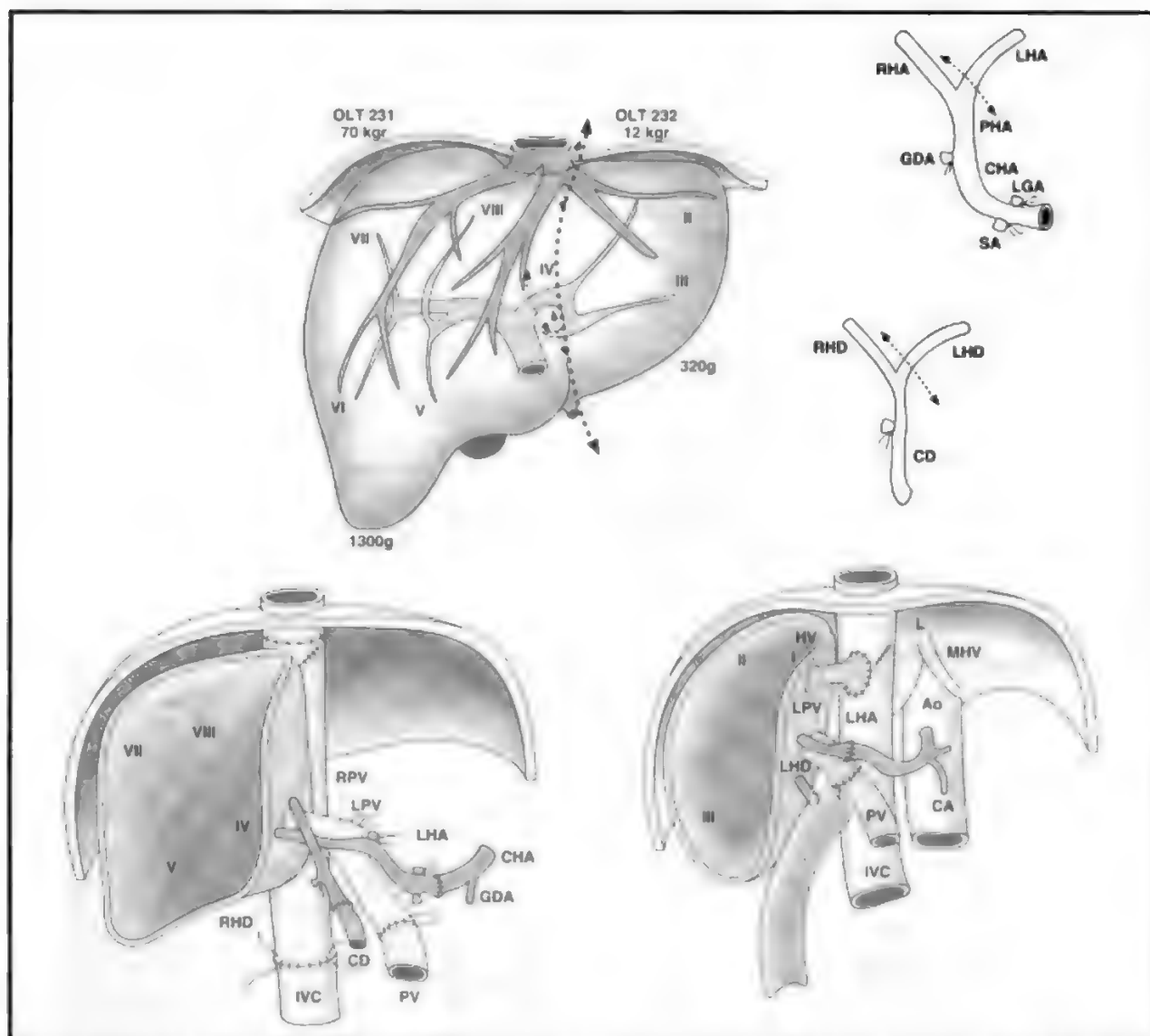


Fig. 18. Trapianto di f. diviso (due riceventi per un solo donatore). *Al centro* è rappresentato il f. *in toto*, che viene diviso in due pazienti riceventi di taglia corporea differente: un adulto di 70 kg per l'emilegato destro ed un bambino di 12 kg per l'emilegato sinistro. La sezione del f. avviene poco medialmente al piano del legamento falciforme. La spiegazione di quali strutture vengono assegnate al f. destro o a quello sinistro e riassunta nelle sigle. RHA) arteria epatica destra; LHA) arteria epatica sinistra; PHA) arteria epatica propria; CHA) arteria epatica comune; GDA) arteria gastroduodenale; LGA) arteria gastrica sinistra; SA) arteria splenica; CA) tronco celiaco; RHD) dotto biliare destro; LHD) dotto biliare sinistro; CD) coledoco; RVP) ramo destro della vena porta; LPV) ramo sinistro della vena porta; LHV) vena sovraepatica sinistra; MHV) vena sovraepatica media; PV) tronco principale della vena porta; IVC) vena cava inferiore; Ao) aorta. (Da *Otte et al.*, 1990, ridisegnata)

Le principali complicanze post-operatorie, certo più frequenti rispetto ai trapianti eseguiti con organi *in toto*, sono le emorragie dalla trancia di sezione, le trombosi vascolari (soprattutto arteriose, meno frequentemente portali), le stenosi e fistole biliari, gli ematomi ed ascessi intra- o peripatici e qualche volta la *primary non-function* dell'emifegato trapiantato. La sopravvivenza, come già ricordato a proposito del trapianto di f. ridotto, è diversa se il trapianto è effettuato in condizioni d'elezione (70% ad un anno) o d'urgenza (< 50%). Col progredire dell'esperienza è prevedibile che i risultati di tale procedura si avvicineranno sempre di più a quelli ottenuti col trapianto di organi interi.

3. *Donatori viventi («living related donors»).* — In anni recenti le tecniche di riduzione sono state proposte ed applicate alla donazione da vivente (ad es. donazione da genitori a figlio) anziché da cadavere. La tecnica chirurgica prevede la resezione del segmento laterale sinistro del f. del donatore in blocco con il suo supporto vascolare (porta e arteria di sinistra, vena sovraepatica sinistra) rispettando lo scarico biliare. In una serie di 20 trapianti da donatore vivente in bambini affetti quasi esclusivamente da atresia biliare e dal peso inferiore ai 15 kg. è stata ottenuta una sopravvivenza attuariale dell'82% ad un anno. Nessuna complicanza è intercorsa nei donatori mentre le complicanze post-operatorie si sono verificate soprattutto a carico dell'anastomosi arteriosa (20%) o sull'intero segmento prelevato, con una necessità di ritrapianto quantificabile in circa il 10% dei casi.

La donazione da vivente, nell'esperienza occidentale ma anche e soprattutto in quella giapponese (dove la donazione da cadavere non è permessa per motivi etico-religiosi) ha favorito un più rapido smaltimento delle liste d'attesa per trapianto pediatrico e ridotto significativamente la mortalità pre-trapianto.

Vi è da rilevare peraltro che, da parte di una consistente componente della comunità medica vengono sollevate alcune perplessità di ordine etico nei confronti della donazione d'organi da vivente. Essa infatti tende ad allontanare la soluzione della grande emergenza costituita dalla carenza di organi da cadavere e si presta a possibili speculazioni di ordine economico nei casi di donazione tra non-consanguinei.

Trapianto di fegato ausiliario

Come descritto sino ad ora, il trapianto di f. ortotopico prevede l'asportazione del f. malato e la sua sostituzione con un f. sano nella medesima posizione anatomica originaria. Il modello di trapianto epatico ausiliario sottende invece il concetto di «appoggio», di «sostegno» metabolico al f. malato da parte di un nuovo organo (o parte di esso) collocato in aggiunta a quello nativo sia in posizione eterotopica che ortotopica.

La sede più frequente di trapianto di f. eterotopico è l'area sottoepatica, nei quadranti addominali inferiori di destra. In questo modo tutte le strutture vascolari (vena porta, arteria epatica, vena cava) sono vicine e ricongiungibili con anastomosi dirette (fig. 19. A), mentre invece lo scarico biliare è garantito da una anastomosi bilio-digestiva su un'ansa intestinale del ricevente preparata alla Roux.

Il trapianto ausiliario eterotopico è indicato in pazienti ad alto rischio chirurgico per una condizione terminale di epatopatia acuta o cronica per la quale non è ipotizzabile il trauma chirurgico costituito dalla sostituzione completa del f. ammalato. La breve durata dell'intervento di trapianto ausiliario eterotopico e lo scarso impatto emodinamico che comporta sono infatti le più frequenti ragioni a favore dell'intervento. Anche a causa però del tipo di pazienti per i quali viene proposto, questo tipo di trapianto è gravato da risultati a distanza molto inferiori a quelli ottenuti con il trapianto ortotopico.

Diversa è, invece, la situazione del trapianto ausiliario ortotopico (fig. 19. B), proposto soprattutto come terapia per le epatiti fulminanti. Secondo questa tecnica, un emifegato affetto da insufficienza acuta viene resecato nel paziente ricevente durante la prima fase dell'intervento ed in seguito è sostituito da un emifegato donato, collocato in posizione ortotopica. In questo modo, l'emifegato trapiantato sopprime a tutte le funzioni epatiche in attesa di un'eventuale riparazione e ripresa funzionale dell'emifegato nativo, in quel momento acutamente insufficiente. Se questo processo avviene, a distanza di mesi l'emifegato trapiantato può essere rimosso, riportando il paziente a vivere con il solo f. nativo ed abolendo così la necessità di una terapia immu-

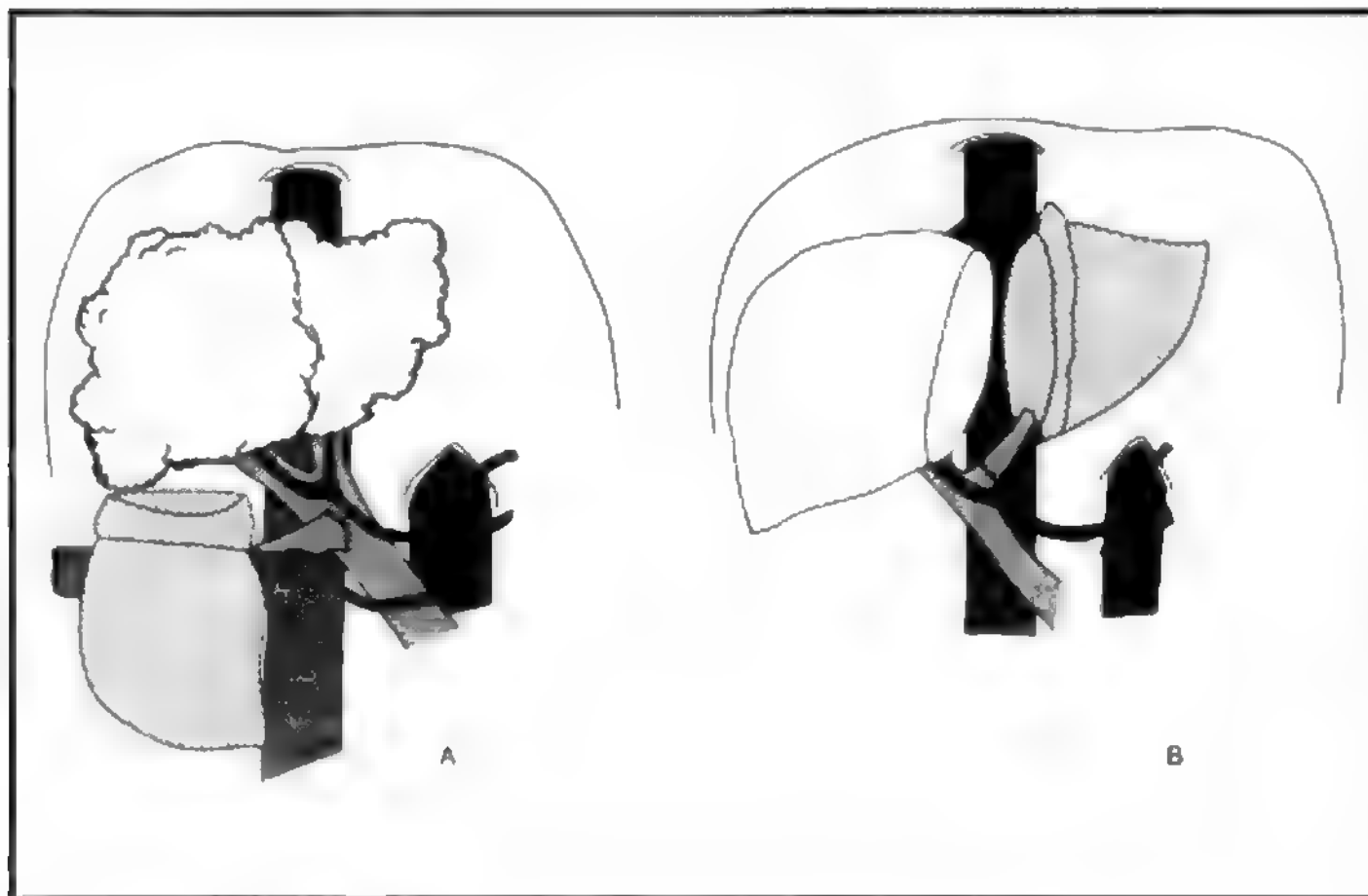


Fig. 19. Trapianto ausiliario di f.
A) Trapianto di f. ausiliario in sede eterotopica. Notare che le strutture vascolari (vena porta, arteria epatica e vena cava) sono connesse termino-lateralmente alle analoghe strutture del ricevente e che il f. malato viene lasciato in sede.

B) Trapianto di f. ausiliario in sede ortotopica. Il lobo sinistro di un f. donato viene trapiantato nella stessa posizione del lobo sinistro di un f. con insufficienza fulminante (che è stato resecato nella prima parte dell'intervento). Le anastomosi vascolari sono termino-terminali e il f. trapiantato può essere rimosso anche a mesi di distanza dal trapianto, se quello insufficiente dovesse recuperare dal danno acuto.

In entrambi gli schemi è stata omessa la rappresentazione del drenaggio biliare, ottenuto mediante preparazione di un'anastomosi bilio-digestiva su un'ansa intestinale defunzionizzata secondo Roux.

nosoppressiva cronica necessaria ad evitare il rigetto. Sempre più numerose sono le segnalazioni di successi sia a breve che a lunga distanza ottenuti con questo tipo di intervento.

Terapia immunosoppressiva

La sopravvivenza del f. in un ricevente geneticamente estraneo è affidata al controllo della reazione di rigetto, che è a sua volta modulata dai farmaci immunosoppressori in grado di interferire a vari livelli con la risposta immunitaria che l'ospite genera contro il nuovo organo.

Agli inizi della trapiantologia clinica l'immunosoppressione era affidata esclusivamente ai cortisonici seguiti poi dall'azatioprina e dalle globuline anti-linfocitarie. Non vi è dubbio che il progresso più importante in questo campo

sia stato l'introduzione nella pratica clinica della ciclosporina (v.*; v.**), agli inizi degli anni '80, evento che ha determinato non solo il decisivo miglioramento dei risultati a distanza, ma anche un allargamento dell'indicazione a diabetici, anziani, pazienti con anticorpi già preformati, etc. In questi ultimi anni la ricerca farmacologica su nuovi farmaci immunosoppressivi è progredita di molto, sino a permettere nuovi schemi e strategie terapeutiche integrate per un'immunosoppressione sempre più selettiva. È stata soprattutto l'introduzione dell'FK-506 (v.*; tacrolimus) nel trapianto di f. che ha ulteriormente ampliato gli strumenti a disposizione del clinico per il controllo del rigetto.

Nella tab. VIII sono stati raggruppati i principali farmaci immunosoppressori, sia di uso corrente che di prossimo svi-

TAB. VIII. FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI

Farmaco	Meccanismo d'azione	Effetti tossici
<i>Farmaci di uso comune</i>		
Ciclosporina A	Inibizione sintesi IL-2 Inibizione sintesi IFN-γ e citochine (v. CICLOSPORINA [v.*; v.**])	nefrotossicità diabete tremori, parestesie, cefalea ipertensione arteriosa aumento bilirubina, AST/ALT ipertricosi, iperplasia gengivale cataratta, ritardo riparazione ferite infezioni, neoplasie
Ciclosporina Neoral	v. CICLOSPORINA**	migliore tollerabilità per migliore assorbimento (indipendenza da bile e dieta)
Tacrolimus (FK-506)	Inibizione IL-2, IL-3, IL-4 Inibizione IFN-γ e citochine	neurotossicità nefrotossicità diabete ipertensione arteriosa infezioni
Glicocorticoidi	Effetto antinfiammatorio Inibizione linfociti T Inibizione macrofagi Diminuzione linfocine	soppressione ACTH e cortisolo ritenzione idrica, ipertensione arteriosa infezioni diabete gastrite, ulcera peptica osteoporosi, atrofia muscolare cataratta, glaucoma bulimia, iperlipemia fucies cortisonica, irsutismo
Azatioprina	Diminuita sintesi purine nei linfociti T e B attivati	depressione midollare colestasi infezioni, neoplasie
Acido micofenolico	Inibizione sintesi purine dei linfociti B e T	poco tossico disturbi gastro-intestinali
Siero antilinfocitario (ALG; ATG)	Lisi complemento-dipendente dei linfociti T circolanti	reazioni allergiche infezioni, specie virali
Anticorpi monoclonali OKT3	Blocco complesso CD3 dei linfociti T citotossici	reazioni allergiche broncospasmo, edema polmonare nausea-vomito, meningite asettica
<i>Farmaci sperimentali</i>		
Ciclosporina G	v. CICLOSPORINA**	minor nefrotossicità (?)
Ciclosporina IMM 125	v. CICLOSPORINA**	minor tossicità (?)
Rapamicina	Inibizione linfociti CD4 e CD8	poco noti
Deossispergualina	Effetto anti-monociti e anti-macrofagi	depressione midollare nausea, vomito
Anticorpi monoclonali: anti-recettori IL-2 anti-CD4 anti-CD45 anti-CD52	Inibizione recettori IL-2 Inibizione cellule CD4 Inibizione leucociti passeggeri Inibizione linfociti B e T	vedi OKT3 poco noti poco noti poco noti

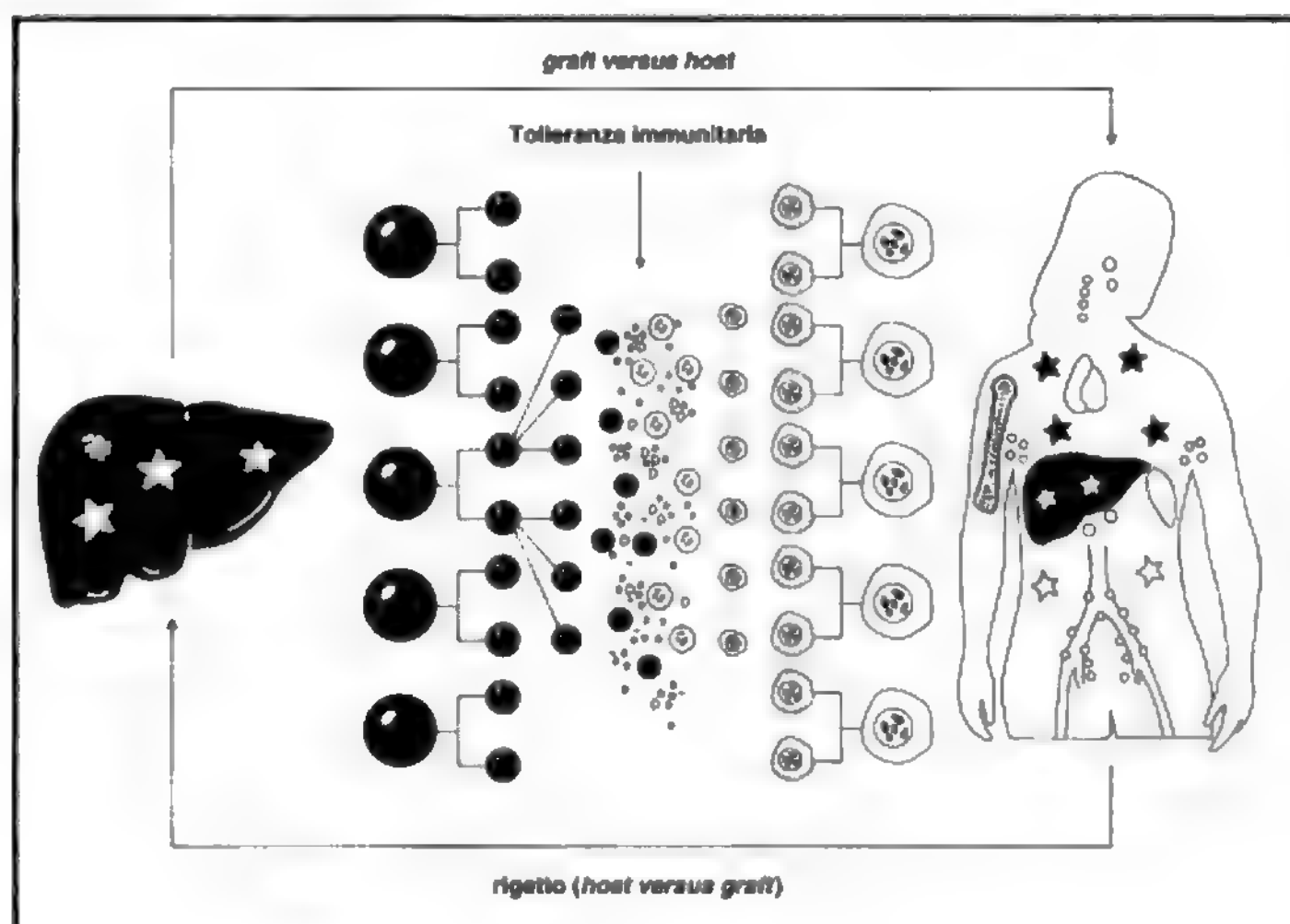


Fig. 20. Chimerismo e tolleranza posttrapianto. Il confronto fra popolazioni immunocompetenti che migrano dal f. trapiantato all'ospite e dall'ospite al nuovo f. è responsabile di una immunosoppressione naturale (tolleranza immunitaria). Lo squilibrio di queste forze provoca, nelle due direzioni o il rigetto (che è la prevalenza del ricevente contro il trapianto, come a dire una reazione *host versus graft*) oppure la sindrome da *grafi versus host* (che è la prevalenza delle popolazioni immunocompetenti del donatore, trasmesse con il trapianto contro quelle del paziente ricevente). (Da Starzl et al., 1993b, ridisegnata).

luppo, con l'indicazione del loro meccanismo d'azione e degli effetti tossici più comuni.

Gli schemi terapeutici che vengono utilizzati per l'immunosoppressione cronica post-trapianto differiscono di poco tra i vari Centri, risentendo dell'esperienza e della confidenza nell'utilizzo di un farmaco o di un'associazione di farmaci. Lo schema classico prevede l'utilizzo di una tripla associazione di ciclosporina, steroidi e azatioprina, mentre altri protocolli prevedono una «induzione» con siero anti-linfocitario o anticorpi monoclonali prima dell'utilizzo della ciclosporina, soprattutto nei pazienti che si presentano al trapianto con grave insufficienza renale.

In alternativa, sempre più frequente è l'utilizzo in elezione del tacrolimus in sostituzione della ciclosporina. Tale impiego è in grado di fornire risultati per lo meno analoghi sulla sopravvivenza ma con minor incidenza di rigetto e forse minor tossicità.

È interessante comunque notare come i canoni classici dell'immunosoppressione post-trapianto, basati sulla necessità di un controllo permanente (cioè prolungato per tutta la vita) del sistema immune, siano stati ampiamente messi in discussione. Se è infatti vero che il rigetto è un evento pressoché ineluttabile nelle prime fasi post-trapianto di f., è altrettanto frequente osservare una progressiva riduzione dei rischi di rigetto col passare del tempo, sino al caso di pazienti del tutto asintomatici con livelli minimi di immunosoppressione o anche a situazioni in cui per errore o inaffidabilità la terapia immunosoppressiva sia stata sospesa senza conseguenze.

Il rigetto cosiddetto «cronico» del f. si verifica in circa il 5-10% dei casi e può portare alla perdita dell'organo e alla necessità di ritrapianto. Tuttavia, è esperienza comune osservare che la diagnosi di rigetto cronico è preceduta da varie fasi di rigetto acuto difficilmente controllate nel primo anno post-trapianto. Per la grande maggioranza dei restanti casi sopravvissuti più di tre anni all'intervento senza problemi pregressi, il rigetto rimane evento molto raro.

Per tali ragioni negli ultimi anni si è sviluppata sempre più la tendenza ad impiegare regimi immunosoppressivi

che comportano la riduzione progressiva delle dosi e dei farmaci impiegati, allo scopo di evitare le conseguenze indesiderate di una sovra-immunosoppressione (infezioni, malattie linfoproliferative, tumori, alterato controllo del metabolismo, etc.).

È infatti ormai diffusa in molti Centri la sospensione degli steroidi entro i sei mesi dal trapianto mantenendo i pazienti in trattamento con sola ciclosporina o tacrolimus ed è stato accertato che ciò non comporta un aumento dell'incidenza di rigetti acuti e/o cronici. La spiegazione di questo fenomeno di progressiva tolleranza dell'organismo verso l'organo trapiantato risiederebbe, secondo gli studi di Starzl e di altri A.A., in un particolare equilibrio tra le popolazioni cellulari immunocompetenti dell'ospite e quelle del donatore. È infatti sicuro che, con il trapianto, vengono trasferite nel ricevente numerose popolazioni linfocitarie di derivazione midollare del donatore, residenti o solo transitori nell'organo al momento dell'espanto. Si tratta di milioni di cellule che, al momento della riperfusione, vengono veicolate e disperse dal flusso ematico in tutti i distretti corporei del ricevente.

È verosimile che molte di queste cellule vengano distrutte o muoiano per la fine del loro ciclo vitale; tuttavia è stato dimostrato che alcune di esse (soprattutto cellule dendritiche) vanno a collocarsi in permanenza nel sistema linforeticolare periferico (ad es. linfonodi) del ricevente, dove possono ritrovarsi vitali anche a distanza di anni dal trapianto.

Alla permanenza di questo chimerismo periferico (fig. 20) sarebbe da ascrivere il fenomeno della tolleranza che il sistema immune umano può maturare (anche se raramente) nei confronti dell'organo trapiantato. Su questa ipotesi di lavoro sono stati attivati, con iniziali incoraggianti risultati, dei protocolli che prevedono l'infusione di midollo osseo del donatore in coincidenza (o poco dopo) al trapianto allo scopo di aumentare il chimerismo periferico delle cellule del donatore e di raggiungere quindi con più frequenza uno stato di tolleranza immunologica. È ormai provato che l'infusione di midollo osseo del donatore in coincidenza col

trapianto non è tossica e non aumenta significativamente i rischi di rigetto o di *graft-versus-host disease*.

Negli anni futuri, nel momento in cui su questi pazienti saranno progressivamente ridotte o sospese le terapie immunosoppressive, sarà possibile accertare se l'induzione della tolleranza tramite l'induzione forzata di alti livelli di chimerismo ha davvero un futuro nella pratica clinica.

Prospettive future

A distanza di oltre trent'anni dal primo caso sull'uomo, il trapianto di f. rimane sempre definibile con le parole del suo pioniere Thomas Starzl: «an unfinished product», un prodotto non finito della medicina moderna. Questo a causa degli innumerevoli rapporti che questa procedura ha progressivamente sviluppato con i più svariati rami del sapere medico. Ed è prevedibile che questo processo di rinnovamento e ricerca continui ancora a lungo.

Tra le prospettive future offerte dal trapianto di f., ci sono il f. artificiale e gli xenotrapianti (l'utilizzo cioè di organi prelevati da animali).

Fegato artificiale (bioartificial liver)

Di supporto artificiale epatico si parla con alterne fortune da circa un ventennio, senza che nessuno dei tanti prototipi proposti abbia mai prodotto un sicuro risultato in termini di prolungamento della sopravvivenza del paziente in coma metabolico per insufficienza epatica. Numerose sono invece le segnalazioni dei positivi risultati ottenuti da alcune tecnologie emoperfusionali in termini di sostituzione parziale di alcune funzioni specifiche del f., come il controllo dei parametri coagulativi, dell'ammoniemia, della pressione endocranica, dell'omeostasi proteica o glicidica.

Negli ultimi anni i prototipi di f. artificiale hanno aggiunto però alla tecnologia dell'emoperfusione extracorporea il supporto di colture di cellule epatiche vive attraverso cui far passare il sangue del paziente. Gli epatociti (isolati in genere dal fegato di mammiferi o da fegati umani scartati per trapianto) possono essere utilizzati in sospensione o in piastre o in filtri artificiali semipermeabili che aumentano di molto la superficie di contatto tra il sangue e le cellule stesse (fig. 21). In alcune sperimentazioni, al fine di allun-

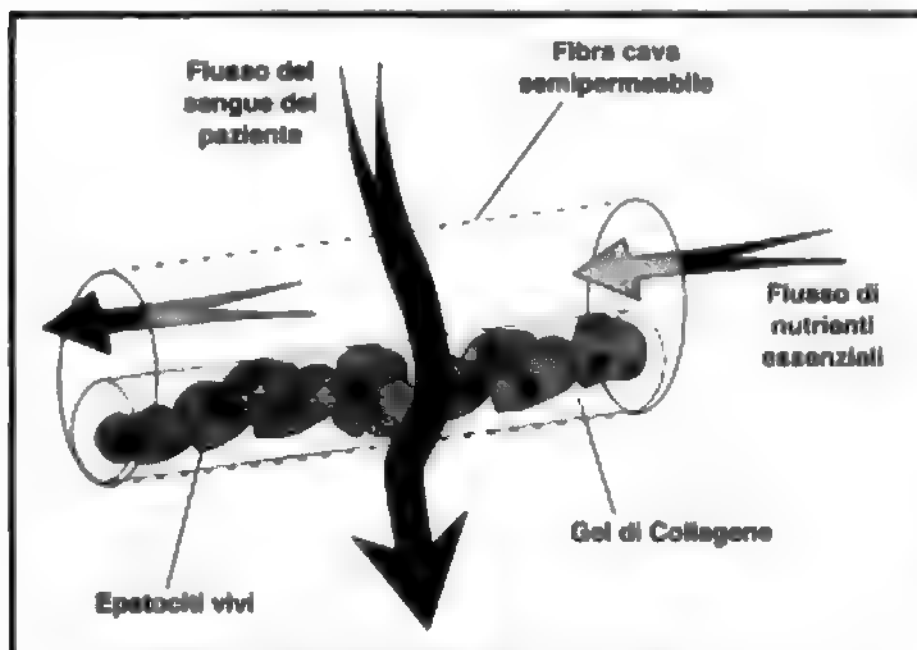


Fig. 21. Schema di funzionamento del f. bio-artificiale. L'unità funzionale del f. artificiale è costituita da epatociti vivi intrappolati in bio-fibre cave. Il sangue del paziente con insufficienza epatica scorre all'esterno della fibra mentre gli epatociti vengono mantenuti in vita da un flusso di nutrienti essenziali che invece scorre all'interno della fibra stessa. La depurazione del sangue e lo scambio molecolare avviene attraverso la membrana della fibra cava che è semipermeabile. (Da Nyberg et al., 1993, ridisegnata).

gare i tempi di utilizzo di tali bio-filtri e di ridurre i costi, è stato anche ipotizzato l'uso di epatociti di epatomi umani «immortalizzati» in coltura.

I nuovi modelli di supporto bio-artificiale al coma epatico si sono dimostrati molto efficaci nei più importanti modelli sperimentali animali e di recente in alcune piccole serie di casi ultra-urgenti nell'uomo. E ciò ha posto il problema etico di programmare uno studio randomizzato, il solo che possa davvero dare una risposta sul reale beneficio di tali apparecchiature nel trattamento del coma epatico.

È auspicabile che la ricerca sul f. artificiale, grazie all'utilizzo dei bio-filtri di epatociti abbia imboccato la strada dell'utilizzo pre-clinico e comunque della sperimentazione umana controllata. L'integrazione tra tali sistemi (in prevedibile continuo miglioramento tecnologico), con la corretta selezione dei pazienti e l'utilizzo altrettanto accurato del trapianto, sarà la vera sfida terapeutica degli anni futuri.

Xenotrapianto

Quello dell'utilizzo di organi animali per trapianti sull'uomo rimane un orizzonte ipotizzato già da molti anni e più volte tentato nella storia dei trapianti in coincidenza dei più importanti progressi dell'immunologia e della farmacologia clinica (v. XENOTRAPIANTO**). Più di recente, dopo l'introduzione del tacrolimus e la precisazione del chimerismo periferico come base della tolleranza immunitaria post-trapianto (v. sopra, fig. 20), il triennio 1993-95 è stato testimone di tre tentativi di xenotrapianto nell'uomo (due di essi con f. di babuino ed uno di suino). Se purtroppo tali tentativi non hanno garantito una sopravvivenza a lunga durata ai pazienti riceventi, essi hanno però permesso l'acquisizione di nuovi dati ed aiutato la ricerca di base sul controllo del rigetto umorale iperacuto.

Al di là delle motivazioni etiche e dei problemi metabolici legati alla produzione di proteine anomale (e forse immunogeniche) da parte di uno xenotrapianto di f., il vero fattore limitante all'introduzione di questa procedura è rappresentato dal rigetto acuto che si verifica nell'organo trapiantato a causa degli anticorpi preformati presenti nel ricevente. Questa reazione citotossica, mediata dai linfociti B dalle immunoglobuline G ed M ed infine dalla cascata del complemento è stata fortemente controllata nei casi trapiantati di recente grazie all'uso di una immunosoppressione più efficace (ciclofosfamide, tacrolimus, steroidi, prostaglandine), ed è sempre più chiaro che a nuove generazioni di farmaci anti-complemento è affidata la prossima ricerca sul controllo della reazione umorale contro lo xenotrapianto di f.

Una ulteriore direzione di lavoro che promette interessanti risultati è rappresentata dal progressivo sviluppo di animali transgenici cioè in grado di esprimere sulla superficie delle proprie cellule gli antigeni di istocompatibilità propri della specie umana. Organi transgenici non dovrebbero essere rigettati per la semplice ragione che il sistema immune umano non sarebbe in grado di riconoscerli come estranei.

Alcune generazioni di suini transgenici sono già state prodotte a questo scopo e su di essi sono iniziati gli studi di base tesi ad accertare l'effettivo fenotipo espresso dagli epatociti. Il loro utilizzo è al momento del tutto sperimentale e non ancora pronto alla sperimentazione sull'uomo.

Bibliografia

- Belghiti J., Panis Y., Sauvanet A., Gayet B., Fekete F., *Surg. Gyn. & Obst.*, 1992, 175, 271.
 Broelsch C. E. et al., *Ann. Surg.*, 1990, 212, 368-377.
 Broelsch C. E., Emond J. C., Whittington P. F. et al., *Ann. Surg.*, 1990, 212, 368.

- European FK506 Multicenter Liver Study Group, *Lancet*, 1994, **344**, 423.
 Gane E. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 815.
 Houssin D. et al., *Surgery*, 1992, **111**, 532.
 Mazzaferro V. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 693.
 Nyberg S. L. et al., *Am. J. Surgery*, 1993, **166**, 512-521.
 Otte J. B. et al., *Ann. Surg.*, 1990, **211**, 146.
 Samuel D. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 1842.
 Starzl T. E., Demetris A. J., Murase N., Ildstad S., Ricordi C., Trucco M., *Lancet*, 1992, **339**, 1579.
 Starzl T. E. et al., *Lancet*, 1993a, **341**, 65.
 Starzl T. E. et al., *Immunology Today*, 1993b, **14**, 327-332.
 Terpstra O. T. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1988, **319**, 1507.
 Tzakis A. G., Todo S., Starzl T. E., *Ann. Surg.*, 1989, **210**, 649.

VINCENZO MAZZAFERRO, ENRICO REGALIA,
ANDREA PULVIRENTI E THOMAS E. STARZL

FELBAMATO: V. ANTIEPILETTICI FARMACI** (col. **445).

FERRO [v. vol. VI, coll. 1491-1516; Agg. I, coll. *3175-3182]

SOMMARIO

Distribuzione del ferro nei tessuti umani (col. 2251): *Ferro di deposito*. - *Ferro di trasporto*. - *Sistema regolatore eritrocitario*. - *Absorbimento del ferro* (col. 2254).

Distribuzione del ferro nei tessuti umani

A quanto è stato riferito su questo argomento nell'articolo di base e in quello dell'Aggiornamento I, vanno aggiunte nuove notizie in particolare per quanto riguarda il ferro [Fe] di deposito e quello di trasporto.

Ferro di deposito

La ferritina, una delle due forme del Fe di deposito (l'altra forma, più stabile, è costituita dall'emosiderina), si ritrova virtualmente in tutte le cellule del corpo e nei liquidi tissutali. Gli epatociti, e verosimilmente altre cellule, esprimono recettori di membrana che regolano la captazione e l'internalizzazione della ferritina dal plasma o dai liquidi interstiziali. Sebbene la ferritina sia presente nel plasma in minime concentrazioni, cionondimeno la sua concentrazione plasmatica correla molto bene con le scorte di Fe dell'organismo intero, tanto che la sua misurazione nel siero fornisce informazioni sufficienti per lo studio del bilancio marziale e per una esatta diagnosi di molti disordini del metabolismo del Fe. In particolare, è stato stimato che 1 µg/l di ferritina nell'uomo adulto corrisponde a 8-10 mg di Fe di riserva tissutale. È interessante sottolineare che i livelli plasmatici di ferritina subiscono variazioni con l'età a motivo del differente fabbisogno in Fe. Nel maschio adulto, con un fabbisogno di Fe quantificabile intorno a 0,9 mg/die, la ferritina plasmatica raggiunge picchi di 100 µg/l equivalenti a circa 1000 mg di Fe di deposito. L'addizionale necessità di 0,5 mg/die degli adolescenti e della donna mestrata risulta in 300 mg di scorte marziali, che corrispondono a 30 µg/l di ferritina plasmatica. Lo stesso si verifica nell'uomo adulto donatore di sangue che subisca almeno una flebotomia per anno, ripetuta per molti anni. Quando l'adolescente raggiunge l'età adulta o la donna entra nel periodo menopausale, il fabbisogno addizionale di Fe dovuto all'accrescimento o alle perdite mestruali viene a cessare e si instaura un bilancio di Fe positivo. Il compartimento di deposito è fisiologicamente regolato allo scopo di evitare comunque il sovraccarico marziale; una volta che le scorte di Fe del maschio adulto sono state saturate, c'è una limitazione all'ulteriore accumulo. In un'osservazione longitudinale di soggetti adulti fino a 90 anni, è stato osservato che la ferritina plasmatica non subisce più alcun significativo cambiamento a partire dai 30 anni in poi nonostante

qualche spostamento del Fe nei depositi in funzione della riduzione della massa magra corporea.

Il compartimento di deposito del Fe ammonta, nell'uomo adulto, a circa 800-1000 mg (tab. I), nella donna si mantiene quasi sempre a valori inferiori; una sua deplezione si verifica quando le perdite di Fe eccedono l'assorbimento. Il Fe, una volta mobilizzato dai depositi naturali attraverso il rilascio dalla ferritina citoplasmatica, viene ossidato allo stato trivalente dalla ceruloplasmina (v.; v.***) prima di legarsi alla transferrina.

Ferro di trasporto

Il compartimento del Fe di trasporto, sebbene sia quantitativamente il più modesto, è, sul piano cinetico, quello di gran lunga più attivo essendo il suo contenuto in Fe scambiato normalmente 10 volte nell'arco delle 24 h. Un atomo di Fe una volta entrato nel corpo si viene a trovare in un sistema virtualmente chiuso riciclandosi dal plasma negli eritroblasti midollari, nel sangue periferico per circa 4 mesi e poi nel sistema macrofagico-fagocitico che lo rimuove dall'emoglobina per reimmetterlo nuovamente in ciclo. La funzione di trasporto è assolta dalla transferrina (v.) che provvede a veicolare il Fe dai siti di ingresso (villi intestinali e sinusoidi splenici) fino al compartimento eritroide midollare. La transferrina plasmatica è una glicoproteina di 678 aminoacidi di peso molecolare 79.570, migra elettroforeticamente nella regione delle β-globuline, serve per il trasporto del Fe dai siti donatori ai tessuti vascolarizzati. La fig. 1 schematizza le comuni vie di interscambio del Fe tra i maggiori compartimenti.

Sistema regolatore eritrocitario

È verosimile che, accanto al già descritto sistema regolatore dei depositi, esista anche un altro sistema di regolazione marziale che si ritiene localizzato nel compartimento eritroide midollare che risulta molto sensibile alla disponibilità di Fe. In effetti, ci sono situazioni in cui il Fe alimentare è assorbito in quantità maggiori di quelle attribuite al compartimento regolatore di deposito. Ad es., donatori di sangue con dieta normale sono in grado di rimpiazzare da 3 a 4 mg di perdite marziali oltre alle normali perdite dei loro sistemi escretori. E ancora, pazienti con anemia da ferro-carenza ed in terapia sostitutiva marziale possono assorbire da 20 a 40 mg/die di Fe finquando l'anemia è presente ma riducono le quantità di assorbimento man mano che l'anemia si corregge. Un analogo comportamento è stato poi osservato in individui con depositi normali ma con stimolazione midollare da parte dell'eritropoietina (v.; v.*; v.**). Il ruolo regolatore dell'eritropoiesi è confermato anche dal fatto che pazienti talassemici riducono la capacità di assor-

TAB. I. DISTRIBUZIONE DEL FERRO NEI TESSUTI UMANI^(*)

Compartimento	Contenuto in mg	Ferro totale (%)
Ferro emoglobinico	2500	67
Ferro di deposito	1000	27
Ferro mioglobinico	130	3,5
Pool labile	80	2,2
Ferro tissutale	8	0,2
Ferro di trasporto	3	0,08

^(*) Valori riferiti ad uomo adulto di 70 kg di peso e di 170 cm di altezza.

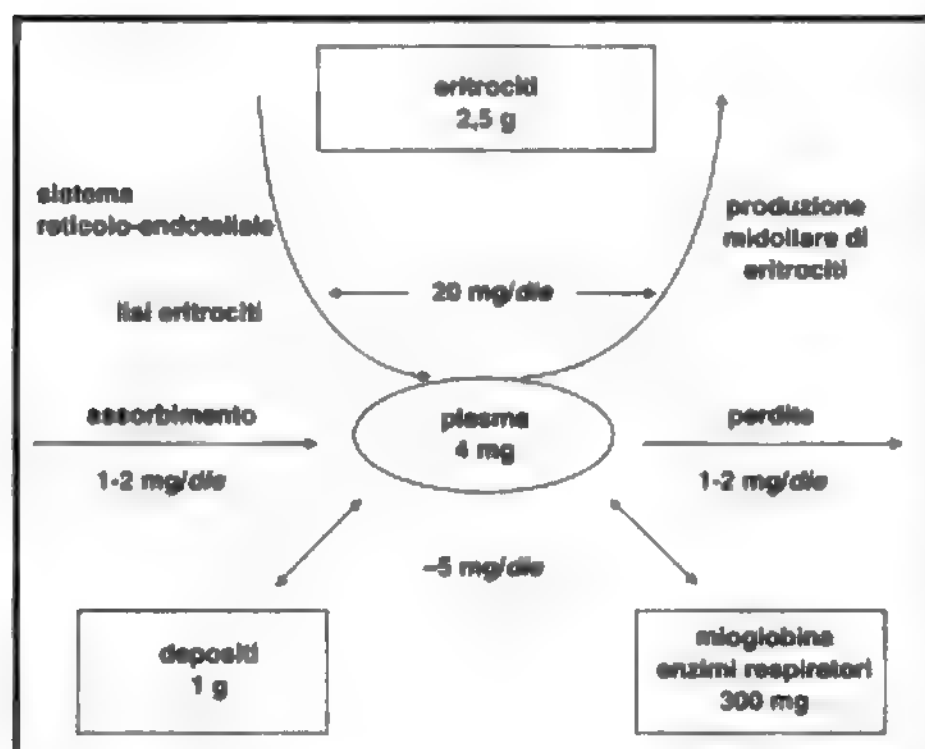


Fig. 1. Bilancio e compartimenti del Fe.

bimento marziale quando l'iperplasia eritroide midollare viene soppressa da un adeguato supporto emotrasfusionale e dalla constatazione che, nella condizione opposta dell'anemia aplastica, nonostante l'elevato livello di eritropoietina circolante, esiste un ridotto assorbimento a motivo della ridotta o virtualmente assente eritropoiesi.

La stimolazione eritroide midollare inizia quando l'anemia o l'ipossia renale comporta un'aumentata produzione di eritropoietina che, agendo su uno stroma midollare normale, porta, quale primo effetto visibile nel sangue periferico, ad un'esaltata dismissione di reticolociti. L'eritropoietina induce un'aumentata produzione eritrocitaria via apoptosi (v. **), prevenendo cioè la morte precoce dei progenitori eritrocitari. La stimolazione midollare è, però, poco utile in presenza di carenza marziale. Infatti, il Fe non solo è necessario per la sintesi emoglobinica ma è ancora più importante per la proliferazione eritrocitaria, come dimostrato dalla limitata espansione del midollo eritroide in corso di anemia da carenza di Fe. Una costante proliferazione midollare dipende dalla disponibilità del compartimento di deposito marziale a sostenere il livello plasmatico di Fe. In un periodo di due-tre settimane, individui con scorte marziali adeguate possono mobilitare da 15 a 40 mg di Fe di deposito al giorno, incrementando di 2-3 volte l'eritropoiesi basale. Nello stesso tempo, l'assorbimento di Fe viene aumentato ma, come noto, il quantitativo assorbibile con una normale dieta non eccede pochi milligrammi al giorno; ne consegue che l'incremento precoce della produzione eritrocitaria dipende solo dalle riserve marziali e che queste, con il tempo, tendono a depauperarsi.

Per quanto riguarda i meccanismi che controllano l'utilizzazione del Fe nel compartimento eritroide midollare, un ruolo importante sembra essere svolto da una proteina identificata come IRF (*Iron Regulatory Factor*), molto sensibile ai livelli di Fe intracellulare. Quando il contenuto in Fe diminuisce, la proteina si lega ai cosiddetti IREs (*Iron Responsive Elements*) dell'RNA messaggero che codifica per apoferritina, recettori per la transferrina e ALA sintetasi (v. EMOGLOBINE, V, 1408), favorendo la captazione cellulare del metallo e, di conseguenza, la sintesi dell'eme: si realizza un aumento del numero di molecole del recettore per la transferrina sulla membrana cellulare e diminuisce il fenomeno dell'intrappolamento ferritinico del Fe con conseguente maggiore uptake cellulare di Fe e aumentata sin-

tesi emoglobinica. Per contro, quando i livelli di Fe sono aumentati, l'IRF perde la capacità di legarsi agli IREs con conseguente incremento della sintesi di ferritina, diminuzione della sintesi del recettore della transferrina, aumento dell'intrappolamento ferritinico del Fe e l'uptake cellulare del Fe risulta ridotto.

Non è ancora chiaro come, in condizioni patologiche, questi due sistemi regolatori cooperino. Una ipotesi è che i due sistemi possano rispondere in tempi sequenziali. In caso di graduale deplezione, il sistema di deposito si attiva con l'instaurarsi di un bilancio negativo; successivamente, quando la carenza marziale comporta una ridotta disponibilità di Fe midollare, si realizza l'attivazione del sistema eritrocitario. La regolazione del bilancio marziale si altera quando esiste una continua richiesta eritroide per disordini proliferativi midollari, come la talassemia; in questo caso, nel tentativo di incrementare al massimo la disponibilità marziale midollare e alleviare l'anemia, il bilancio risulta continuamente positivo nonostante l'instaurarsi di una condizione di sovraccarico marziale.

Assorbimento del ferro

La quantità di Fe introdotta giornalmente con gli alimenti varia nelle diverse popolazioni in funzione delle abitudini alimentari, dei procedimenti e dei recipienti di cottura. Una valutazione esatta del contenuto in Fe dei vari alimenti ha, di fatto, scarsa utilità pratica poiché non sempre ad un maggior contenuto in Fe corrisponde una maggiore possibilità di assorbimento intestinale. È certo che, in condizioni di alimentazione completa e varia, si ingerisce giornalmente con il cibo un quantitativo di Fe (da 10 a 50 mg) che eccede di gran lunga la frazione di metallo che viene realmente assorbita. A differenza di quanto avviene per altri elementi e sostanze, per i quali il bilancio è mantenuto mediante l'eliminazione della quantità assorbita in eccedenza, nel caso del Fe l'organismo garantisce un perfetto equilibrio delle entrate e delle uscite controllando accuratamente le prime, sì da adattarle al proprio fabbisogno.

Mediamente, come già si è detto nel precedente articolo di aggiornamento (v. FERRO*), l'assorbimento giornaliero di Fe è di 0,9 mg nell'uomo adulto e di 1,3 mg nella donna in età feconda. Poiché esiste una correlazione tra contenuto in Fe e apporto calorico della dieta (all'incirca 6 mg di Fe per 1000 kcal), si comprende come la carenza di Fe per un incongruo regime alimentare rappresenti un problema rilevante per popolazioni di paesi sottosviluppati con dieta povera in calorie e carni. I dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità evidenziano uno stato di Fe-carenza nel 30% della popolazione mondiale con una incidenza superiore al 50% per i popoli dell'Africa e dell'Asia; la fascia maggiormente colpita è in ogni caso quella pediatrica. Anche nel mondo Occidentale, gli infanti ricevono sovente una dieta inadeguata alle loro necessità ove non si intervenga con l'aggiunta di Fe nei preparati dietetici o si provveda alla precoce somministrazione di cereali arricchiti in Fe. Si calcola che una dieta americana (USA) «ben bilanciata» contenga da 10 a 20 mg di Fe. Una significativa perdita di Fe può inoltre derivare dall'uso di tegami e casseroles in alluminio o plastica.

Per quanto concerne le perdite di Fe, queste avvengono essenzialmente attraverso il passaggio fisiologico di modeste quantità di globuli rossi nelle feci e nelle urine, con la desquamazione delle mucose e dell'epidermide, con il flusso mestruale, con la gravidanza e l'allattamento (tab. II). L'eliminazione del Fe ammonta a circa 0,6 mg al giorno per l'uomo adulto e a 1,2 mg/die per la donna in età feconda; ne consegue un bilancio positivo nel maschio e decisamente

TAB. II. PERDITE FISIOLOGICHE DI FERRO

Desquamazione cellulare e rinnovamento annessi cutanei	0,6 mg/die
Trasudazione di plasma nel lume intestinale	tracce
Microemorragie nel lume intestinale	0,3 mg/die
Bile (anche se riassorbito)	0,26 mg/die
Flusso mestruale	1 mg/die
Gravidanza:	
patrimonio marziale del feto	300 mg
Fe placentare	150 mg
emorragia del parto	150 mg
recupero per amenorrea post-parto	300 mg
Totale perdite	300 mg
Allattamento per 4-5 mesi	120 mg

precario nella donna durante tutto il periodo che va dalla pubertà all'entrata in menopausa.

Il succo gastrico stabilizza il Fe alimentare nonemico prevenendone la precipitazione come Fe idrossido insolubile; sostanze come la *gastroferrina*, una volta ritenute regolatrici dell'assorbimento del Fe, sembrano in realtà essere delle mucine, proteine che legano il Fe nell'ambiente acido dello stomaco e lo rendono disponibile per l'assorbimento nell'ambiente alcalino dell'intestino, senza peraltro esercitare alcun effetto regolatore. Il Fe viene quindi trasferito dalle mucine ad alcune proteine presenti sulla superficie degli enterociti, recentemente identificate come β_2 -integrine (v. ADESIONE, MOLECOLE DI**) di 90-150 kd. Queste integrine facilitano il trasferimento del Fe attraverso la membrana cellulare al citosol dove il Fe si lega ad un'altra proteina citosolica di trasporto, identificata come *mobiferrina* di 56 kd. Il complesso Fe-mobiferrina attraversa la cellula mucosa ed entra nella rete capillare ove il metallo viene ossidato a Fe^{3+} e legato alla transferrina che provvede alla sua distribuzione nei tessuti e siti di utilizzo, in particolare quello emopoietico. La ceruloplasmina, una ferrossidasi plasmatica, induce la conversione da Fe^{3+} a Fe^{2+} non appena si sia verificato l'ancoraggio alla transferrina.

Poiché la quantità di Fe all'interno degli enterociti rimane in equilibrio con le riserve corporee, la captazione del metallo da parte della mucosa potrebbe essere regolata dal numero dei siti di legame per il Fe della mobiferrina. La velocità di assorbimento del Fe è influenzata da molti fattori. Uno di questi è certamente rappresentato dal contenuto in Fe delle cellule della mucosa intestinale. Esistono poi evidenze sperimentali per una sorta di meccanismo di «intrappolamento» del Fe nelle cellule mucose quando il livello di Fe nell'organismo è alto; al contrario, in caso di carenza, il meccanismo dell'intrappolamento sembra disinnescarsi e il Fe può facilmente passare dal lume intestinale nelle cellule della mucosa e quindi nel plasma. Con il passare del tempo, le cellule della mucosa si superficializzano nel villo e si sfaldano perdendosi nelle feci insieme al loro carico marziale. Inoltre, una parte del Fe plasmatico può penetrare stabilmente nelle cellule della mucosa ed essere poi disperso con lo sfaldamento. Questo semplicistico meccanismo può, in parte, contribuire alla fisiologica escrezione intestinale del Fe. Alla modulazione dell'assorbimento del Fe sembrano contribuire anche la ferritina e la transferrina. La ferritina si ritrova incorporata nei cosiddetti «F bodies», e sembra contribuire a prevenire il passaggio plasmatico di Fe non necessario. Per contro, negli stati di carenza marziale, un aumento dell'assorbimento di

Fe si realizza attraverso la maggiore disponibilità dell'apotransferrina.

Ancora poco noti sono invece i meccanismi con i quali altre sostanze dell'apparato gastroenterico, in particolare bile e succo pancreatico, possano influenzare l'assorbimento del Fe che, come noto, è aumentato in corso di malattie croniche del fegato e del pancreas. Ma anche sostanze esterne possono interferire con l'assorbimento marziale: alcuni cibi, gli agenti riducenti e l'alcool influenzano la velocità di assorbimento; ossalati, fitati e fosfati si complessano con il metallo e ne rallentano l'assorbimento; ascorbato, lattato, piruvato, fruttosio, cisteina e sorbitolo lo esaltano. Tra i fattori extra-intestinali in grado di influenzare l'assorbimento del Fe vanno considerati l'ipossiemia, l'anemia, la deplezione delle riserve marziali e l'aumentata eritropoiesi. Ognuno di questi fattori sembra modificare in maniera differente il meccanismo dell'assorbimento, forse attraverso segnali umorali (eritropoietina, saturazione della transferrina, ferro plasmatico, etc.) che agiscono direttamente sulla mucosa intestinale.

Per lo studio e la valutazione chimico-clinica del metabolismo del ferro, v. FERRO (VI, 1491-1515); FERRO* (*3175-3182); FERRITINA (VI, 1488); FERRITINA* (*3172); SANGUE (XIII, 1936-1943); SIDEREMIA (XIV, 199); SIDERURIA (XIV, 202); TRANSFERRINA (XV, 220-222); TRANSFERRINA**.

Bibliografia

- Casey J.L., Di Jeso B., Rao K. et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1988, 526, 54.
 Cazzola M., *Hematology*, 1987, 72 (Suppl.), 195.
 Conrad M. E., Umbreit J. N., *Am. J. Hematol.*, 1993, 42, 67.
 Desforges J. F., *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 190.
 Enns C. A., Soumanalanin J., Gebhardt J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 3241.
 Fairbanks V. F., Beutler E., *Hematology*, 1995, McGraw-Hill, New York, p. 369.
 Finch C., *Blood*, 1994, vol. 84, n. 6, 1697.
 Gatter K. C., Brown G., Trowbridge L. S., *J. Clin. Pathol.*, 1983, 36, 539.
 Gordeuk V. R., Brittenham G. M., McLaren C. E. et al., *Blood*, 1986, 67 (3), 745.
 Larrick J. W., Logue G., *Lancet*, 1980, II, 862.
 Miller Y. E. C., Jones C., Scoggin C. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1983, 35, 573.
 Salvio E., Gaetani G. F., Crosby W. H., *Le anemie*, 1989, UTET, Torino, p. 57.
 Seligman P. A., *Progr. Hematol.*, 1983, 13, 131.
 Trowbridge L. S., Newman R. A., Domingo D. L. et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 925.

FRANCO AVERSA E GIULIANA BARBABIETOLA

FETICISMO [v. vol. VI, coll. 1516-1519]

Per quanto riguarda la nosologia psichiatrica, il feticismo è attualmente incluso nel Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali - 4ª Edizione (DSM-IV) nel capitolo sui Disturbi Sessuali e dell'Identità di Genere, e precisamente tra le Parafilie.

I criteri per fare diagnosi di Feticismo secondo il DSM-IV sono i seguenti:

- a) per un periodo di almeno 6 mesi, presenza di fantasie intensamente eccitanti, impulsi sessuali o comportamenti che comportano l'uso di oggetti inanimati (per es., biancheria intima femminile);
- b) le fantasie, gli impulsi sessuali o i comportamenti causano disagio clinicamente significativo, o compromissione dell'area sociale, lavorativa, o di altre aree importanti del funzionamento;
- c) gli oggetti feticistici non si limitano ad articoli di biancheria femminile usati nel travestimento (come nel f. di travestimento) o a strumenti progettati per la stimolazione tattile dei genitali (per es., un vibratore).

Come si vede, la definizione attuale di feticismo è limitata da precisi criteri di durata (almeno 6 mesi) e di gravità del disturbo (disagio soggettivo o compromissione della vita sociale e di relazione): ciò rispecchia un'evoluzione nosologica ben precisa. Nelle precedenti edizioni del DSM il f. veniva definito semplicemente come l'uso ripetuto o esclusivo di oggetti inanimati (né biancheria usata per travestirsi né oggetti progettati per la stimolazione genitale) per raggiungere l'eccitazione sessuale (DSM III, 1980), senza indicazione di ulteriori parametri di gravità, intensità, o durata. Nella edizione successiva (DSM-III-R, 1987) la definizione del disturbo riportava criteri di durata analoghi a quelli attuali, ma, diversamente rispetto all'ultima classificazione, esisteva la possibilità di diagnosticare come f. anche il comportamento feticistico egosintonico che non causa problemi relazionali o sociali.

Questa evoluzione nosologica riflette la crescente attenzione verso una definizione precisa del f. e delle paralilie in genere, e la necessità di delineare e ampliare i limiti del comportamento sessuale normale rispetto alle forme francamente patologiche. Esiste, in effetti, anche un feticismo «normale». Ad es., nell'innamoramento si verifica un certo grado di idealizzazione del corpo del *partner*, che è connessa alla capacità di investire sentimenti affettivi ed erotici sull'oggetto amato. Questa idealizzazione può anche estendersi all'abbigliamento o ai beni dell'amato, che pertanto possono acquisire funzioni feticistiche.

Nell'ambito della pratica clinica psicoanalitica, dove questo tipo di funzionamento, di solito molto bene occultato, ha maggiori possibilità di emergere, si limita generalmente il concetto di f. patologico a quelle deviazioni della scelta dell'oggetto sessuale che abbiano carattere abituale e obbligatorio.

Per quanto concerne gli sviluppi della teoria psicoanalitica, le interpretazioni del f. vertono a tutt'oggi sull'angoscia di castrazione, che già Freud aveva considerato come il fulcro del disturbo. Nonostante la psicoanalisi di oggi attribuisca particolare importanza al ruolo delle turbe pregenitali nello sviluppo delle perversioni, la loro rielaborazione durante la fase edipica è considerata centrale nel f., e la presenza di disturbi narcisistici in questi soggetti va comunque interpretata nell'ambito della conflittualità edipica e dell'angoscia di castrazione.

Nondimeno, sono state avanzate anche ipotesi differenti. Alcuni AA. hanno messo in risalto le difficoltà di relazione precocissime di questi pazienti, e le analogie tra la funzione del feticcio e quella dell'oggetto transizionale: l'impossibilità di sperimentare l'integrità corporea connessa ad una interazione disarmonica tra il bambino e la madre nelle fasi iniziali dello sviluppo porta alla ricerca di un oggetto rassicurante, inflessibile, immutabile, e duraturo. In quest'ottica, il feticcio ha dunque la funzione di un oggetto transizionale che deve ovviare alla mancanza di una relazione sufficientemente rassicurante con la madre.

Analogamente, nell'ambito della Psicologia del Sé il feticcio è stato considerato come un sostituto dell'oggetto-sé (funzione, questa, normalmente assolta dalla madre durante le fasi iniziali dello sviluppo). Il f. potrebbe dunque essere espressione, più che di un intenso bisogno sessuale di un oggetto narcisistico, dell'angoscia per il timore della perdita del proprio senso di sé e della propria integrità.

Bibliografia

American Psychiatric Association (1980), *Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-III)*, 1983, Masson, Milano.
American Psychiatric Association (1987), *Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-III-R)*, 1988, Masson, Milano.

American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*, 1994, American Psychiatric Association, Washington, D.C.

American Psychiatric Association, *Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-IV)*, 1996, Masson, Milano.

Gabbard G. O. (1994), *Psichiatria psicodinamica*, 1995, Raffaello Cortina Editore, Milano.

Greenacre P., *Fetichism*, in Rosen I. ed., *Sexual deviation*, 1979, Oxford University Press, Oxford.

Kernberg O. F. (1992), *Aggressività, disturbi della personalità e perversioni*, 1993, Raffaello Cortina Editore, Milano.

Kohon G., *Int. J. Psycho-Anal.*, 1987, 68, 213.

ROMOLO ROSSI E PIERA FELI

FETO [v. vol. VI, coll. 1519-1542; Agg. I, coll. *3182-3208]

SOMMARIO GENERALE

TECNICHE ATTUALI DI IMMAGINE NELLA PATOLOGIA FETALE	col. 2258
PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE	col. 2267
CHIRURGIA FETALE	col. 2278

TECNICHE ATTUALI DI IMMAGINE NELLA PATOLOGIA FETALE

SOMMARIO

Ecografia (col. 2258): *I trimestre di gravidanza. - II trimestre di gravidanza. - III trimestre di gravidanza. - Flussimetria Doppler periferica materno-fetale. - Risonanza magnetica nucleare (RMN) in gravidanza* (col. 2265).

Ecografia

L'ecografia è la tecnica d'elezione nella diagnostica per immagini in gravidanza (v.: VII, 761-770). Si ritiene che l'impiego degli ultrasuoni in gravidanza sia esente da rischi in quanto non sono stati dimostrati effetti dannosi, anche a lungo termine, sul feto [f.].

Lo scopo principale dell'esame ecografico è di controllare il regolare sviluppo fetoplacentare e ricercare le eventuali patologie malformative; l'ecografia costituisce inoltre un indispensabile ausilio alle metodiche invasive (prelievo dei villi coriali, amniocentesi, funicolocentesi, biopsia di tessuti fetali quali cute e fegato) utilizzate nella diagnosi prenatale delle anomalie embriofetali. La possibilità di rilevare un'anomalia dipende dall'epoca di gravidanza, dalla posizione del feto nell'utero, dalla quantità di liquido amniotico e dallo spessore della parete addominale materna; perciò è possibile che anomalie fetali, sfuggano all'esame ecografico per i limiti intrinseci della metodica. La sensibilità varia in rapporto all'esperienza dell'operatore ed anche alla patologia che si indaga.

Normalmente vengono misurati l'estremo cefalico, l'addome ed il femore del feto al fine di accertarne il regolare sviluppo e accrescimento; l'ecografia, inoltre, consente di valutare alcuni organi interni quali la vescica, i reni, lo stomaco e le strutture intracraniche, etc. Per quanto riguarda altre parti del corpo fetale (ad es. il cuore) (v. sotto, col. **2267-2278), vengono eseguiti esami approfonditi soltanto quando vi sia l'indicazione specifica.

I trimestre di gravidanza

Nelle primissime settimane di gravidanza, l'ecografia rappresenta la metodica più accurata per valutare l'epoca gestazionale e il regolare impianto del sacco gestazionale. L'alta incidenza di pazienti affette da irregolarità mestruali nonché l'importanza clinica di individuare, quanto più precocemente possibile, la gravidanza ad alto rischio per ritardo di crescita intrauterino del feto (IUGR; *Intra Uterine*

Growth Retard) richiedono una sempre maggior precisione nella definizione dell'epoca di gestazione.

Nei primi due mesi di gravidanza, l'utilizzazione della sonda transvaginale (v. ECOGRAFIA**) consente di ottenere immagini più dettagliate dell'ecografia con approccio sovrapubico.

L'ecografia transvaginale (ETV) prevede infatti l'impiego di sonde ad alta frequenza, cioè da 6,5 e 7 MegaHertz (MHz) che, grazie all'aumentata definizione delle immagini, permette di valutare accuratamente l'epoca di comparsa e lo sviluppo sia delle strutture embriofetali che dei loro annessi.

Il primo segno affidabile di gravidanza intrauterina è rappresentato dal riscontro ultrasonico del *sacco gestazionale* che può essere messo in evidenza, fin dalla V settimana di gestazione (fig. 1, A).

La seconda struttura visualizzabile ecograficamente in ordine cronologico è rappresentata dal *sacco vitellino* che compare a partire dalla V settimana più 4 giorni (fig. 1, B).

La visualizzazione dell'*embrione* è possibile a partire dalla VI settimana di amenorrea, epoca in cui il sacco gestazionale misura più di 15 mm e l'embrione è adiacente al sacco vitellino. I movimenti attivi embriofetali sono evidenti già dalle VIII-IX settimane di gestazione.

A partire dalla VII settimana di amenorrea, l'embrione risulta sempre chiaramente evidenziabile; la stima più attendibile dell'epoca di gravidanza è rappresentata dalla misurazione del diametro cervico-podalico (CRL; *Crown Rump Length*).

Nella fase iniziale della gravidanza, perdite ematiche e dolori pelvici possono far sospettare un'interruzione di gra-

vidanza intrauterina (aborto) o una gestazione ectopica (gravidanza extrauterina).

Quando in una donna con amenorrea e altri segni tipici della gravidanza non viene visualizzata nella cavità uterina la camera gestazionale, è ragionevole pensare ad una *gravidanza extrauterina*. In tal caso si rileva un utero aumentato di volume con endometrio ispessito e senza camera gestazionale; a tale reperto si associa una massa annessiale, che spesso assume l'aspetto di sacco gestazionale, e un versamento nello scavo pelvico.

Nella *minaccia d'aborto* l'ecografia transvaginale consente di rilevare il sacco gestazionale in utero alla IV settimana di amenorrea e il battito cardiaco fetale alla V mentre, mediante apparecchi con sonda addominale, ciò è possibile una settimana più tardi.

L'*aborto interno* può essere diagnosticato mediante ecografia addominale a partire dalla sesta settimana quando, in presenza di echi embrionali, l'attività cardiaca è assente. Impiegando la sonda transvaginale si può anticipare la diagnosi di una settimana, a patto che l'embrione abbia raggiunto la lunghezza di almeno 5 mm.

In caso di emorragie nel I trimestre bisogna escludere una *mola vescicolare*, degenerazione cistica del trofoblasto il cui quadro ecografico è caratterizzato dalla presenza di una formazione ad ecostruttura di tipo solido disomogeneo con echi grossolani e fortemente riflettenti; le ovaie risultano ingrandite. In questi casi il dosaggio della gonadotropina corionica umana (hCG; *human Chorionic Gonadotropin*) contribuisce alla diagnosi differenziale con l'aborto interno.

In caso di *aborto clinicamente accertato*, l'ecografia viene eseguita per valutare l'eventuale presenza di residui embrionali o del sacco, condizione nota come aborto incompleto. In questa condizione la cavità uterina appare più ampia rispetto alla norma, presenta endometrio ispessito e contenuto disomogeneo.

Talvolta il sacco gestazionale è di dimensioni normali rispetto all'epoca di gravidanza ma al suo interno non è presente, come di norma, l'embrione. Questa condizione viene definita come *blighted ovum* o *gravidanza anembionica*, un'anomalia di sviluppo dell'ovulo diagnosticabile non prima della VII settimana (v. GRAVIDANZA*, coll. *3486-3487).

Può accadere che il sacco gestazionale sia normale ma impiantato nella cavità uterina in una sede anomala (*impianto anomalo*), a livello di uno degli angoli tubarici della cavità uterina (gravidanza angolare) o nella mucosa del canale cervicale (gravidanza cervicale).

È solo a partire dall'VIII settimana che l'ecografia endovaginale consente una visione dettagliata dell'*anatomia embriofetale*. Infatti, è possibile distinguere con chiarezza la testa, il tronco e gli arti fetali, la colonna vertebrale che presenta la sua caratteristica immagine «a binario». Gli abbozzi degli arti sono evidenziabili con sufficiente chiarezza oltre le 9 settimane (figg. 2, 3 A-B).

Per quanto riguarda la *patologia malformativa*, nel I trimestre di gravidanza, sono evidenziabili le malformazioni più grossolane sia del sistema nervoso centrale (anencefalia, meningocele, mielomeningocele, etc.), sia della faccia (labiopalatoschisi), sia difetti di chiusura della parete addominale con erniazione parziale o totale dei visceri addominali. Dalla XIII settimana è possibile diagnosticare anche le malformazioni maggiori dell'apparato urinario.

Sempre a partire dalla XIII settimana è visibile l'immagine a quattro camere del cuore; la diagnosi precisa delle cardiopatie congenite risulta difficile nella ecografia eseguita in fase di *screening*. Se nel corso dell'esame di base viene descritta un'alterazione della morfologia c/o della

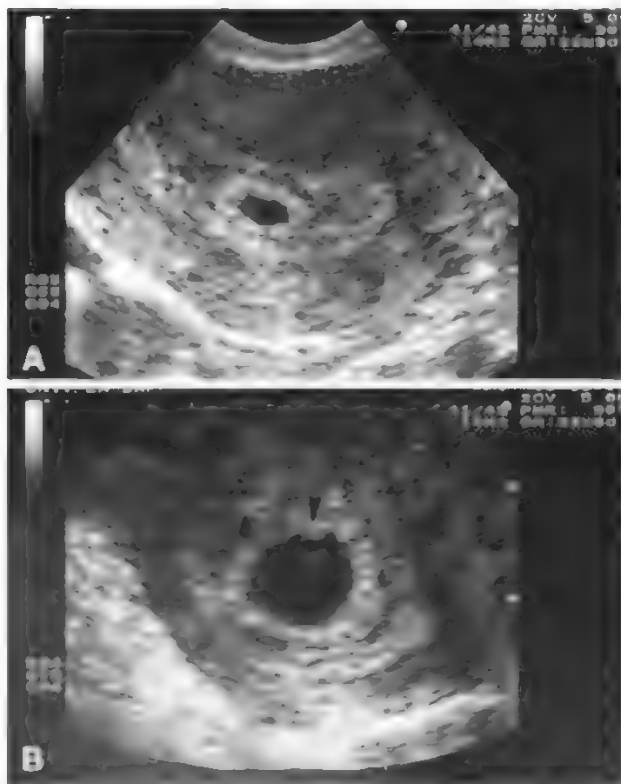


Fig. 1 Ecografia transvaginale. A) Normale impianto del sacco gestazionale alla V settimana di gestazione. B) Visualizzazione del sacco vitellino (8,1 mm) interno al sacco gestazionale alla VI settimana di gestazione.



Fig. 2. Ecografia transvaginale. Immagine dell'embrione alla IX settimana di gestazione: si evidenzia il f. in tutta la sua lunghezza (CRL), il sacco vitellino (VS), gli abbozzi degli arti (freccia bianca) e il cordone ombelicale (punta di freccia).

funzionalità cardiaca, si rende necessario inviare la gestante in centri specializzati ove verrà sottoposta ad indagini più approfondite tra cui un ecocardiogramma fetale allo scopo di porre una diagnosi in epoca prenatale (possibile nel 50% dei casi), apprezzare la gravità della cardiopatia congenita, valutare i rischi che comporta e le possibilità terapeutiche (v. FETO*, *patologia cardiovascolare*, coll. *3194-3202; v. sotto, coll. **2267-2278).

Possiamo suddividere i f. da sottoporre ad un esame ecocardiografico in due gruppi: il primo gruppo comprende i f. con ascendenti o fratelli portatori di cardiopatie congenite, i f. di madri diabetiche o alcolizzate; il secondo comprende f. con disturbi del ritmo cardiaco, con malformazioni extra-cardiache che solitamente si associano a quelle cardiache o affetti da una cromosomopatia (ad es. sindrome di Down).

La diagnosi di *gravidenza gemellare* è possibile mediante l'ecografia a partire dalla quinta settimana. L'esame ecografico ha il ruolo di: identificare il numero di embrioni o f.; definire il tipo di placentazione e il numero delle membrane amnio-coriali; riconoscere i f. con difetto di crescita intrauterino (IUGR); diagnosticare malformazioni fetali.

Una patologia specifica della gravidanza gemellare precoce è il fenomeno del *vanishing twin* (gemello che scompare). Quando la diagnosi di gravidanza gemellare viene formulata prima della X settimana, l'incidenza di scomparsa di un gemello è del 71,4%; se il riscontro ecografico dei due f. avviene tra la decima e la quindicesima settimana di gestazione essa si abbassa al 62,5%; nelle gemellarità identificate per la prima volta dopo la quindicesima settimana di gravidanza non si assiste mai alla scomparsa di un gemello.

Nella gravidanza multipla, il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) rappresenta uno dei fattori ricorrenti di mortalità perinatale. Nella gravidanza gemellare la percentuale di IUGR è del 25%, almeno 10 volte superiore rispetto alla gravidanza singola. È pertanto necessario effettuare un monitoraggio ecografico accurato ripetendo l'esame ogni quattro settimane.

Nel corso dell'esame ecografico di *screening* è importante evidenziare masse pelviche e stabilire se esse possano rappresentare un pericolo immediato per la madre o il nascituro (patologia neoplastica ovarica o endometriale, utero bicornuto) o creare problemi nell'espletamento del parto (fibromiomi situati in prossimità della cervice).



Fig. 3. Ecografia transvaginale. Immagine del f. alla XI settimana di gestazione. A) Si evidenzia la testa con l'arto superiore visibile in tutta la sua estensione: braccio, avambraccio e mano. B) Profilo fetale.

Il trimestre di gravidanza

Nel II trimestre di gravidanza gli organi fetali sono meglio visualizzabili all'ecografia grazie al loro maggiore sviluppo (fig. 4).

Lo *screening* dovrebbe essere sufficientemente precoce in modo da poter programmare eventuali esami complementari e permettere, per le patologie più gravi, l'interruzione della gravidanza nei termini previsti dalla legge.

Secondo le associazioni statunitensi AIUM e ACR le patologie fetali che vengono considerate diagnosticabili, nella maggioranza dei casi, con l'esame ecografico eseguito fra 20 e 24 settimane in gravidanze a rischio malformativo, sono:

a) per l'*apparato cardiovascolare*: versamento pericardico con spessore superiore a 2 cm, cuore sinistro ipoplasico, cuore destro ipoplasico;

b) per il *sistema nervoso centrale*: anencefalia, idroencefalia, dilatazione dei ventricoli cerebrali superiore a 15 mm, oloprosencefalia, spina bifida aperta, microcefalia (circonferenza cranica inferiore al 10° centile), cisti della fossa cranica posteriore superiori a 2 cm, cefalocele occipitale e frontale, poroencefalia superiore a 1 cm;

c) per l'*apparato urinario*: idronefrosi mono- e bilaterale (superiore a 10 mm), rene multicistico monolaterale, agenesia renale bilaterale, rene policistico infantile, megavecica (superiore a 3 cm), masse solide renali (superiori a

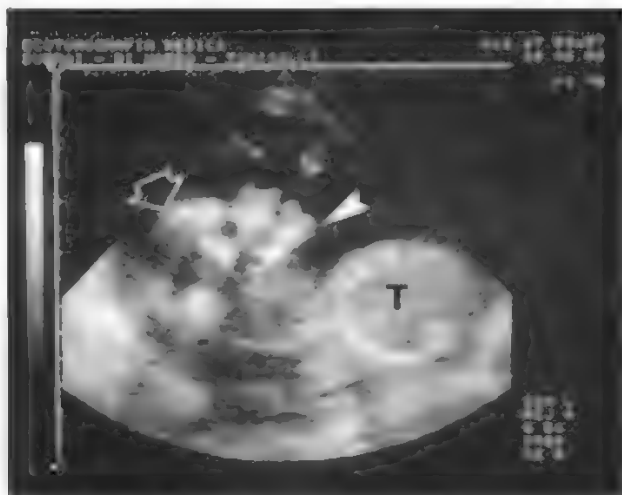


Fig. 4. Ecografia transaddominale. Immagine del volto fetale alla XX settimana di gestazione: sono ben evidenziabili la fronte (freccia vuota), il mento (punta di freccia bianca), la bocca, il naso e gli occhi. T) Torace.

3 cm), urinoma paranefrico (superiore a 3 cm), megauretere associato ad idronefrosi;

d) per l'apparato gastroenterico: ascite imponente, dilatazione del tratto terminale dell'intestino associata a polidramnio, cisti addominale o pelvica superiore a 2 cm, cisti epatica superiore ad 1 cm, calcificazioni peritoneali;

e) per l'apparato scheletrico: osteogenesi imperfetta letale, acondrogenesi, distrofia toracica asfissiante, acondroplasia omozigote, assenza di entrambi i due arti superiori, assenza di uno e entrambi gli arti inferiori, misura del femore inferiore alla seconda deviazione standard, agenesia del sacro.

L'epoca migliore per la visualizzazione delle ossa lunghe degli arti è fra la diciottesima e la venticinquesima settimana di età gestazionale, sia perché i movimenti fetali sono più frequenti e più ampi, sia perché la quantità di liquido amniotico è maggiore in proporzione al totale della cavità uterina ed al volume occupato dal f. I piedi e le mani sono visualizzabili in termini di «presenza-assenza».

Nel II trimestre, tra la XII e XX settimana di gestazione, è possibile effettuare la diagnosi prenatale di sesso (v. GRAVIDANZA*, coll. *3474-3475) che rappresenta un importante ausilio diagnostico in caso di malattie genetiche legate al cromosoma X.

III trimestre di gravidanza

L'esame ecografico eseguito a 30-34 settimane ha lo scopo di escludere ritardi di accrescimento fetale ed eventuali difetti o malformazioni, studiare l'impianto placentare rispetto alla cavità ed al collo uterino, l'aspetto ecostrutturale della placenta e la quantità di liquido amniotico.

Occorre riconoscere precocemente il ritardo di accrescimento intrauterino (IUGR), molto spesso sinonimo di sofferenza fetale cronica, per stabilire la gravità del rischio fetale e scegliere tempestivamente sia il momento che le modalità di espletamento del parto (per via naturale o con taglio cesareo). I parametri biometrici (DBP = diametro biparietale, DTA = diametro trasverso addominale, LF = lunghezza del femore) presentano nei controlli ecografici seriati valori inferiori rispetto a quelli previsti per l'età gestazionale.

Il metodo migliore per la valutazione ecografica della IUGR nel III trimestre consiste nella determinazione del

rapporto circonferenza cefalica/circonferenza addominale ($H/A = \text{Head/Abdominal}$), che permette di distinguere la IUGR con crescita fetale simmetrica, ma ai limiti inferiori della norma, dalla crescita asimmetrica, con accrescimento della circonferenza cranica progressivo e continuo (risparmio del cervello) e arresto o diminuzione della circonferenza addominale per consumo delle scorte epatiche (glicogeno) con conseguente riduzione dell'organo. Quando le scorte sono esaurite, la testa non cresce più ed occorre espletare il parto immediatamente.

Lo studio flussimetrico si esegue per evidenziare le alterazioni a carico della circolazione ombelicale, fetale ed utero-placentare caratteristiche dello IUGR. Di questo tratteremo in maniera più approfondita nella sezione della flussimetria alla quale si rimanda (v. sotto coll. **2264-2265; v. anche GRAVIDANZA*, coll. *3463-3466).

L'ecografia consente di studiare la morfologia e il grado di maturazione placentare e quindi di escludere alterazioni patologiche della placenta che, compromettendo gli scambi materno-fetali, provocherebbero uno stato di sofferenza del f.

Nelle metrorragie del III trimestre l'ecografia permette di effettuare una diagnosi differenziale tra la placenta previa e il distacco intempestivo di placenta normalmente inserita.

La placenta impiantata in prossimità dell'orifizio uterino interno (OUI) viene definita *placenta previa marginale*; si distingue inoltre una *placenta previa laterale* quando il bordo placentare è situato a più di 3 cm dalla periferia dell'OUI e una *placenta previa centrale* quando l'OUI è coperto dalla placenta. Nella maggioranza dei casi di impianto placentare a livello dell'orifizio uterino interno riscontrato ad esami ecografici effettuati tra la XVI e la XX settimana, controlli successivi evidenziano una «migrazione» verso l'alto dell'inserzione stessa. La persistenza nel III trimestre del dato ecografico, associato ad una sintomatologia emorragica, depone invece per placenta previa.

Il distacco intempestivo di placenta normalmente inserita può essere parziale o totale. Nel distacco parziale si osserva ecograficamente un'immagine semilunare anecogena, situata tra la placenta e la parete uterina, che è da riferire all'ematoma sottoplacentare. Il distacco totale è una condizione estremamente grave sia per la madre che per il f., caratterizzata dalla separazione di tutta o quasi tutta la placenta dalla sua sede di inserzione.

Mediante l'esame ecografico effettuato nel III trimestre è possibile stabilire se il liquido amniotico è presente in eccesso, condizione nota sotto il nome di *polidramnio*, o in difetto, *oligoidramnio*, rispetto alla norma. Ecograficamente, nel polidramnio si osservano sacche di liquido amniotico superiori agli 8 cm, nell'oligoidramnio inferiori ad 1 cm.

Il monitoraggio ecografico effettuato nel III trimestre consente inoltre di tracciare un *profilo biofisico e comportamentale del f.*, indicativo del suo stato di benessere e maturazione, basato sui seguenti parametri: movimenti respiratori fetali, movimenti del corpo fetale, tono fetale (atteggiamento in flessione degli arti e della testa), movimenti fetali oculari a tipo intermittente, volume del liquido amniotico e grado di maturità placentare.

Flussimetria Doppler periferica materno-fetale

L'ultrasonografia Doppler effettuata durante la gravidanza permette di valutare la velocità del flusso di sangue fetoplacentare e il flusso di sangue materno verso la placenta. Le alterazioni di questi parametri determinano lo sviluppo di una sofferenza fetale cronica la cui conseguenza è spesso la ritardata crescita intrauterina (IUGR) o la morte fetale.

Fig. 5. Eco-Color Doppler. Immagine a colori del flusso sanguigno all'interno dei vasi del funicolo ombelicale. A sinistra: tracciato flussimetrico dell'arteria ombelicale.



Mediante la flussimetria Doppler viene studiato il flusso ematico nei vasi del funicolo ombelicale (fig. 5), nell'aorta, nelle carotidi e nelle arterie cerebrali medie del feto. Lo studio viene completato sui vasi materni (rami dell'arteria uterina).

La velocità sanguigna viene rappresentata sotto forma di un'onda che presenta un picco massimo, corrispondente alla velocità massima raggiunta durante la *sistole* e un livello minimo che corrisponde alla *diastole*. In condizioni normali, a livello della circolazione fetoplacentare ed uteroplacentare, esistono basse resistenze. Se le resistenze vascolari crescono, la velocità del flusso ematico si riduce durante la sistole ma in maggior misura nella diastole con conseguente diminuzione degli scambi maternofetali. Nei casi più gravi il flusso ematico durante la diastole è molto ridotto o assente ed in tale condizione il f. presenta uno stato di grave carenza di ossigeno e sostanze nutritive.

In caso di ritardata crescita del f. (IUGR), l'associazione della flussimetria al controllo ecografico permettono una valutazione più accurata del rischio perinatale.

Nello IUGR si osserva un ostacolo al flusso ematico con una velocità di flusso aumentata a livello dell'arteria cerebrale media e ridotta nell'aorta discendente e nell'arteria ombelicale. Ciò dimostrerebbe che in caso di IUGR esiste un'aumentata resistenza a livello del tronco fetale e della placenta e una diminuzione compensatoria delle resistenze a livello cerebrale: in caso di difettosa ossigenazione sanguigna si verificano cioè dei fenomeni che tendono a risparmiare il cervello del f. (centralizzazione del circolo).

V. anche: GRAVIDANZA*, coll. *3463-3466).

Risonanza magnetica nucleare (RMN) in gravidanza

La Tomografia a Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) ha in comune con l'ecografia la possibilità di ottenere immagini multiplanari e la potenziale non nocività, in quanto basata sull'impiego di radiazioni non ionizzanti, a basso contenuto energetico. A differenza dell'ultrasonografia, l'RMN consente di effettuare lo studio con ampio campo di vista permettendo, nelle gravidanze al III trimestre, la vi-

sualizzazione completa del f. e della cavità uterina (V. GRAVIDANZA*, coll. *3462-3463, fig. 1).

La RMN è un esame molto costoso che necessita di lunghi tempi di esecuzione. I movimenti fetali determinano gravi artefatti nell'immagine: pertanto, al fine di ottenere un esame attendibile, può essere necessario immobilizzare l'embrione mediante curarizzazione. Nelle ultime settimane di gravidanza, i movimenti fetali sono in genere piuttosto scarsi; ne consegue che la RMN può essere utilizzata per lo studio dell'unità fetoplacentare in particolari condizioni di patologia fetale, nella valutazione dei rapporti tra placenta e canale del parto e nell'individuazione di affezioni materne concomitanti la gravidanza.

La National Radiological Protection Board (NRPB) del Regno Unito consiglia, per motivi di prudenza, di non effettuare l'RMN nelle donne ai primi tre mesi di gravidanza.

Per i motivi suddetti l'impiego dell'RMN in gravidanza è raro e riservato a quei casi selezionati di dubbia interpretazione ecografica.

Bibliografia

- Angluaco T. L., Shah H. R., Mattison D. R., Quirk J. G. jr. *Radio-graphics*, 1992, **12** (1), 91.
- Benson R. C., Coletti P. M., Platt L. D., Ralls P. W. *AJR*, 1991, **156**, 1205.
- Beomonte Zobel B., Tella S. et al., *Radiol. Med.*, 1991, **81** (3), 262.
- Bracalente G., D'Ottavio G., Ferrazzi E. et al., *Screening delle malformazioni fetali nel secondo trimestre di gravidanza*, in *Eco '94*, 1994, CIC Edizioni Internazionali, Roma.
- Bracalente G., D'Ottavio G., Periti E. et al., *Screening del ritardo di crescita intrauterino*, in *Eco '94*, 1994, CIC Edizioni Internazionali, Roma.
- Iacarino M., Arduini D., Ventrato V., *Diagnostica ecografica ostetrico-ginecologica ragionata*, 1996, Verduci Editore, Roma.
- Rizzo G., Capponi A., Carusotti C. et al., *Emodinamica cardiaca nel feto IUGR*, in *Eco '94*, 1994, CIC Edizioni Internazionali, Roma.
- Stewart P. A., *The role of the colour doppler in the diagnosis of fetal cardiac anomalies*, in *Eco '94*, 1994, CIC Edizioni Internazionali, Roma.
- Volpe G., Kurjak A., Volpe P., *Progressi in ecografia ostetrica e ginecologica*, 1992, Puglia Grafica Sud, Bari.

RAFFAELA DE NARDO, MARIA GRAZIA PETRONGARI
E CARLO DE FEUDIS

PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE

[v. Agg. I, coll. *3194-3202]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2267). - **Cardiopatie congenite** (col. 2268): *Anomalie di posizione*. - *Anomalie intracardiache*. - *Anomalie delle connessioni venose e arteriose*. - *Stenosi e attresie valvolari*. - *Masse intracardiache*. - *Accuratezza diagnostica*. - **Aritmie** (col. 2275). - **Utilizzazione clinica della diagnostica prenatale di malformazioni cardiache** (col. 2277).

Introduzione

In passato, le informazioni sul cuore fetale erano esclusivamente relative al suo ritmo, provenendo dall'auscultazione con stetoscopio o dalla registrazione dell'attività elettrica cardiaca con un ECG derivato dallo scalpo.

L'introduzione dell'ecografia e della Dopplerflussimetria ha aperto possibilità diagnostiche nello studio morfofunzionale del f. In particolare, ha permesso l'individuazione di una specifica patologia cardiovascolare che ha caratteristiche talora diverse da quelle comunemente osservate nel neonato o nel bambino.

Rispetto alla precedente stesura dell'Agg. I, nessuna importante novità si è aggiunta sulle conoscenze dell'argomento, se non il miglioramento delle tecniche di immagine. Pertanto il testo è rimasto sostanzialmente invariato, mentre sono state inserite illustrazioni più dimostrative.

L'esame ecocardiografico è facilmente eseguibile con le tradizionali sonde transaddominali a partire dalla XVI-XVIII settimana di età gestazionale. L'introduzione di sonde vaginali a elevata frequenza (6,5-7,5 MHz) ha reso possibile la visualizzazione delle strutture cardiache fetali dalla XII settimana. Tuttavia l'approccio transaddominale rimane quello fondamentale e si può affermare che il periodo migliore per eseguire l'ecocardiogramma fetale si colloca tra la XVIII e la XXVI settimana di età gestazionale, epoca in cui il favorevole rapporto tra volume fetale e volume di liquido amniotico, da un lato, e la scarsa ossificazione delle coste dall'altro, permette un'ottima visualizzazione delle strutture cardiache.

Orientando il fascio ultrasonico secondo diversi piani del torace, e quindi del cuore fetale, è possibile, localizzata la posizione del

cuore nella gabbia toracica, esaminare sequenzialmente tutte le strutture cardiovascolari. La vena cava inferiore può essere seguita a partire dal suo decorso addomino-toracico sino al suo sbocco in atrio destro, così come si può visualizzare lo sbocco in atrio destro della vena cava superiore; è altresì possibile visualizzare lo sbocco in atrio sinistro delle 4 vene polmonari.

Con l'utilizzazione di più scansioni è possibile valutare le dimensioni degli atri e dei ventricoli e le loro connessioni. Il forame ovale è facilmente identificabile, tramite il movimento, durante il riempimento atriale, verso l'atrio di sinistra. La tricuspidè si distingue dalla mitrale per l'inserzione più bassa del suo lembo settale. Il ventricolo destro si distingue dal sinistro, oltre che per la presenza della valvola tricuspidè, anche per la presenza della banda moderatrice e per una parete libera molto più trabecolata. Il setto interventricolare può simulare, a livello della sua porzione membranosa, che nel f. è estremamente sottile, una falsa immagine di comunicazione interventricolare. Le connessioni ventricoloarteriose possono essere visualizzate, in diversi piani di scansione: è opportuno ricercare l'origine dei due grossi vasi dai rispettivi ventricoli, riconoscendo l'arteria polmonare per la sua biforcazione e l'aorta per il suo percorso curvilineo. Vanno altresì indagati i loro reciproci rapporti. Il dotto arterioso viene visualizzato come struttura che parte a pieno canale dall'arteria polmonare per continuare nell'aorta discendente.

Se l'ecocardiografia bidimensionale è la tecnica fondamentale di indagine cardiaca nel f., l'ecocardiografia *M-mode* e l'esame Doppler flussimetrico aggiungono importanti informazioni sulla situazione cardiovascolare. I tracciati *M-mode* permettono la misurazione accurata delle cavità cardiache e dei grossi vasi, nonché la valutazione del movimento delle valvole e delle pareti ventricolari e atriali.

Il Doppler permette di valutare la direzione dei flussi, le velocità di flusso, e di conseguenza, eventualmente, le portate cardiache fetali (figg. 6 e 7). V. ECOCARDIOGRAFIA [v. *; v. **].

Per una trattazione approfondita dell'impiego delle tecniche di immagine nella patologia fetale, v. sopra coll. **2258-2266.

Cardiopatie congenite

La diagnostica prenatale delle anomalie strutturali cardiache sta ridisegnando l'assetto delle cardiopatie congenite fetali per quanto riguarda: 1) la loro epidemiologia; 2) la loro storia naturale; 3) la loro etiopatogenesi.

1) Nel f. sono state descritte tutte le cardiopatie congenite; tuttavia la loro frequenza è diversa rispetto a quella

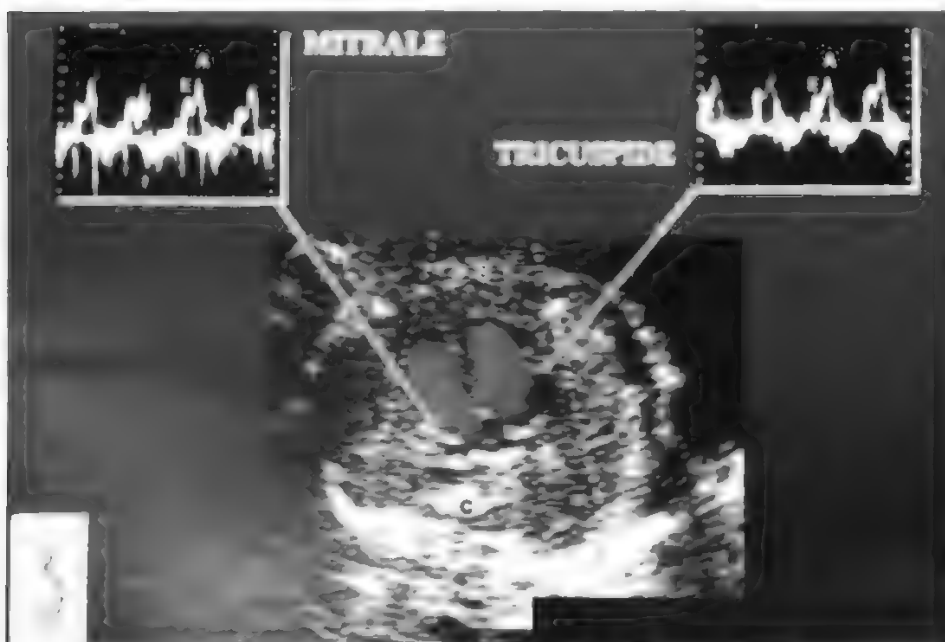
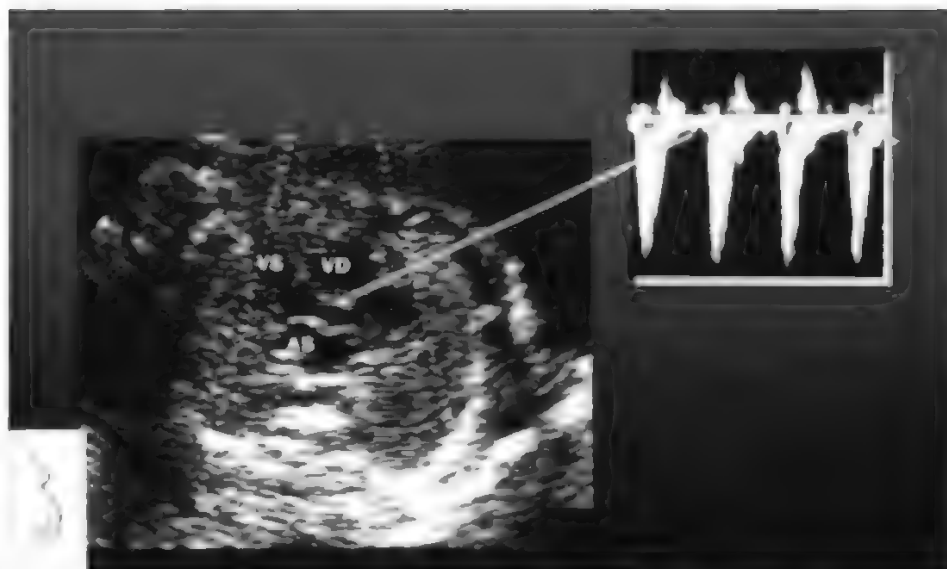


Fig. 6. Scansione 4 camere apicale normale di un f. di XX settimana di età gestazionale. La punta del cuore è in alto e gli atri in basso. Le frecce gialle indicano le valvole atrioventricolari. Sull'immagine bidimensionale si evidenzia con il color-Doppler un flusso degli atri verso i ventricoli (codificazione in rosso).

Nei riquadri si evidenzia il pattern flussimetrico ottenuto posizionando il volume campione del Doppler pulsato nei ventricoli subito al di sotto delle valvole mitrale e tricuspidè rispettivamente. In ascisse sono rappresentati i tempi ed in ordinate le frequenze Doppler proporzionali alla velocità dei flussi. La prima parte dell'onda (F) è determinata dal riempimento del ventricolo nella parte precoce della diastole e l'onda A è determinata dalla contrazione atriale. (C) colonna vertebrale, S sterno).

Fig. 7. Scansione asse lungo del ventricolo sinistro nel f. della figura precedente. Si evidenzia l'aorta ascendente (freccia) la cui parete anteriore si continua nel setto interventricolare e la cui parete posteriore si continua con il lembo anteriore della mitrale. Nell'aorta si evidenzia un flusso ad alta velocità proveniente dal ventricolo sinistro (codificato in blu dal color-Doppler). (AS atrio sinistro, VS ventricolo sinistro, VD ventricolo destro).



riscontrata nel nato. Gli 8 tipi di malformazioni in cui si riassume l'85% delle cardiopatie congenite neonatali (difetto interventricolare, tetralogia di Fallot, difetto interatriale, stenosi aortica, stenosi polmonare, trasposizione dei grossi vasi, coartazione aortica e persistenza del dotto arterioso) costituiscono nel f. soltanto il 30% dei difetti descritti. Ovviamente, la persistenza del dotto arterioso non può essere una cardiopatia nel f.: la chiusura precoce dello stesso o del forame ovale rappresentano invece situazioni patologiche.

Nella tab. I sono raffrontate le frequenze in percentuale delle diverse cardiopatie in una casistica autoptica relativa a f. di età gestazionale inferiore a 25 settimane, con una casistica di bambini e con una casistica desunta dalla letteratura e dalla nostra esperienza di tutti i casi diagnosticati in utero dopo la XX settimana. Si nota nei f., rispetto ai bambini, un'elevata frequenza di cardiopatie gravi: canale atrioventricolare, ventricolo sinistro ipoplasico, *ectopia cordis*, atresie valvolari, cardiopatia di Ebstein (cfr. fig. 4, Agg. I, col. *3196). Tra i f. (sia quelli abortiti, sia quelli indagati in utero) si nota una simile frequenza delle varie cardiopatie, eccetto per una percentuale molto più elevata di tetralogie di Fallot e di atresie valvolari nella casistica autoptica. Quest'ultimo dato starebbe a significare che le atresie valvolari e la tetralogia di Fallot sono mal sopportate emodinamicamente durante la vita fetale e in gran parte dei casi portano alla morte precoce in utero.

La differenza tra i dati fetali e quelli neonatali è probabilmente dovuta al fatto che molti f. con cardiopatie gravi muoiono in utero, o per la malformazione cardiaca, o per le malformazioni extracardiache associate. Nella serie dei feti abortiti, malformazioni associate si sono riscontrate nel 18,5% dei casi; nella serie complessiva delle diagnosi ecocardiografiche, la percentuale di malformazioni extracardiache è stata del 23%. Inoltre, nel 10 e fino al 30% in alcune serie, dei f. cardiopatici si è evidenziata un'anomalia cromosomica.

2) Seguendo l'evoluzione dei f. affetti da cardiopatie congenite si è potuta delineare, per alcune di queste, la loro storia naturale. Dai nostri dati e da quelli della letteratura emerge che lo scompenso cardiaco che nel f. si manifesta sempre con idrope generalizzata, è più frequentemente provocato da disfunzione miocardica, da atresia o da grave

insufficienza delle valvole atrio-ventricolari. La maggioranza delle altre cardiopatie come la TGA (trasposizione delle grosse arterie) e il ventricolo sinistro ipoplasico sono invece perfettamente ben tollerate.

3) Poco si conosce sull'etiologia di queste malformazioni. Più frequentemente viene invocata l'ereditarietà multifattoriale (v. CUORE**, *genetica delle cardiopatie congenite*).

TAB. I. FREQUENZE DI MALFORMAZIONI CARDIACHE NEL FETO E NEI BAMBINI

Malformazioni	Feti %	Autopsie fetali %	Bambini %
Canale atrioventricolare	15,5	10,5	2,0
DIV	12,5	10,5	2,3
VS ipoplasico	9,0	2,6	1,5
<i>Ectopia cordis</i>	7,7	2,6	0,013
Ipoplasia aortica, coartazione	7,3	7,9	5,1
Tetralogia di Fallot	7,3	18	9,7
Ventricolo unico	6,8		1,5
Fibroelastosi, cardiomiopatia	5,6		0,94
Atresia valvola atrioventricolare o valvola atrioventricolare unica	4,7	18	1,40
Tumori	4,7		0,086
Atresia arteria polmonare	4,3		0,71
VD a doppia uscita	3,4	7	0,48
Cardiopatia di Ebstein	3,4	2,6	0,32
DIA	2,1		8,3
TGA	2,1	2,6	4,9
SA	1,7		7,1
<i>Truncus</i>	1,2	2,6	0,7

DIV: difetto interventricolare, VS: ventricolo sinistro, VD: ventricolo destro, DIA: difetto interatriale, TGA: trasposizione grosse arterie, SA: stenosi aortica

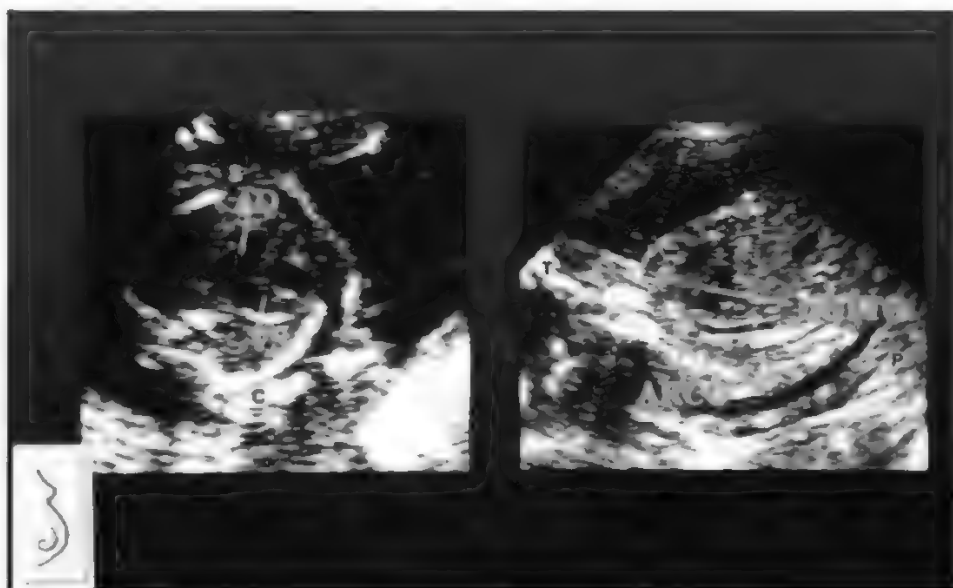


Fig. 8. Ventricolo sinistro ipoplasico: *A sinistra*: scansione 4 camere trasverse: è presente una piccolissima cavità ventricolare sinistra. *A destra*: si evidenzia l'aorta discendente e l'arco aortico in cui il flusso ha direzione retrograda (codificato in rosso). (T testa; P podice; C colonna; S sterno).

Prima dell'avvento dell'ecocardiografia era stato ipotizzato che alcune malformazioni cardiache potessero essere acquisite durante la vita intrauterina o addirittura dopo la nascita, come la coartazione aortica. In effetti, noi ed altri AA., abbiamo documentato casi di stenosi polmonare sviluppatesi dopo le XX settimane di vita intrauterina e casi di evoluzione da stenosi ad atresia della polmonare. Inoltre appaiono oggi più chiari alcuni meccanismi patogenetici; per esempio alterazioni intra- o extracardiache che diminuiscono il flusso in alcune camere possono portare allo sviluppo di malformazioni gravi: è il caso di stenosi aortiche evolute a cuore sinistro ipoplasico o il caso di chiusura precoce del forame ovale, anch'esso conducente al cuore sinistro ipoplasico, o ancora il caso di ipoplasia dell'arco aortico in feti con difetto interventricolare da maleallineamento.

Anomalie di posizione

La diagnosi di ectopia toracica o addominale è molto semplice e si effettua con la visualizzazione di una struttura pulsante al di fuori della gabbia toracica.

Più difficile è la diagnosi di eventuali malformazioni car-

diache associate, sia perché i rapporti fra il cuore e i grossi vasi sono alterati, sia perché, nei casi di ectopia addominale, la presenza di anse intestinali ne rendono difficoltosa la visualizzazione.

Anomalie intracardiache

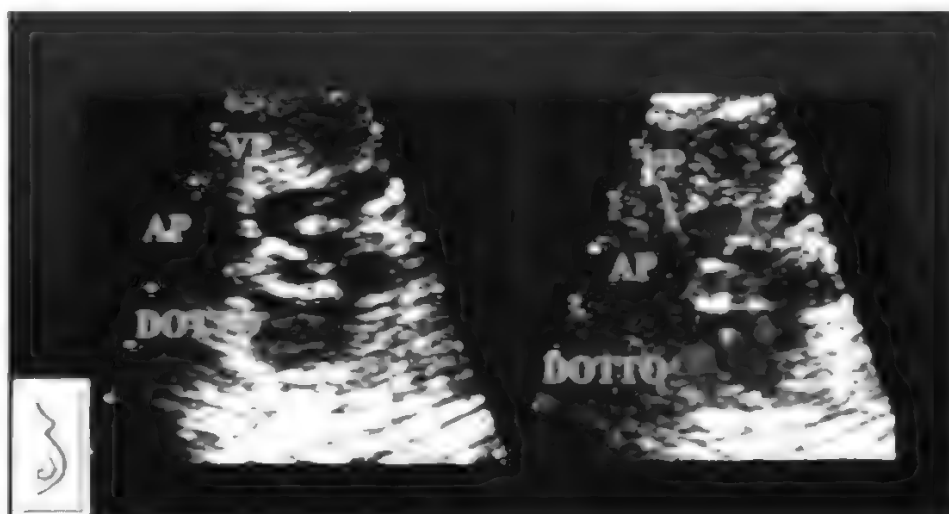
Sono facilmente rilevabili le sproporzioni fra i due atri e/o fra i due ventricoli (ad es. ventricolo sinistro ipoplasico [fig. 8], grossi difetti dei setti [fig. 9] o delle valvole). Possono invece comportare difficoltà diagnostiche piccoli difetti del setto interventricolare e la differenziazione tra atresie e stenosi delle valvole atrioventricolari. In particolare, difetti del setto muscolare possono essere misconosciuti e, al contrario, una falsa immagine di difetto può essere osservata a livello della porzione perimembranosa, che è una struttura estremamente sottile soprattutto in epoca precoce di gravidanza. Bisogna tenere presente che anche in utero è stata documentata la chiusura spontanea del difetto interventricolare.

La distinzione tra un'atresia, e una stenosi di una valvola atrioventricolare può essere difficile a causa del movimento



Fig. 9. Difetto interventricolare: *a sinistra* scansione 4 camere, si evidenzia soluzione di continuità nel setto interventricolare; *a destra*, con il color-Doppler, si evidenzia uno shunt destro-sinistro (configurazione in rosso).

Fig. 10. Atresia della polmonare. Nel riquadro a sinistra si evidenzia al centro l'aorta, la valvola polmonare (VP) e l'arteria polmonare (AP) che abbraccia l'aorta e si continua nel dotto arterioso. Il color-Doppler evidenzia un flusso che va verso la valvola polmonare (codificazione in blu), ma non l'attraversa. Nel dotto è presente un flusso retrogrado, cioè verso la polmonare (codificato in rosso).



sistodiastolico del piano valvolare, che può simulare una apertura valvolare quando, invece, è presente tessuto imperforato. Sia per i difetti settali, sia per le anomalie valvolari, l'utilizzazione del Doppler (pulsato e colore) può essere di valido aiuto, con la segnalazione della presenza e della direzione del flusso e quindi dei gradienti.

Anomalie delle connessioni venose e arteriose

Spesso il segno più eclatante di una anomalia delle connessioni venose è una sproporzione fra cuore destro e cuore sinistro, mentre è più difficile visualizzare con precisione lo sbocco venoso anomalo. Anche per le connessioni arteriose, in alcuni casi l'elemento eclatante è la sproporzione fra cuore destro e sinistro come avviene, ad es., nel ventricolo destro a doppia uscita.

Il secondo elemento è che in tutti i casi di malposizione dei grossi vasi e di anomale connessioni arteriose, si perdono i normali rapporti fra aorta e polmonare, facilmente visualizzati in asse corto, con la polmonare che tipicamente avvolge a salsicciotto l'aorta. Quasi sempre, in questi casi i due vasi sono in parallelo. Per l'identificazione certa della connessione tra un ventricolo ed il suo vaso è però indispensabile seguire l'arteria, dalla sua uscita da quel ventricolo, fino alla biforcazione in due rami per la polmonare e

fino al riconoscimento dell'arco con la normale partenza dei vasi del collo per l'aorta.

Stenosi e atresie valvolari

Se la stenosi è molto serrata o se si tratta di atresia, vi può essere ipertrofia della muscolatura della camera a monte con diminuzione del volume della cavità a valle, oppure al contrario una dilatazione estrema con ipocontrattilità della camera a monte (figg. 10 e 11).

In questi casi il Doppler può essere utile nell'identificare l'assenza di flusso in caso di atresia o una velocità di flusso aumentata in caso di stenosi. Nel caso di atresia polmonare o aortica è di aiuto la direzione del flusso nel dotto arterioso.

Se la stenosi è modesta, la diagnosi può presentare invece difficoltà in quanto le cavità ventricolari sono normali e i lembi valvolari hanno ancora una buona escursione; in questi casi l'utilizzazione del Doppler risulta dirimente. Va tenuto presente che alcune atresie o stenosi, come la stenosi polmonare, possono essere acquisite o aggravarsi durante la vita fetale.

Massie intracardiache

La presenza della massa (tumore o cisti) è di facile evidenza ecografica. Può talora invece essere difficoltosa la

Fig. 11. Atresia della polmonare: è presente un'insufficienza tricuspide evidenziata con il color-Doppler (codificata con il blu) in un atrio destro estremamente dilatato. Nel riquadro il Doppler pulsato evidenzia la elevata velocità del rigurgito.



definizione della base di impianto (sessile o pedunculata) e del rapporto con altre strutture cardiache (valvole). Non è possibile invece, almeno per ora, la caratterizzazione dei tessuti per una diagnosi anatomopatologica.

Accuratezza diagnostica

L'accuratezza diagnostica dell'ecocardiografia fetale nella diagnosi di cardiopatie congenite è espressa da una sensibilità che varia, a seconda delle casistiche dal 75 al 100% e da una specificità che si aggira sul 99-100%. Anche i valori predittivi dei test positivi e negativi riportati in letteratura sono elevati (dal 90 al 100%). Tali valori predittivi, soprattutto per quanto riguarda il test positivo, sono legati al fatto che tutte le casistiche si riferiscono a diagnostica su popolazione a rischio specifico (tab. II), in cui la prevalenza di cardiopatia congenita si aggira sul 2-6%.

Poiché la maggior parte dei casi di cardiopatia congenita si verifica tuttavia su popolazione non a rischio, sono in corso di valutazione *screening* sulla popolazione generale eseguiti in centri di ecografia ostetrica di primo livello, mediante la visualizzazione delle quattro camere cardiache e dell'incrocio dei grandi vasi, finalizzati al riconoscimento di casi anomali da inviare ai centri specialistici per una diagnosi definitiva.

Aritmie

Il ritmo cardiaco fetale varia tra 110 e 170 battiti/min, con episodi fisiologici di bradicardia fino anche all'arresto, soprattutto nei primi mesi di gravidanza e di tachicardia sinusale legata soprattutto all'attività motoria fetale.

1. *Ritmo cardiaco irregolare.* - Le extrasistoli sono una evenienza frequente riscontrandosi fino al 10% dei f. normali; con l'ecocardiografia in *time-motion* è spesso difficile differenziare quelle sopraventricolari da quelle ventricolari, in quanto, data l'elevata frequenza cardiaca del f., l'onda a o i movimenti della parete atriale corrispondenti alla sua contrazione non sono sempre ben evidenziabili.

Tale differenziazione non è tuttavia importante in quanto ambedue questi disturbi del ritmo sono benigni, non richiedono trattamento farmacologico e si risolvono spontaneamente alla nascita o nel corso della vita intrauterina.

Soltanto se molto frequenti (oltre 10/min) possono precedere crisi di tachicardia parossistica. È perciò opportuno, in tali casi monitorizzare il f. con cadenza settimanale.

Il *flutter* con blocco variabile e la fibrillazione atriale possono essere causa di ritmo irregolare, ma sono rari nel f.

TAB. II. FATTORI DI RISCHIO PER CUI VIENE ESEGUITA L'ECOCARDIOGRAFIA FETALE

Rischio anamnestico

- storia di cardiopatia congenita
- diabete materno
- fenilchetonuria materna
- collagenopatia materna
- infezione in gravidanza
- assunzione di farmaci in gravidanza
- alcolismo materno
- tossicodipendenza

Rischio attuale

- idropo fetale
- aritmie fetali
- polidramnio
- oligodramnio
- malformazioni e/o anomalie cromosomiche fetali
- ritardi di crescita fetale

Quando sono presenti è importante un accurato esame della morfologia cardiaca in quanto malformazioni sono associate nel 10-25% dei casi.

2. *Bradicardie.* - Più frequentemente possono essere causate da extrasistoli atriali bloccate che, dal punto di vista clinico, hanno lo stesso significato delle extrasistoli atriali condotte: quando sono in sequenza bigemina danno un ritmo lento e costante.

Importante è la diagnosi differenziale con i blocchi atrioventricolari e con la bradicardia sinusale da ipossia fetale.

I blocchi atrioventricolari sono rari (1/20.000 nati). Spesso si riscontrano in casi di collagenopatia materna, anche clinicamente silente.

Difetti cardiaci associati sono stati riscontrati nel 20-50% dei casi. I più comuni sono il canale atrioventricolare e le sindromi da isomerismo, soprattutto sinistro, entrambi a elevata mortalità intrauterina (40%). Tuttavia, se non vi sono anomalie associate, e la frequenza cardiaca è superiore a 70 battiti/min, la prognosi è generalmente buona. La diagnosi si basa sul riscontro di una bradicardia costante, in genere tra 50 ed 80 battiti/min. L'ecocardiogramma fetale mostra una serie di contrazioni ritmiche ventricolari a bassa frequenza dissociate dalle contrazioni atriali, che mantengono una frequenza normale.

Essendo il blocco atrioventricolare congenito dovuto all'assenza di una o più porzioni del tessuto di conduzione (nodo atrioventricolare o fascio di His, o branche) non esistono terapie farmacologiche appropriate. Il f. va tenuto sotto controllo con ecocardiogrammi seriati per evidenziare eventuali segni di scompenso e per decidere quindi il momento migliore per il parto.

3. *Tachicardie.* - Si intende per tachicardia nel f. una frequenza cardiaca superiore ai 180 battiti/min. Accelerazioni graduali della frequenza cardiaca fino a 220 battiti/min possono essere secondarie a ipossia fetale, febbre materna, assunzione di farmaci betamimetici, etc.; si tratta, in questi casi, di tachicardia sinusale.

Quando, invece, il ritmo cardiaco fetale accelerato inizia e finisce improvvisamente, ed è tra i 200 e 320 battiti/min, si tratta, in genere, di tachicardie parossistiche sopraventricolari (TPSV). Nel 5-10% dei casi questo tipo di aritmia, la più comune nel f., è associata a malformazioni cardiache.

La diagnosi ecocardiografica si basa sul fatto che la frequenza delle contrazioni ventricolari è uguale a quella delle contrazioni atriali, con una sequenza di contrazione costante; ma, a differenza della tachicardia sinusale, la contrazione atriale può verificarsi in vari momenti della diastole ventricolare, mantenendo un rapporto costante con essa.

Il trattamento di questa forma si basa sulla presenza o meno di una tachicardia incessante o presente per più del 20% del giorno e sulla presenza di scompenso cardiaco.

La tab. III riporta lo schema di trattamento per la TPSV nel f.

Il farmaco più frequentemente somministrato per questo tipo di aritmia è la digitale, efficace da sola in circa la metà dei casi. Farmaci di seconda scelta, da usare da soli o associati alla digitale, sono i betabloccanti, che richiedono alti dosaggi materni, con conseguenti possibili effetti collaterali: il verapamil, che tuttavia, ha un assorbimento molto variabile in gravidanza e nei casi di scompenso cardiaco fetale può essere controindicato; infine, chinidina, procainamide e amiodarone sono molto efficaci, ma con maggiore tossicità fetale e materna. Il farmaco attualmente più usato di seconda scelta è la flecainide che ha dimostrato discreta efficacia nella cardioversione a ritmo sinusale con scarsi effetti collaterali materni e fetali.

TAB. III. SCHEMA DI TRATTAMENTO PER LA TACHICARDIA PAROSSISTICA SOPRAVENTRICOLARE (TPSV) NEL FETO

Situazione cardiaca	Situazione polmonare	Terapia suggerita
Scompenso congestizio intrauterino	Polmone maturo	Parto precoce e immediata cardioversione
Scompenso congestizio intrauterino	Polmone immaturo	Trattamento farmacologico transplacentare: parto quando il polmone è maturo
Non scompenso congestizio	Polmone maturo	Trattamento farmacologico transplacentare: stretta osservazione
Non scompenso congestizio	Polmone immaturo	Trattamento farmacologico transplacentare: stretta osservazione

Utilizzazione clinica della diagnosi prenatale di malformazioni cardiache

La ricaduta clinica della possibilità di diagnosticare in utero anomalie strutturali del cuore dipende dal tipo di cardiopatia che viene rilevata, dal momento in cui viene posta la diagnosi e dalla presenza o meno di altre malformazioni e/o cromosomopatie associate.

Se la diagnosi è posta precocemente (entro le 24 settimane) e la malformazione è incompatibile con la vita (*ectopia cordis*, ventricolo sinistro ipoplasico, ventricolo unico), ne discende quasi inevitabilmente la richiesta di interruzione della gravidanza. In caso l'età gestazionale sia più avanzata, la presenza della malformazione cardiaca indirizza l'ostetrico a evitare inutili interventismi (taglio cesareo). Fra le cardiopatie a prognosi infausta vanno anche considerate quelle in cui sia presente insufficienza valvolare e conseguente scompenso con idrope fetale.

Se la cardiopatia è compatibile con la vita, la diagnosi prenatale potrà attivare una particolare sorveglianza in epoca neonatale. In particolare, l'individuazione di malformazioni dottodipendenti (atresia della polmonare, atresia dell'arco aortico) prima della nascita permette di studiare il caso dal punto di vista emodinamico (e in questo senso l'ecoDoppler è particolarmente utile) prima che si verifichi l'acuzie, di decidere l'intervento più opportuno e, in funzione di questo, di programmare la sede ed il momento del parto.

Stante l'elevata frequenza di malformazioni extracardiache e/o di anomalie cromosomiche associate, è indispensabile uno studio approfondito della anatomia fetale ecografica e la valutazione del cariotipo fetale mediante amniocentesi, funicolocentesi o prelievo di villi coriali. La condotta successiva dipenderà dall'esito dell'esame: se negativo, vale quanto precedentemente detto; se positivo, l'anomalia cromosomica è determinante nelle decisioni terapeutiche.

Se la malformazione extracardiaca è incompatibile con la vita (anencefalia, agenesia renale), la presenza della malformazione cardiaca è irrilevante ai fini decisionali.

Se la malformazione extracardiaca è invece modesta (ad es., un piccolo onfalocelo) la corretta diagnosi di anomalia cardiaca diviene dirimente per la condotta ostetrica.

Va infine ricordato che il poter dare ragionevole sicurezza sulla normalità dell'apparato cardiocircolatorio fetale a una coppia che ha già avuto un figlio cardiopatico può ridurre le ansie e contribuire ad un più sereno proseguimento della gravidanza.

Bibliografia

- Allan L. D., Sharland G. K., Milburn A., Lockhart S. M. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 1452-1458.
 Azancot-Benisty A., Jacyz-Algrain E., Guergis N. M. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1992, **121**, 608-613.
 Bromley B., Estroff J. A., Sanders S. P. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992, **166**, 1473-1481.
 Chiappa E., Gaglioti P., Todros T., *Pediatr. Cardiol.*, 1995, **16**, 190-193.
 Copel J. A., Morotti R., Hobbins J. C. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1991, **78**, 1-8.
 Fesskova V., Bellotti M., Pirozzi I., Roccato M., *Dev. Physiopath. Clin.*, 1993, **4**, 11-23.
 Gembruch U., Chatterjee M. S., Bald R. *et al.*, *J. Perin. Med.*, 1991, **19**, 27-32.
 Gembruch U., Redel D. A., Bald R., Hansmann M., *Am. Heart J.*, 1993, **125**, 1290-1301.
 Rustico M. A., Benettoni A., D'Ottavio G. *et al.*, *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 1995, **6**, 313-319.
 Smythe J. F., Copel J. A., Kleinman C. S., *Am. J. Cardiol.*, 1992, **69**, 1471-1474.
 Tegnander E., Eiknes S. H., Johansen O. J. *et al.*, *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 1995, **5**, 372-380.
 Todros T., Gaglioti P., Presbitero P., *Giornale Accademia di Medicina di Torino*, 1991, **CLIV**, 242-610.

PATRIZIA PRESBITERO,

TULLIA TODROS E GUGLIELMO PASTENA

CHIRURGIA FETALE

[v. Agg. I, coll. *3203-3208]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2278). - **Uropatie ostruttive** (col. 2279). - **Ernia diaframmatica** (col. 2279). - **Malformazioni polmonari** (col. 2280). - **Teratoma sacrococcigeo** (col. 2281). - **Iidrocefalo** (col. 2283). - **Cardiopatie congenite** (col. 2283). - **Interventi in corso di fetoscopia** (col. 2283): *Sindrome da trasfusione intergemellare*.

Introduzione

Riproponiamo i presupposti fondamentali della chirurgia fetale (già citati nell'Agg. I, *3203-3204) che consentono di effettuare il trattamento prenatale delle malformazioni congenite:

- 1) la sicurezza diagnostica della malformazione;
- 2) la certezza che la malformazione sia così rapidamente evolutiva da compromettere irrimediabilmente, prima della nascita, la morfologia e la funzione di un organo o di un apparato, se non, addirittura, da provocare la morte del f.;
- 3) l'impossibilità di un parto pretermine che consenta di correggere alla nascita la malformazione, dato che, per il momento, il peggiore intervento chirurgico sul neonato è sempre preferibile al miglior trattamento operatorio sul f.;
- 4) l'assenza di altre malformazioni associate in grado di compromettere il risultato di qualsiasi tipo di trattamento della malformazione che si cerca di correggere in utero;
- 5) il superamento di ogni questione etica e medicolegale, soprattutto per quanto concerne gli eventuali, sempre possibili, rischi a carico della madre.

Allo stato attuale, la chirurgia fetale può essere realizzata a utero aperto o a utero chiuso.

Nel primo caso l'intervento viene effettuato direttamente sul f. dopo averlo estratto totalmente o parzialmente dalla cavità amniotica (fig. 12), mentre nel secondo caso l'operazione viene eseguita attraverso la parete addominale della madre con l'ausilio di cateteri che vengono introdotti — sotto guida ecografica — in questo o quell'organo del f..



Fig. 12. Estrazione di un feto dall'utero tempo di un intervento di chirurgia fetale. (Da Harrison et al., 1984).

allo scopo di ottenere la loro derivazione nella cavità amniotica (*shunts* fetoamniotici).

Sino ad oggi le indicazioni per il trattamento in utero sono costituite, con limitazioni di vario tipo e di diversa entità, dalle uropatie ostruttive, dall'ernia diaframmatica, dalle malformazioni polmonari, dal teratoma sacrococcigeo, dall'idrocefalo mentre sul piano sperimentale la ricerca ne sta valutando le indicazioni per altri apparati quale quello cardiovascolare e gastroenterico.

Uropatie ostruttive

Nessun sostanziale cambiamento è avvenuto in questi ultimi 5 anni in merito al trattamento in chirurgia fetale delle uropatie ostruttive. Ricordiamo che l'intervento può avvenire sia a *utero aperto* che a *utero chiuso*, quest'ultimo più semplice e meno rischioso. Viene effettuato introducendo un catetere, mediante puntura ecoguidata dell'addome materno, nella vescica del f. e drenandola nella cavità amniotica (*shunt* vescico-amniotico; cfr. a tal proposito la fig. 9 di col. *3205 dell'Agg. I). In alternativa il catetere può essere introdotto con l'ausilio della fetoscopia (v. sotto).

Nella tab. IV dell'Agg. I, col. *3205-3206, viene riprodotto uno schema da seguire per le gravi forme di idronefrosi bilaterali (ad es. da ostacolo uretrale), per le quali si voglia programmare un'eventuale derivazione in utero.

Ernia diaframmatica

Nonostante i progressi diagnostici e terapeutici realizzati in chirurgia toracica pediatrica, soprattutto quelli relativi alla terapia intensiva neonatale, che può contare su presidi quali il ventilatore ad alte frequenze e l'ECMO (membrane d'ossigenazione extracorporea), la sopravvivenza dell'ernia diaframmatica congenita (Bochdaleck) non supera il 40-50% anche nei migliori centri.

Se è vero che la prevenzione del barotrauma polmonare, sia prima che dopo l'intervento chirurgico, è in grado di ridurre significativamente l'ipertensione polmonare ed il conseguente ritorno alla circolazione fetale del neonato, come dimostrato da studi sperimentali (fig. 13) della nostra scuola (de Luca et al., 1987), resta il problema dell'ipoplasia grave del polmone con lacerazione del dotto diaframmatico

che nei casi più severi compromette sin dall'inizio una sufficiente ossigenazione. Proprio al fine di permettere il normale sviluppo del polmone compresso dai visceri erniati si è sviluppata l'idea di correggere in utero questa malformazione. Ma nonostante la razionalità della premessa fisiopatologica, l'intervento sul f. si è dimostrato gravato da numerosi problemi tecnici. In una serie riportata da Harrison di 14 f. operati per ernia diaframmatica sinistra in assenza di altre patologie associate, solo 4 sono sopravvissuti. Uno dei maggiori problemi riscontrati è stata la presenza del lobo sinistro del fegato in emitorace con conseguente severo disturbo della circolazione della vena ombelicale al momento della reintegrazione in addome. Ciò ha reso necessario l'utilizzo di un doppio approccio toraco-addominale e talvolta di una resezione epatica riduttiva. Altre tecniche alternative a questa chirurgia prenatale sono allo stato in esame.

Malformazioni polmonari

Nell'ambito della patologia polmonare congenita la diagnosi prenatale è oggi possibile in particolare per la malformazione adenomatoide cistica del polmone (MACP; v. POLMONE*, coll. *5979-5983) e per la sequestrazione polmonare. La forma macrocistica della MACP (cisti singole o multiple di diametro superiore a 5 mm) non è in genere associata a idrope fetale ed ha una prognosi favorevole con un trattamento neonatale. La forma microcistica invece è spesso associata a idrope fetale, forte sbandamento mediastinico, ipoplasia polmonare e prognosi cattiva sia pre- che post-natale. Così come la MACP anche la sequestrazione extralobare può essere complicata da idrope fetale. La diagnosi prenatale si può ottenere intorno alla XX settimana di gestazione con l'ecografia che dimostra l'esistenza di una massa polmonare omogenea ed eco-densa. Nel caso della sequestrazione polmonare l'eco-color-Doppler potrà inoltre dimostrare la vascularizzazione anomala proveniente dall'aorta. La diagnosi differenziale va posta con l'ernia diaframmatica, con le cisti broncogene e le duplicazioni enteriche, con il teratoma cistico del mediastino e con l'atresia o la stenosi bronchiale. Bisogna inoltre tener presente che sono stati riportati in letteratura non pochi casi di regres-

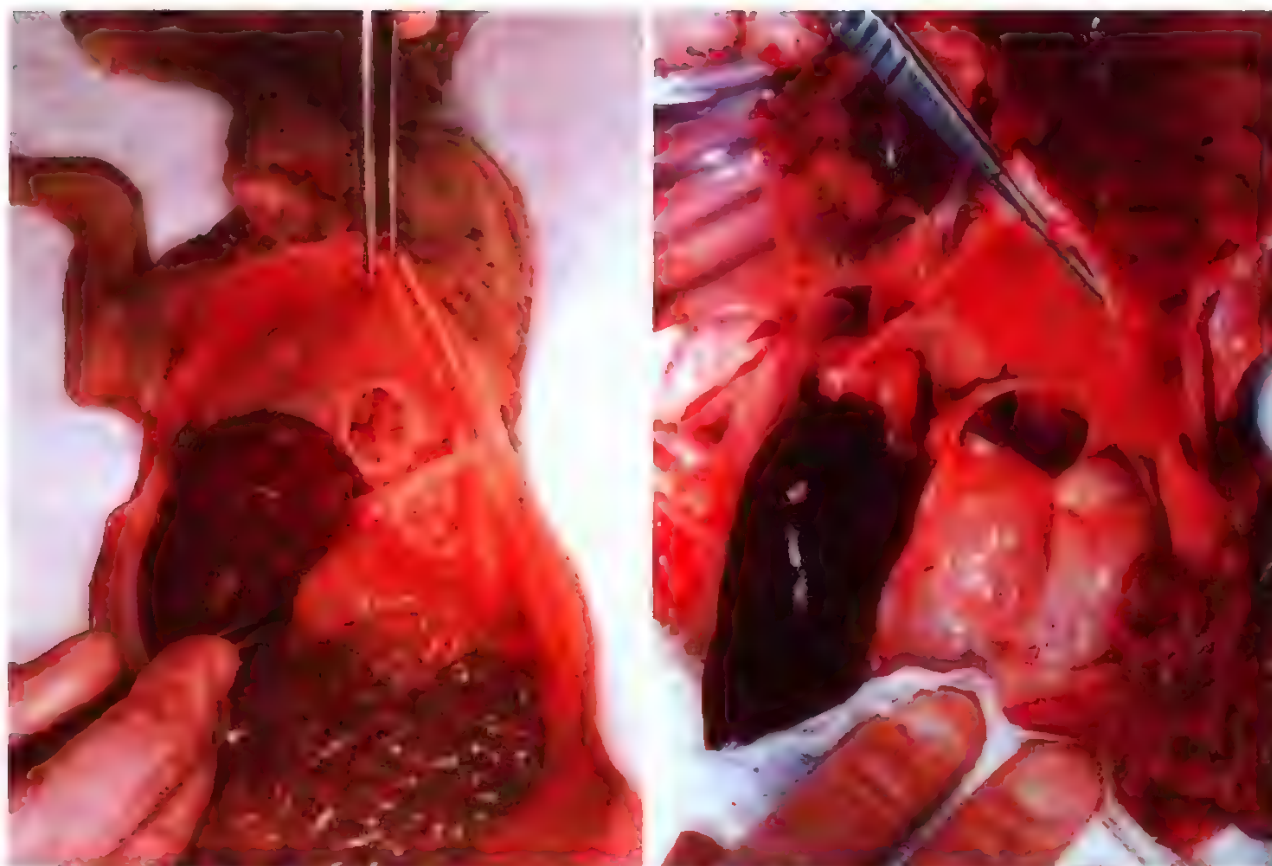


Fig. 13. Modello sperimentale di ernia diaframmatica sinistra ottenuta chirurgicamente in un feto di pecora. A sinistra visione di insieme; a destra particolare della porta erniaria con visceri che erano erniati in torace e che sono stati riportati in addome.

sione prenatale spontanea di alcune masse polmonari talvolta anche grandi (in nessuno caso associate ad idrope fetale). Perciò la storia naturale di queste malformazioni polmonari è dinamica e variabile.

Al fine quindi di seguire uno schema di comportamento in presenza di una massa polmonare diagnosticata in utero riportiamo l'algoritmo sviluppato da Adzick (1993; tab. IV).

I feti con MACP severa vengono selezionati per il trattamento prenatale in base soprattutto all'età gestazionale, alle dimensioni della massa, allo stato di salute della madre ed allo sviluppo di idrope fetale. Trattamenti palliativi come le toracentesi ripetute o il posizionamento di *shunt* toraco-aminiotici sono stati proposti ed eseguiti con scarsi risultati. La lobectomia fetale ad «utero aperto» è stata realizzata tra la XXI settimana e la XXVII settimana di gestazione in 6 casi dal gruppo di Harrison *et al.* con 4 sopravvivenze.

Teratoma sacrococcigeo

Il teratoma sacrococcigeo (TSC) è il tumore più comune del neonato (1 : 35.000 - 40.000 nati vivi) derivante dalla sequestrazione di gruppi cellulari totipotenti nel corso dello sviluppo degli organi derivati dai 3 foglietti germinativi originariamente fusi nella primitiva regione del blastoporo. La maggioranza dei neonati con TSC hanno una buona prognosi se operati nelle prime giornate di vita. Il rischio maggiore del TSC è il suo potenziale maligno (componenti di *Yolk-sac carcinoma*).

La diagnosi prenatale può essere ottenuta ecograficamente nel corso del II trimestre di gravidanza (13^a-18^a settimana). Importanti valutazioni ecografiche sono l'estensione pelvica o addominale del tumore, l'ostruzione intestinale o delle vie urinarie e l'integrità del canale spinale. La diagnosi differenziale va posta con altre formazioni pelviche o masse saccate tipo mielomeningocele, pseudocisti meconiali e uropatie ostruttive.

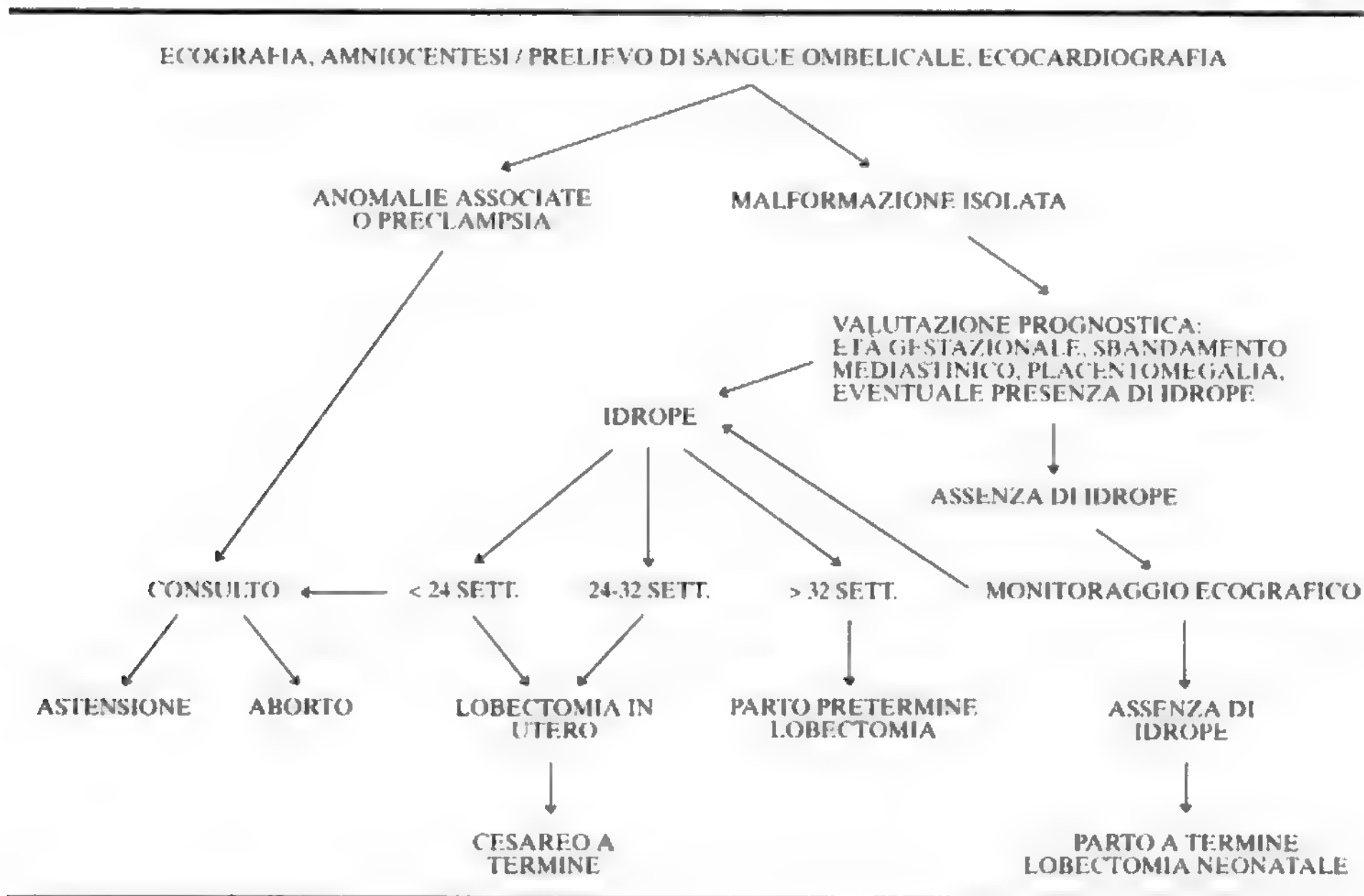
Dal punto di vista fisiopatologico è stato dimostrato che il TSC agisce come una fistola artero-venosa potendo quindi portare il feto ad uno scompenso cardiaco ad alta gittata. Tale scompenso, preceduto da idrope, porta a morte il feto e, in rapporto alla associazione con una placentomegalia, comporta delle serie conseguenze anche per la madre (pre-eclampsia).

Ad oggi sono stati riportati due casi di resezione in utero di TSC, ma in entrambi i casi con morte del piccolo paziente, in un caso per parto pretermine alla 26^a settimana (immaturità polmonare) e in un altro caso per morte in tabula del bambino, nato vivo alla 28^a settimana, durante il completamento dell'exeresi tumorale.

Tali esperienze hanno suggerito di fronte ad una diagnosi prenatale di TSC: di valutare con ecografie seriate la presenza di eventuali anomalie associate, le dimensioni della placenta, il tipo e l'estensione del TSC e l'eventuale esistenza di idrope fetale e con ecocardiodoppler la gittata cardiaca fetale. Se il tumore è piccolo ed asintomatico si può attendere il termine di gravidanza con parto preferibilmente per via vaginale. Se il tumore è grande e non vi è idrope o pla-

TAB. IV. ALGORITMO DI COMPORTAMENTO IN PRESENZA DI DIAGNOSI PRENATALE DI MALFORMAZIONE POLMONARE (MACCP)

(Da Adzick, 1993)



centomegalia il feto può essere partorito, appena raggiunta la maturità polmonare, con cesareo d'elezione. Se, al contrario, si sviluppano idrope fetale e placentomegalia, dopo che è stata raggiunta la maturità polmonare, si deve procedere al taglio cesareo d'urgenza ed alla immediata asportazione del tumore. Nel caso in cui si manifesti uno scompenso cardiaco ad alta gittata in un feto prima della 28ª settimana di gestazione si potrà procedere ad una resezione del tumore in utero data la possibilità della sua agevole asportazione.

Idrocefalo

Nessuna sostanziale novità è intervenuta sul trattamento in utero dell'idrocefalo, in quest'ultimi 5 anni. Si rimanda quindi al testo dell'Agg. I, col. *3204.

Cardiopatie congenite

Anche in questo campo non vi sono novità di rilievo che siano avvenute in questi ultimi 5 anni. Rimandiamo quindi per la descrizione di questi interventi al testo dell'Agg. I, coll. *3207-3208.

Interventi in corso di fetoscopia

La visione diretta del feto attraverso fetoscopi rigidi molto sottili (2 mm di diametro) è stata utilizzata più frequentemente in passato di quanto lo sia oggi. Ciò è dovuto alla grande accuratezza diagnostica ed operativa raggiunta dall'ecografia. Così oggi, ad es., il prelievo di sangue dal cordone ombelicale, che era una classica procedura fetoscopica, viene invece ecogiudato con molta precisione.

Altra applicazione della fetoscopia è costituita dalla creazione di fistole vescico-amniotiche, nel caso di uropatie ostruttive, impiantando uno *stent* di rete metallica che sembra funzionare meglio e più a lungo rispetto al classico catetere *pig-tail* fino ad oggi usato.

Sindrome da trasfusione intergemellare

Allo stato attuale si ricorre alla fetoscopia per effettuare la coagulazione con Nd:YAG laser, sotto controllo visivo, dei vasi placentari comunicanti nelle gravidanze di gemelli monozigoti, al fine di evitare il rischio (15% dei casi) di *sindrome da trasfusione intergemellare*. Come è noto la *sindrome da trasfusione* (Ville *et al.*, 1995) è costituita da un complesso di alterazioni provocate dallo squilibrio del flusso sanguigno tra i 2 gemelli in conseguenza di anastomosi tra i vasi placentari dei 2 f. che permettono il passaggio di sangue da un gemello (donatore) all'altro (ricevente); v. GRAVIDANZA** (coll. **2549-2550).

Le alterazioni consistono nel donatore in una condizione di ipovolemia ed ipossia e nel ricevente in un sovraccarico circolatorio con ipervolemia e poliuria responsabile di insufficienza cardiaca ad alta gittata e polidramnio con possibilità di aborto o di parto pretermine od addirittura della morte del f. che determina a sua volta ripercussioni emodinamiche ad esito letale sull'altro gemello.

In alternativa alla accennata coagulazione dei vasi placentari comunicanti è stato proposto il drenaggio dell'abnorme quantità del liquido mediante amniocentesi ripetute.

Bibliografia

- Adzick N. S., *Seminars in Pediatric Surgery*, 1993, 2, 103.
 Avni E. F. et al., *Chir. Pediatr.*, 1985, 26, 305.
 De Luca U., Cloutier R. et al., *J. Pediatr. Surg.*, 1987, 22, 311.
 Esposito G., *La chirurgia fetale: premesse sperimentali e prime applicazioni cliniche*, in Zannini G., *Chirurgie specialistiche. Orientamenti attuali*, vol. 1, 1986, USES, Firenze.
 Flake A. W., *Seminars in Pediatric Surgery*, 1993, 2, 113.
 Frigoletto F. D. J., Birnholz J. C., Greene M. F., *JAMA*, 1982, 248, 2496.
 Harrison M. R., Golbus M. S. et al., *J. Pediatr. Surg.*, 1982, 17, 728.
 Harrison M. R., Golbus M. S., Filly R. A., *JAMA*, 1981, 246, 774.
 Harrison M. R., Golbus M. S., Filly R. A., *The Unborn Patient. Prenatal diagnosis and Treatment*, 1984, Grune Stratton, Orlando, Florida.
 Pearson J. F., *Arch. Dis. Child*, 1983, 58, 324.
 Pringle K. C., Turner J. W., Schofield J. C., *J. Pediatr. Surg.*, 1984, 19, 131.
 Turley K., *Cardiochirurgia intrauterina*, in *Atti del I Congresso Mondiale Cardiochirurgia Pediatrica*, Bergamo, 1987.
 Verspieren P., *Chir. Pediatr.*, 1985, 26, 62.
 Ville Y. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 (1), 224.

GIOVANNI ESPOSITO, UGO DE LUCA E CIRO ESPOSITO

FIBRILLAZIONE E FLUTTER [v. vol. VI, coll. 1551-1563; Agg. I, *3215-3219]

SOMMARIO

FIBRILLAZIONE ATRIALE col. 2285

Introduzione (col. 2285). - **Influenza della FA sulla mortalità** (col. 2285). - **Influenza della FA sulla morbidità** (col. 2286): *Prevenzione dell'embolia*. - **Trattamento** (col. 2288): *Fibrillazione atriale parossistica (FAP)*. - *Fibrillazione atriale cronica*.

FLUTTER ATRIALE col. 2295

Trattamento (col. 2295): *Trattamento del flutter atriale di tipo I*. - *Trattamento del flutter atriale di tipo II*.

FIBRILLAZIONE VENTRICOLARE col. 2297

FIBRILLAZIONE ATRIALE**Introduzione**

La fibrillazione atriale (FA) è uno dei disturbi del ritmo più comuni con un'incidenza dello 0,4% nella popolazione adulta generale e con una tendenza all'incremento con l'avanzare dell'età. Tale aritmia si manifesta nel 2-4% dei soggetti che hanno più di 60 anni ed è presente nel 12% di coloro che hanno più di 75 anni. Essa compare spesso nell'ambito di molte cardiopatie, prime fra tutte le valvulopatie, le cardiomiopatie, l'ipertensione arteriosa, la cardiopatia ischemica acuta e cronica con quadri di diversa gravità in funzione della cardiopatia di base e delle alterazioni emodinamiche secondarie alla comparsa dell'aritmia (tab. I).

La FA si associa, anche in assenza di una cardiopatia, ad un aumento della mortalità e morbidità. In particolare è una delle patologie cardiache a maggior rischio di embolia sistemica con interessamento della circolazione cerebrale in oltre il 70% dei casi. L'ictus rappresenta infatti la più comune e drammatica manifestazione dell'embolia correlata alla FA.

La FA determina un deterioramento sia della funzione sistolica che diastolica del ventricolo sinistro che è tanto più grave quanto più questa risulta essere alterata in rapporto alla cardiopatia di base e che è legata alla perdita del contributo atriale al riempimento ventricolare e alla perdita del controllo della frequenza ventricolare.

Influenza della FA sulla mortalità

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che la FA si associa ad un aumento della mortalità sia globale che cardiovascolare. Nello studio di Framingham i pazienti con FA cronica avevano una mortalità doppia rispetto a quelli

TAB. I. PREVALENZA DELLA FIBRILLAZIONE ATRIALE (FA) NELLE PATOLOGIE PIÙ COMUNI

Patologia	Prevalenza (%)
Stenosi mitralica	42
Insufficienza mitralica	30-75
Miocardipatia restrittiva	43
Sick Sinus Syndrome	40
Pericardite costrittiva	31
Decorso post operatorio di bypass aorto-coronarico	30
Tireotossicosi	10-30
Infarto miocardico acuto	11-20
Sindrome di Wolff-Parkinson-White	11-20
Stenosi aortica	10
Iipertensione arteriosa	5-10
Difetto interatriale tipo ostium secundum	10
Cardiopatia ischemica cronica	< 2

senza aritmia. I fattori che si correlano a un aumento della mortalità nei pazienti con FA cronica sono l'età, la presenza di una cardiopatia valvolare o ischemica, l'ipertensione arteriosa e lo scompenso cardiaco congestizio.

Influenza della FA sulla morbidità

Nello studio di Framingham la presenza di FA aumentava l'incidenza di ictus di 5 volte nei pazienti senza cardiopatia reumatica e di ben 17 volte in quelli con cardiopatia reumatica associata. Anche in caso di FA isolata (il 52% dei pazienti era di età superiore ai 70 anni fra i quali erano inclusi soggetti con ipertensione arteriosa e diabete mellito), la comparsa di ictus risultava essere di 4 volte superiore a quella di soggetti che non presentavano l'aritmia. In circa il 25% dei casi l'ictus si manifestava nel momento dell'insorgenza della FA. La FA rappresenta, pertanto, un fattore indipendente per la comparsa di ictus. Numerosi recenti studi hanno confermato questo dato (tab. II).

Per quanto riguarda la FA idiopatica cioè quella in cui non si evidenzia una cardiopatia organica il rischio di ictus è del 0,5% all'anno. Dall'analisi dei più recenti studi sono emersi una serie di fattori clinici che consentono una stratificazione del rischio embolico individuando un rischio elevato con una incidenza di ictus maggiore del 6% all'anno e un rischio basso con una incidenza inferiore al 3%. Tali fattori sono riportati nella tab. III. Restano una serie di condizioni per le quali i dati della letteratura non sono univoci e che pertanto sono state catalogate come rischio incerto.

TAB. II. FIBRILLAZIONE ATRIALE (FA) NON VALVOLARE E INCIDENZA DI ICTUS NEI PAZIENTI TRATTATI CON PLACEBO

(risultati cumulativi negli studi AFASAK, SPAK, BAATAF, CAFA, ESPINAF)

Evento cerebrovascolare	Incidenza (%/anno)
Ictus invalidanti	2,5
Tutti gli eventi ischemici	5
Ictus + TIA	7

FIBRILLAZIONE E FLUTTER

TAB. III. STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO DI ICTUS NELLA FIBRILLAZIONE ATRIALE (FA)

Rischio elevato (> 6% per anno)

- Stenosi mitralica
- Scompenso cardiaco congestizio
- Pregresso ictus
- Protesi valvolare mitralica

Rischio basso (< 3% per anno)

- FA idiopatica con età < 60 anni
- FA parossistica con età < 60 anni

Rischio incerto

- FA di recente insorgenza vs. FA cronica
- FA intermittente vs. FA stabile con età < 60 anni
- Precedente ictus "silente" o asintomatico, riscontrato alla tomografia computerizzata
- Lesioni arteriosclerotiche delle carotidi
- Cardiopatologia di base
- Reperti ecocardiografici:
 - rigurgito mitralico
 - dimensioni dell'atrio sinistro
 - funzione ventricolare
 - andamenti di flusso nell'atrio sinistro
 - trombosi dell'atrio sinistro (con l'ecocardiografia transesofagea)

Prevenzione dell'embolia.

La necessità di stabilire se un trattamento antitrombotico sia in grado di prevenire la comparsa di eventi embolici ha condotto all'effettuazione di numerosi studi prospettici, randomizzati, controllati su ampie casistiche (tab. IV). Una significativa riduzione degli eventi embolici cerebrali si è verificata nel gruppo trattato con warfarin negli studi AFASAK, SPAF (1991), SPINAF (1992) e BAATAF (1990). L'aspirina ha ridotto significativamente il rischio di ictus nello studio SPAF con una tendenza positiva nello studio AFASAK. Alla luce di questi risultati, in assenza di controindicazioni alla terapia anticoagulante con dicumarolici (tab. V), tutti i pazienti con FA cronica dovrebbero essere sottoposti a terapia con dicumarolici. La stessa cosa è va-

TAB. V. CONTROINDICAZIONI ALLA TERAPIA ANTICOAGULANTE CON DICUMAROLICI

- Mancanza di collaborazione del paziente
- Impossibilità ad eseguire i controlli di laboratorio
- Occupazione ad alto rischio traumatico
- Iperensione maligna
- Endocardite infettiva
- Dissezione aortica
- Versamento pericardico emorragico
- Difetti emocoagulativi congeniti o acquisiti
- Epatopatia con grave insufficienza epatica
- Esofagite peptica
- Ulcera peptica sanguinante o attiva
- Rettocolite ulcerosa
- Sindrome da malassorbimento o altre carenze di vitamine K
- Retinopatia grave
- Recente episodio di emorragia cerebrale
- Recente intervento chirurgico al midollo spinale, all'encefalo o all'occhio
- Insufficienza renale (creatininemia > 5 mg/dl)
- Gravidanza (primo trimestre)

lida anche nei casi con episodi parossistici frequenti di FA in presenza di cardiopatia.

I pazienti di età superiore ai 75 anni e quelli con cardiopatia (insufficienza cardiaca o cardiopatia ischemica e ipertensiva) o che hanno accusato un pregresso evento embolico, presentano il più alto rischio di eventi tromboembolici e quindi sono quelli che più si giovano di un trattamento con dicumarolici a basso dosaggio. Al contrario, pazienti giovani con FA idiopatica presentano un basso rischio di eventi embolici. In questi casi è suggerita una terapia antiaggregante con aspirina o indobufene.

Il trattamento antiaggregante deve comunque essere effettuato in tutti i casi in cui la terapia anticoagulante non può essere effettuata per la presenza di controindicazioni. La tab. VI indica il trattamento anti tromboembolico, anticoagulante o antiaggregante, consigliato nel paziente con FA in funzione della cardiopatia.

Trattamento

Nel trattamento farmacologico della FA l'iter decisionale deve tener conto di molti aspetti, primi fra tutti quelli ezi-

TAB. IV. EVENTI EMBOLICI: RISULTATI DEGLI STUDI PUBBLICATI SULLA FIBRILLAZIONE ATRIALE

Studio	Eventi osservati (n.)		Riduzione del rischio	
	Placebo	Warfarin	Warfarin	Aspirina
AFASAK	22	9		
SPAF	18	6		
BAATAF	13	2		
CAFA	11	6		
SPINAF	19	4		
	Placebo	Aspirina		
AFASAK	22	19		
SPAF	46	26		

TAB. VI. SCELTA DEL TIPO DI PROFILASSI ANTITROMBOEMBOLICA NELLE FIBRILLAZIONI ATRIALI (FA) IN FUNZIONE DEL QUADRO CLINICO

	Anticoagulante	Antiaggregante
Cardioversione elettrica di FA	+	
FA reumatica	+	—
FA con scompenso cardiaco	+	—
FA non reumatica		
— con fattori di rischio tromboembolico*	+	—
— senza fattori di rischio tromboembolico*	—	+
FA idiopatica (età < 60 anni)		+
FA parossistica		
— con fattori di rischio tromboembolico*	+	
— senza fattori di rischio tromboembolico*	—	+
FA con particolare rischio emorragico	—	+
FA con pregressa embolia	+	—

* = pregressa embolia, insufficienza cardiaca, età > 75 anni, ipertensione arteriosa, dilatazione dell'atrio sinistro

logici e patogenetici dato che la terapia e la prevenzione degli episodi non possono precedere la correzione delle condizioni scatenanti l'aritmia. Sulla base di queste considerazioni, l'atteggiamento clinico è oggi, rispetto al passato, assai più deciso nel tentare il ripristino del ritmo sinusale e meno disposto ad accettare l'ineluttabilità della FA cronica, anche se essa è presente da oltre 6 mesi, soprattutto quando si tratti di episodi isolati. La tab. VII riporta uno schema semplificato dell'approccio terapeutico in un paziente con FA.

Fibrillazione atriale parossistica (FAP)

1. *Trattamento farmacologico* (tab. VIII). — La *digitale* è sempre stata impiegata per rallentare la frequenza ventricolare, non esistendo basi che ne giustificano una efficacia diretta nell'interruzione dell'aritmia. Esistono tuttavia segnalazioni che ciò si verifichi a seguito della riduzione della pressione intraatriale conseguente alla riduzione della pressione diastolica ventricolare ed all'effetto inotropo positivo del farmaco.

Fino all'inizio dello scorso decennio, la *chinidina* associata a *digitale* e successivamente a betabloccanti, ha rappresentato il principale farmaco per la cardioversione farmacologica della FAP, con percentuali di successo variabili dal 30 al 90% a causa della diversa composizione delle casistiche. Tuttavia l'impiego di questo farmaco presenta limitazioni legate alla mancanza di una formulazione e.v., alla necessità che la risposta ventricolare alla FA sia inferiore ai 100 b/min e ai pesanti e frequenti effetti collaterali.

I farmaci *antiaritmici* (v. ANTIARITMICI FARMACI**) della classe IC, in particolare la *flecainide* e il *propafenone*, somministrabili per via endovenosa e più potenti di quelli della classe IA, sono stati largamente studiati negli ultimi anni con ottimi risultati. La *flecainide* è in grado di ripristinare il ritmo sinusale in una percentuale variabile, a seconda delle diverse casistiche, dal 65 al 90% dei casi con una incidenza di effetti collaterali assai minore rispetto alla *chinidina*. L'efficacia del *propafenone* e.v. è risultata complessivamente sovrapponibile a quella della *flecainide*.

La differenza tra *flecainide* e *propafenone* in termini di effetto sul sistema nervoso autonomo (maggiore quello va-

golitico della prima e quello antiadrenergico del secondo) possono favorire la scelta dell'uno o dell'altro a seconda della presentazione clinica del caso. In particolare, il *propafenone* è più indicato in presenza di una frequenza ventricolare elevata quando si voglia evitare il pretrattamento con *digitale*.

L'elevatissima efficacia di questi farmaci ne ha giustificato la diffusione facendoli diventare farmaci di prima scelta non solo per il trattamento della FAP idiopatica ma anche nei pazienti affetti da cardiopatia ischemica o ipertensiva senza scompenso, da cardiomiopatia ipertrofica, da sindrome di Wolf-Parkinson-White. Sono controindicati in presenza di insufficienza cardiaca moderata o severa e se vi sono disturbi di conduzione.

L'*amiodarone* (v.*; v.***) somministrato e.v., sia da solo che in associazione con la *chinidina* o *digitale* è efficace quanto i farmaci della classe IC, con una percentuale di successo in monoterapia superiore al 90%. È di prima scelta nei pazienti con insufficienza cardiaca grazie al suo scarso effetto sull'inotropismo e all'azione vasodilatatrice periferica e coronarica.

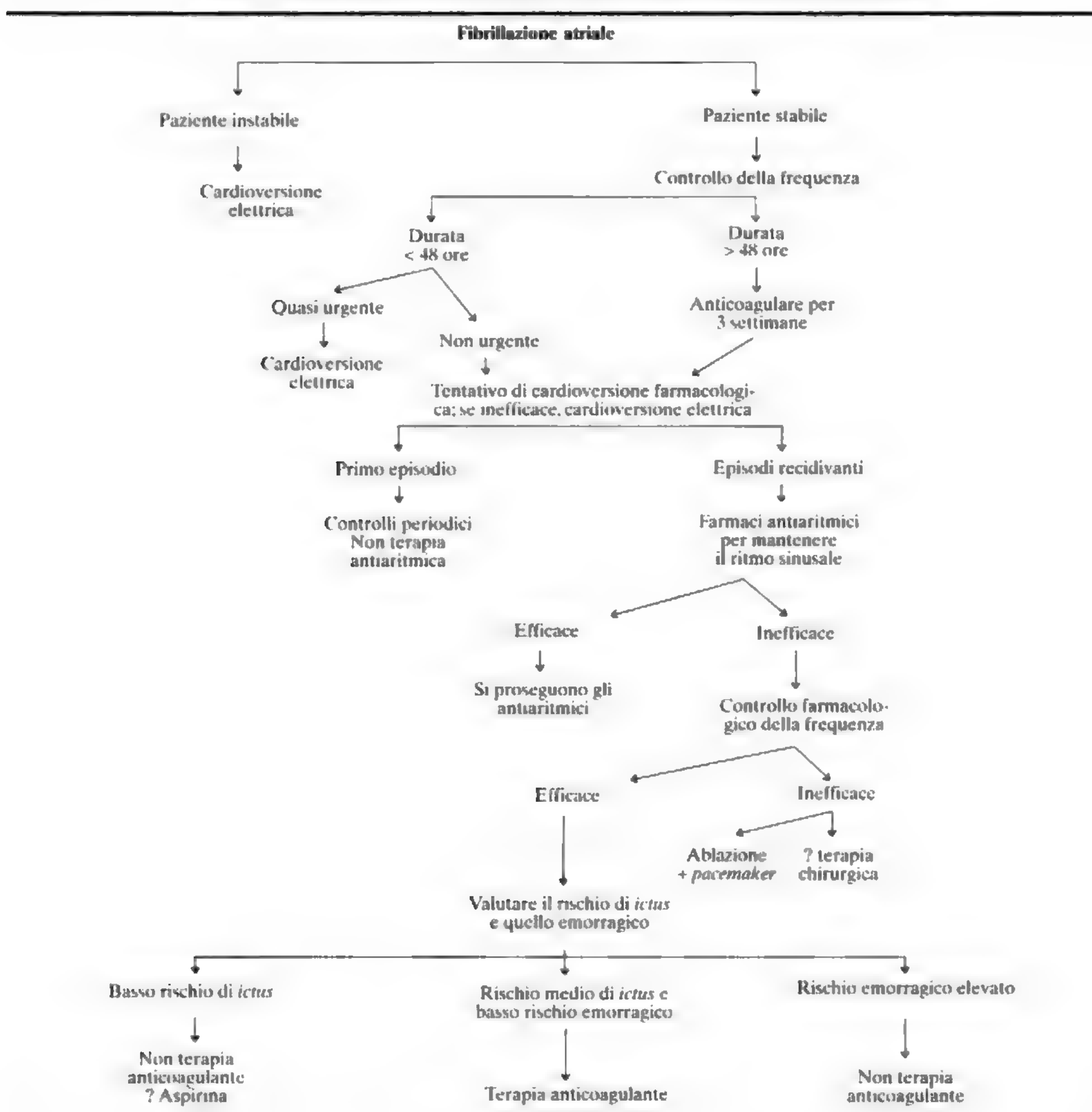
Anche il *sotalolo* (v.**), betabloccante con proprietà simili all'*amiodarone*, si è rivelato molto efficace nel trattamento della FAP soprattutto in presenza di una forte componente adrenergica.

Gli elementi essenziali della terapia farmacologica sono riassunti nella tab. VIII.

2. *Cardioversione elettrica esterna (CVE)*. — Le indicazioni alla CVE si sono andate ampliando negli ultimi anni data la relativa sicurezza ed efficacia del trattamento. Si può affermare che attualmente, dopo il fallimento o la non attuabilità della terapia farmacologica, non esistono controindicazioni alla CVE, se non nei casi rari di ipertensione incontrollata o di alterazioni intrattabili della coagulazione che rendono impossibile adottare la profilassi antiembolica. Il paziente, prima della CVE, deve essere adeguatamente trattato con un farmaco antiaritmico e deve essere protetto nei confronti dell'embolizzazione mediante terapia preventiva anticoagulante.

L'anticoagulazione con dicumarolici deve precedere la CVE di almeno 3 settimane e deve essere proseguita per il

TAB. VII. ALGORITMO TERAPEUTICO NELLA FIBRILLAZIONE ATRIALE (FA)



primo mese. È infatti dimostrato che la ripresa dell'attività meccanica degli atri può seguire anche di giorni il ripristino di una normale attività elettrica.

3. *Profilassi delle recidive.* – L'impiego della digitale nella profilassi delle recidive di FA non ha fondamento elettrofisiologico, ma risulta talora efficace in conseguenza dell'effetto bradicardizzante ed inotropo positivo. La chinidina è stata per molti anni il farmaco più comunemente utilizzato, nonostante i problemi di posologia e tollerabilità. In una recente metanalisi relativa a 6 studi intesi a valutare l'efficacia della profilassi con chinidina dopo cardioversione elettrica di FA è emerso che il farmaco è sicuramente efficace nel prevenire le recidive di FA (50% in ritmo sinusale dopo 12 mesi contro 25% nel gruppo placebo) ma, nei pa-

zienti trattati, si è osservato un incremento della mortalità totale (2,9% vs. 0,8%), con morte improvvisa nel 25% dei casi; si consiglia pertanto l'uso di tale farmaco solo in casi selezionati refrattari ad altro trattamento profilattico antiaritmico.

Tra gli altri farmaci della classe IA, la disopiramide è ancora di grande attualità grazie anche alla formulazione a rilascio ritardato.

L'amiodarone, antiaritmico di classe III, è sicuramente il farmaco più efficace ma il suo uso è limitato dalla presenza di molteplici effetti collaterali soprattutto extracardiaci e, in particolare, tiroidei. Va tuttavia sottolineato come le dosi sufficienti per la profilassi delle recidive di FA siano spesso basse (200 mg a giorni alterni).

TAB. VIII. FARMACI UTILIZZATI PER VIA ORALE NEL TRATTAMENTO DELLA FIBRILLAZIONE ATRIALE

Farmaco	Dose iniziale	Dose di mantenimento
<i>Per il controllo della frequenza ventricolare:</i>		
Digossina	1 mg nelle 12-24 h	0.125-0.5 mg ogni 24 h
Propranonolo	10-40 mg	10-80 mg ogni 6 h
Nadololo	40 mg	40-320 mg ogni 24 h
Metoprololo	25-50 mg	50-200 mg ogni 12 h
Atenololo	100 mg	50-100 mg ogni 24 h
Verapamil	80 mg	40-120 mg ogni 8 h
Diltiazem	60 mg	30-120 mg ogni 8 h
Digossina + β -bloccanti	La dose è quella dei farmaci da soli	
Digossina + diltiazem		
Digossina + verapamil		
<i>Ripristino del ritmo sinusale:</i>		
Chinidina solfato	400 mg	200-600 mg ogni 6 h
Chinidina gluconato	324 mg	324-972 mg ogni 8 h
Disopiramide	200 mg	150-300 mg ogni 12 h
Flecainide	100 mg	50-200 mg ogni 12 h
Propafenone	300 mg	150-300 mg ogni 8 h
Sotalolo	160 mg	80-320 mg ogni 8 h
Amiodarone	1200 mg/die per 1 settimana	200 mg ogni 24 h
<i>Mantenimento del ritmo anusale</i>		
Come per il ripristino del ritmo		

Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che gli antiaritmici della classe IC, in particolare il propafenone e la flecainide, sono notevolmente efficaci nella prevenzione delle recidive di FA. Per il propafenone sono state riportate percentuali di successo a lungo termine comprese fra 53 e 77%, per la flecainide fra 49 e 86%, in relazione alla numerosità delle casistiche, alla patologia coesistente ed alla dose. Ambedue i farmaci sono assai ben tollerati sul piano generale e cardiaco e scarsi sono gli effetti collaterali.

Un crescente interesse è stato rivolto negli ultimi anni al sotalolo anche per la prevenzione delle recidive di FA sia come farmaco di prima scelta che come farmaco efficace dopo che altri antiaritmici hanno fallito. In due recenti lavori, su ampie casistiche di pazienti con FA resistente ad almeno un altro farmaco, il sotalolo somministrato a dosi comprese tra 160 e 960 mg/die è risultato efficace nel 50% dei casi.

4. *Elettrostimolazione definitiva.* - La FA si verifica in circa il 40% dei pazienti con *Sick Sinus Syndrome* (v. MALATTIA ARITMICA ATRIALE) medio-avanzata, nei quali sono spesso controindicati i farmaci antiaritmici per la loro azione cronotropa, dromotropa e inotropa negativa. L'elettrostimolazione fisiologica, atriale o bicamerale si è rivelata di per sé un ottimo strumento di prevenzione della FA, soprattutto quando questa è determinata da marcata bradicardia sinusale con conseguente dispersione dei potenziali atriali.

Fibrillazione atriale cronica

1. *Terapia farmacologica.* - La digitale è stata da sempre il farmaco di prima scelta per il controllo della risposta ventricolare all'aritmia atriale, ma risulta inefficace durante l'attività fisica a seguito dell'aumento del tono simpatico indotto dallo sforzo. L'associazione con betabloccanti e calcioantagonisti (verapamil o diltiazem) consente di control-

lare la frequenza non solo a riposo ma anche durante esercizio fisico.

2. *Ablazione transcatetere.* - Le tecniche di ablazione o di modulazione transcatetere della conduzione A-V mediante *DC shock*, o più recentemente con energia a radiofrequenza (v. ARITMIE**; v. anche CATETERI VASCOLARI E CARDIACI**) hanno assunto un ruolo dominante nel controllo della frequenza ventricolare nella FA cronica resistente alla terapia farmacologica o quando quest'ultima non può essere effettuata per l'esistenza di controindicazioni.

L'ablazione completa del sistema di conduzione a livello del nodo A-V e la creazione di un blocco A-V totale, con successivo impianto di un segnapassi (*pacemaker*) con risposta in frequenza (v. SEGNA-PASSI*, coll. * 6541-6545), migliora in modo significativo sia la qualità di vita che la tolleranza allo sforzo dei pazienti con FA cronica ad alta risposta ventricolare.

Attualmente la ricerca è volta a modulare la conduzione del nodo A-V al fine di aumentare il potere di filtro della struttura senza dover ricorrere al successivo impianto di un segnapassi.

3. *Terapia chirurgica.* - In casi selezionati con quadro clinico particolarmente grave nei quali sia previsto un intervento operatorio sono state messe a punto due tecniche chirurgiche volte a isolare la FA e a ripristinare il ritmo sinusale. Un intervento prevede la creazione anatomica di un corridoio di tessuto atriale tra il nodo del seno e il nodo A-V. In questo caso gli atri sono elettricamente isolati e continuano a fibrillare, mentre la depolarizzazione del nodo del seno percorre il corridoio chirurgicamente isolato dal restante atrio fino ad imboccare il nodo A-V e successivamente depolarizzare i ventricoli (fig. 1).

Il secondo intervento viene effettuato mediante incisioni multiple dell'atrio allo scopo di creare un labirinto con vicoli ciechi che interrompono i vari circuiti di rientro intra-

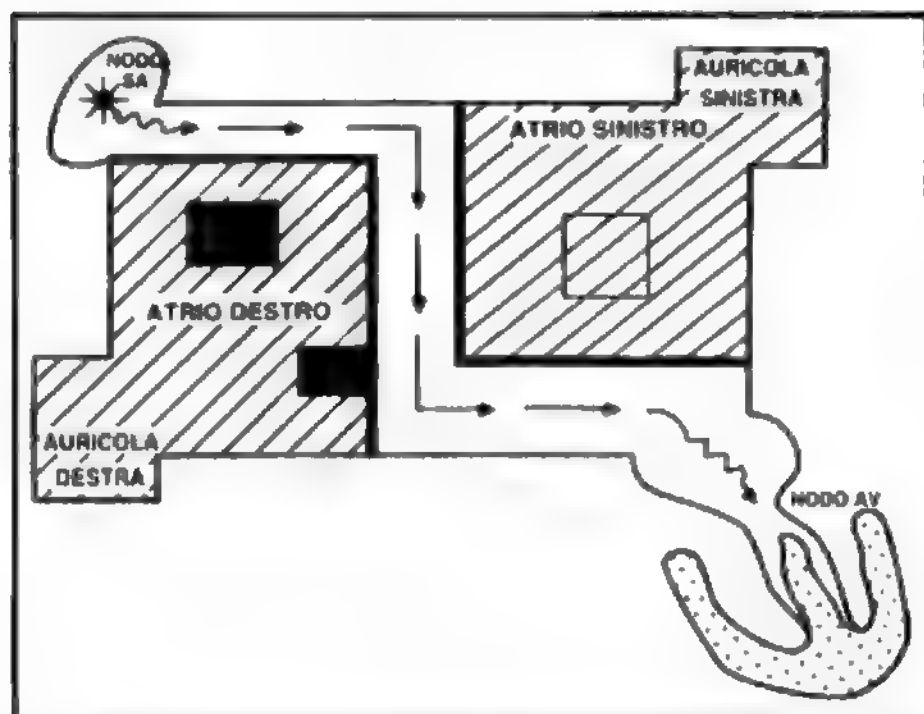


Fig. 1. Rappresentazione schematica dell'intervento "del corridoio".

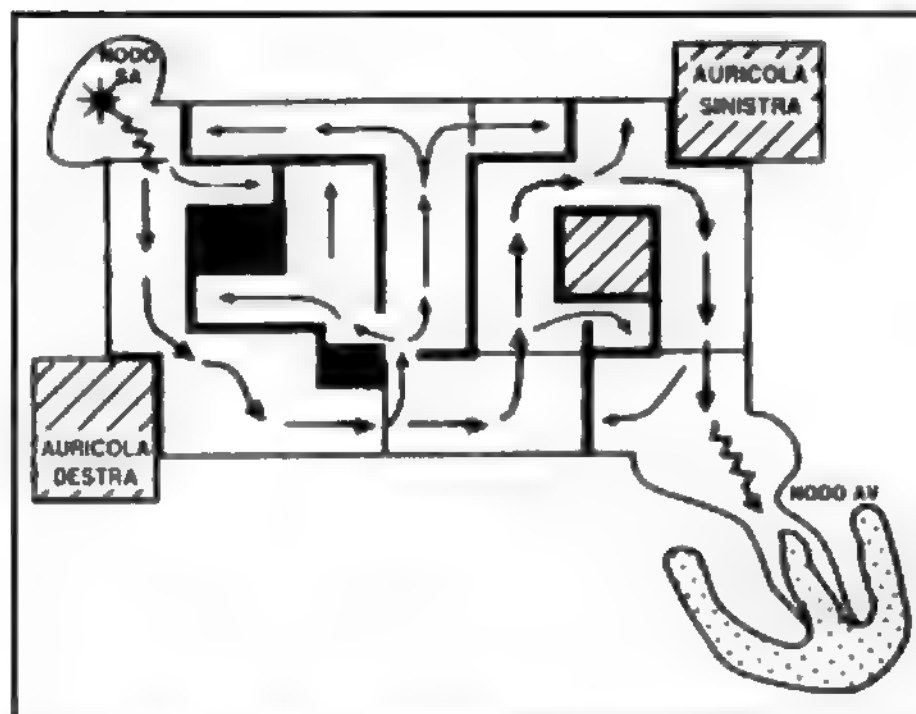


Fig. 2. Rappresentazione schematica dell'intervento "del labirinto".

atriali, ma permettono la conduzione tra il nodo del seno e quello A-V (fig. 2).

FLUTTER ATRIALE

Il flutter atriale (FLA) è un'aritmia di cui si descrivono varie forme (tab. IX) con differenti aspetti elettrocardiografici legati alla frequenza di depolarizzazione del tessuto atriale e alla più o meno costante sincronizzazione della depolarizzazione che può presentare diversi fronti di avanzamento.

Trattamento

Trattamento di flutter atriale di tipo I

Questa forma, caratterizzata da aritmia con attività elettrica sincronizzata, presenta un basso rischio tromboembo-

lico e, di conseguenza, non necessita in genere di trattamento anticoagulante purché il FLA non si alterni a episodi di FA.

Scopo della terapia è il ripristino del ritmo sinusale o il rallentamento della frequenza ventricolare quando questa è troppo elevata o emodinamicamente mal tollerata (esempio FLA con conduzione 2:1).

La strategia terapeutica volta a raggiungere questi obiettivi può utilizzare la stimolazione elettrica transesofagea, la terapia farmacologica o il D.C. shock sincronizzato.

La tecnica di prima scelta è rappresentata dalla *stimolazione elettrica transesofagea*, che si effettua mediante erogazione per 30 sec di una sequenza di 300-800 impulsi/min, che consente nel 65% dei casi il ripristino del ritmo sinusale

TAB. IX. QUADRI DIVERSI DEL FLUTTER ATRIALE

Classificazione di Puech (morfologica)	
<i>Flutter atriale comune</i>	— onde F a denti di sega con prevalente negatività in D2, D3, aVF — assenza di linea isoelettrica fra le F — frequenza atriale compresa tra 250 e 340/min
<i>Flutter atriale non comune</i>	— onde F con prevalente positività in D2, D3, aVF — presenza di linea isoelettrica tra le F — frequenza atriale compresa tra 250 e 340/min
<i>Flutter atriale impuro</i>	— fibrillo-flutter o tachisistolia — variabilità della morfologia delle onde F — frequenza atriale > 340/min
Classificazione di Waldo (in base all'efficacia della SATE)	
<i>Flutter atriale tipo I</i>	— assimilabile ai tipi comune e non comune di Puech — frequenza atriale < 340/min — elevata possibilità di interruzione con SATE
<i>Flutter atriale tipo II</i>	— assimilabile al flutter atriale impuro di Puech — frequenza atriale > 340/min — altamente improbabile l'interruzione con SATE

SATE = Stimolazione Atriale Transesofagea

a volte preceduto da una breve fase di FA; nel 25% dei casi il FLA si desincronizza in una FA stabile. In questo caso la somministrazione di propafenone o amiodarone consente la cardioversione dell'aritmia nel 90% dei pazienti.

Nei casi in cui la stimolazione transesofagea risultasse inefficace (10%) o qualora non fosse disponibile la idonea apparecchiatura, il farmaco di prima scelta per il trattamento del FLA è l'amiodarone e.v. che consente il ripristino del ritmo sinusale nel 75% dei casi entro le prime 24 ore. In alternativa, la riduzione della frequenza ventricolare può essere ottenuta con la digitale e.v., o, se non coesiste insufficienza cardiaca, con verapamil e.v. o diltiazem e.v.

In caso di persistenza dell'aritmia nonostante la stimolazione transesofagea e/o la terapia farmacologica si effettua la cardioversione elettrica esterna mediante D.C. shock sincronizzato con energie variabili da 80 a 120 Joules (v. ELET-STIMOLAZIONE CARDIACA TRANSESOFAGEA**).

Nel FLA di tipo I sono controindicati i farmaci della classe IC in quanto, rallentando il ciclo dell'aritmia, essi possono determinare una conduzione lungo il nodo A-V 1:1 con incremento della frequenza ventricolare e rischio di peggioramento emodinamico.

Trattamento di flutter atriale di tipo II

Questa aritmia, caratterizzata da attività elettrica parzialmente desincronizzata, comporta un rischio tromboembolico che, come nella FA, deve essere attentamente valutato prima di procedere alla cardioversione. Il trattamento farmacologico in questi casi è simile a quello della FA.

FIBRILLAZIONE VENTRICOLARE

Per la trattazione della fibrillazione ventricolare, si rinvia alle voci FIBRILLAZIONE E FLUTTER (VI, 1561-1563); CARDIOTERAPIA INTENSIVA (III, 1042-1046); CARDIOTERAPIA INTENSIVA (Agg. I, *1326-1327); SEGNAPASSI (Agg. I, *6560-6590).

Bibliografia

- BAATAF, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **325**, 1505-1511.
 Braunwald E. ed., *Heart Disease*, 1997, Saunders, Philadelphia.
 Cairns J. A. et al., *Circulation*, 1991, **84**, 469-481.
 Chesebro J. H., Fuster V., Halperin J. L., *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 1556-1558.
 Connolly S. J. et al., CAFA (Canadian Atrial Fibrillation Study). *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991, **18**, 3349-3355.
 Cox J. L. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1991, **101**, 569-583.
 Cox J. L. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1991, **101**, 584-594.
 DBT (*Drug and Therapeutics Bulletin*), 1996, **5(6)**, 41-45.
 Halperin J. L. et al., *Stroke*, 1988, **19**, 937-941.

- Leitch J. W. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991, **17**, 970-975.
 Lotto A. et al., *Cardiologia*, 1991, **36**, 47-54.
 McMurray J. et al., *Brit. Med. J.*, 1994, **309**, 1631-1635.
 Petersen P. et al., *Lancet*, 1989, **1**, 175-179.
 Petersen P. et al., *Stroke*, 1990, **21**, 4-13.
 Pritchett E. L. C. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 1264-1269.
 Singer D. E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1451-1453.
 SPAF (Stroke Prevention Atrial Fibrillation study), *Circulation*, 1991, **84**, 527-539.
 SPINAF, Ezekowitz M. D. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1406-1412.
 Wolf P. A. et al., *Stroke*, 1983, **14**, 665-667.

RUGGERO MANFREDINI

FIBRILLINA

F. fibrilline. - L. fibrillin. - T. fibrilline. - S. fibrillina.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2298). - Genetica (col. 2299). - Fibrillina e sindrome di Marfan (col. 2299).

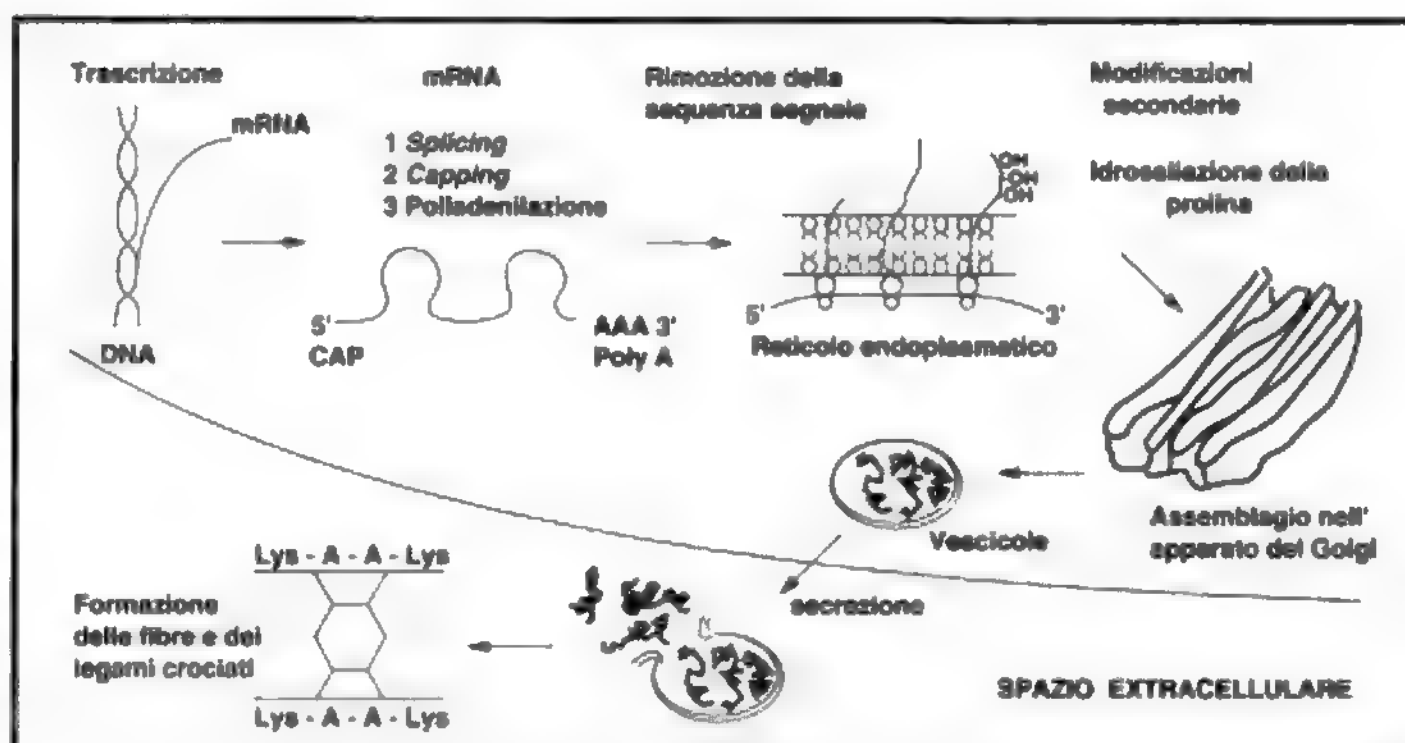
Introduzione

Le proprietà elastiche dei tessuti umani (ad es. arterie, cute, legamenti) sono in gran parte legate alla presenza di fibre elastiche a livello della matrice proteica extracellulare, fibre che arrivano a comporre oltre il 50% del peso a secco del tessuto (ad es. arterie). Le fibre elastiche sono costituite da una componente amorfa ed una microfibrillare.

La componente amorfa, così definita in quanto non presenta una struttura ripetitiva, è costituita dall'elastina. L'elastina (v.; v.º) compone circa il 90% delle fibre mature ed è la principale responsabile delle proprietà elastiche del tessuto (Rosenbloom, 1987). La durata in termini temporali dell'elastina è enorme, per cui le singole fibre, una volta sintetizzate, possono permanere per tutta la vita, anche in tessuti come quelli dell'arco aortico soggetti a miliardi di cicli di contrazione/rilassamento (fig. 1).

La componente microfibrillare è invece costituita da fibrille con un diametro di circa 10-12 nm, localizzate principalmente alla periferia della componente amorfa (elastina) ed in parte inframezzate ad essa (Gibson et al., 1991). Le microfibrille sono sempre associate alle fibre elastiche e sembrano precederle nella organizzazione ed assemblaggio del tessuto elastico in formazione (Cleary e Gibson, 1983). Gli studi immunostochimici ed immunoelettromicroscopici hanno permesso di identificare alcune componenti proteiche delle microfibrille elastiche bovine. Sono quindi state

Fig. 1. Rappresentazione schematica delle fasi di sintesi dell'elastina intra- ed extracellulare (componente amorfa). Le molecole di tropoelastina vengono secrete dalla cellula all'interno di vescicole e successivamente, per interventi enzimatici (lisil-ossidasi), si formano i legami crociati tra le varie molecole. (Da Cutolo et al., 1994, ridisegnata e modificata).



identificate nel 1986 una glicoproteina associata alle microfibrille di 31 kDa (MAGP), un'altra proteina di 78 kDa (MP78) ed altre di circa 340 kDa (MP340). Le componenti proteiche suddette sono tra loro correlate nella composizione delle microfibrille elastiche. Finalmente nell'uomo, sempre nel 1986, è stata identificata nelle microfibrille una proteina di 350 kDa, equivalente alla 340 kDa bovina e classificata come *fibrillina* [f.] (Sakai *et al.*, 1986).

La f., ricca di residui di cisteina, è presente in vari tessuti umani (ad es. arterie, pericondrio e periostio, legamenti) e dimostra un diametro di circa 10-12 nm. Il primo anticorpo monoclonale diretto contro la f. ha in effetti reagito con le microfibrille presenti in vari tessuti che includevano: cute, polmoni, rene, tendini, cornea, oltre ai vasi sanguigni (Sakai *et al.*, 1986).

Genetica

Nel 1991 varie ricerche hanno dimostrato che esistono almeno due geni omologhi codificanti per la f., uno localizzato sul cromosoma 15q15-21 (indicato come *FBN1*) e l'altro sul cromosoma 5q23-31 (indicato come *FBN2*) (Lee *et al.*, 1991; Maslen *et al.*, 1991). Le due proteine fibrilline così identificate sono state corrispondentemente indicate come fib-1 e fib-2 e rappresentano una nuova famiglia di proteine della matrice proteica extracellulare (Zhang *et al.*, 1994). L'analisi della sequenza aminoacidica delle f., dedotta dal cDNA (il cDNA è una sequenza di DNA complementare all'RNA messaggero), ha dimostrato che le f. presentano molteplici ripetizioni di un motivo base caratteristico della struttura proteica dell'*epidermal growth factor* (EGF), in particolare della sottoclasse calcio-legante (CB) e contenente sei cisteine (Carpenter e Cohen, 1990). Un secondo motivo base, contenente otto cisteine e presente anche nella proteina di legame del *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) è stato riscontrato sia in fib-1, sia in fib-2 (Kanzaki *et al.*, 1990). La rappresentazione schematica della struttura delle f. è riportata nella fig. 2.

Esiste una differenziata espressione temporo-spaziale delle due f.: fib-2 prevale nelle prime fasi della morfogenesi e la sua massima espressione nei tessuti precede la loro differenziazione per poi ridursi; in quest'ultima fase prevale invece fib-1 (Zhang e Ramirez, 1995).

Fibrillina e sindrome di Marfan

L'importanza delle f. nella fisiopatologia del tessuto connettivo è emersa in seguito alla scoperta che loro mutazioni

determinano le pleiotropiche manifestazioni della sindrome di Marfan (V. MARFAN, SINDROME DI [v.; v.*; v.**]; Dietz *et al.*, 1991b; Dietz *et al.*, 1992). D'altra parte, nel 1991 veniva localizzato il locus per il gene della sindrome di Marfan sul cromosoma 15 (tra 15q15 e 15q21.3) confermando un inequivocabile *genetic linkage* con il gene *FBN1* (Dietz *et al.*, 1991a). Contemporaneamente veniva studiata sui pazienti affetti da sindrome di Marfan la sintesi di f. da parte di fibroblasti posti in coltura e la distribuzione delle proteine nei tessuti patologici. Gli studi confermavano la presenza di varie alterazioni nella sintesi e nella distribuzione delle f. in circa in 90% dei casi esaminati (Kainulainen *et al.*, 1993).

Sulla base delle diverse anomalie osservate nella fib-1 sono state proposte 4 classi di pazienti affetti da sindrome di Marfan. Pazienti i cui fibroblasti sintetizzano solo il 50% della normale fibrillina (*FBN1*), altri che ne sintetizzano una quantità normale; tuttavia o la secerono meno efficientemente dei soggetti normali oppure questa non è incorporata nella matrice elastica, infine esistono altri pazienti che producono una normale quantità di fibrillina che viene incorporata nella matrice elastica, senza evidenti danni morfologici. Gli studi molecolari sul DNA dei pazienti affetti da sindrome di Marfan hanno evidenziato almeno venti diverse mutazioni a livello del gene *FBN1*. La rappresentazione schematica della struttura della *FBN1* e la sede di dieci delle differenti mutazioni identificate sono riportate nella fig. 3. In otto delle dieci mutazioni riportate nella figura, l'alterazione è stata localizzata a livello delle gene *FBN1* che codifica per una sequenza simile all'EGF (Kainulainen *et al.*, 1994). Il grande numero di possibili mutazioni a livello del gene *FBN1*, rende ragione del polimorfismo fenotipico della sindrome di Marfan e quindi anche della presenza di forme fruste con semplice «habitus Marfanoid» (Francke e Furthmayr, 1994). Nella fig. 4 è rappresentato un tipico caso di sindrome di Marfan.

Mutazioni della *FBN2* sono state trovate in pazienti affetti da una sindrome del tipo sindrome di Marfan, e precisamente l'*aracnodattilia contrattile congenita* (Tsipouras *et al.*, 1992). I pazienti con tale rara forma somigliano dal punto di vista scheletrico ai malati di sindrome di Marfan (V. MARFAN, SINDROME DI**), tuttavia mostrano contratture articolari al posto della lassità articolare. Inoltre, mancano le alterazioni cardiovascolari ed oculari della sindrome di Marfan e si presentano invece alterazioni morfologiche dell'orecchio esterno (Beals e Hecht, 1971).

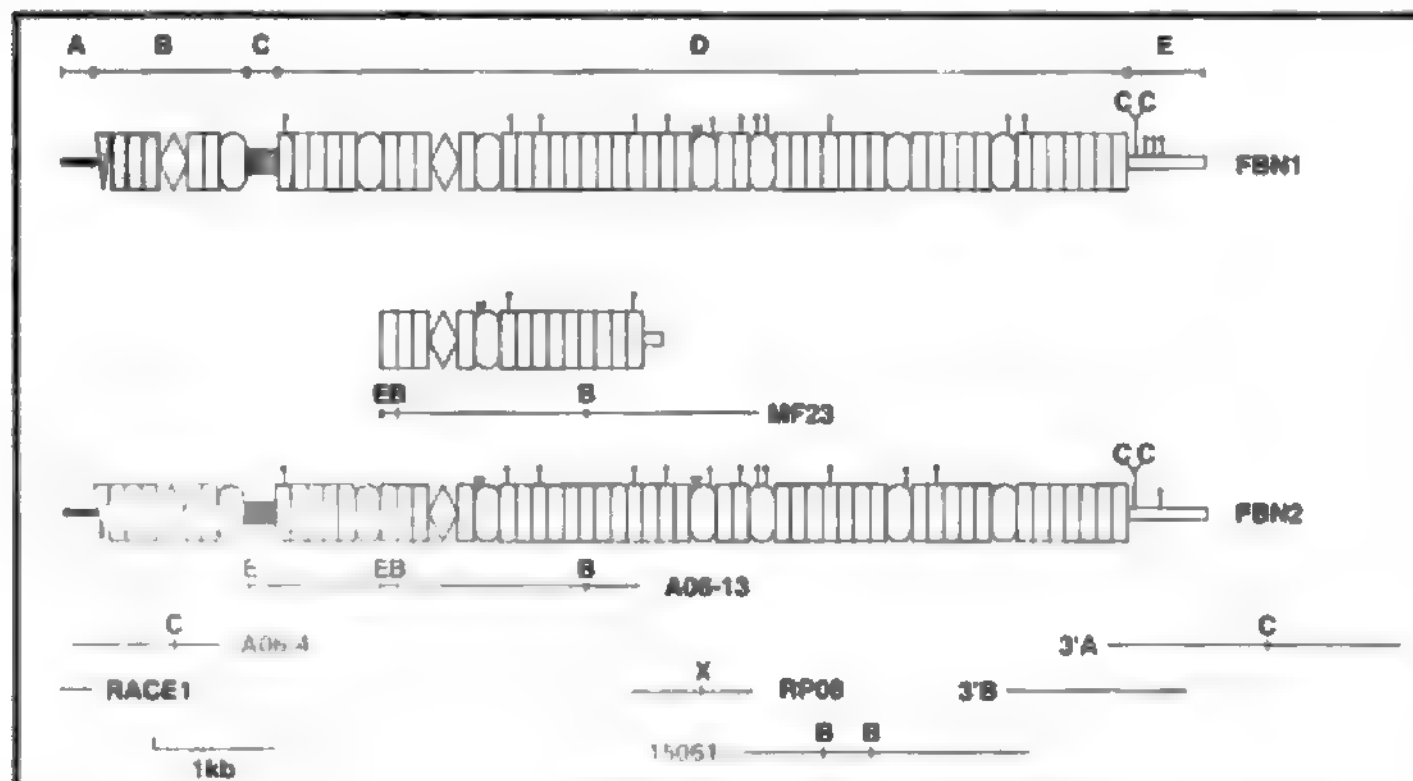
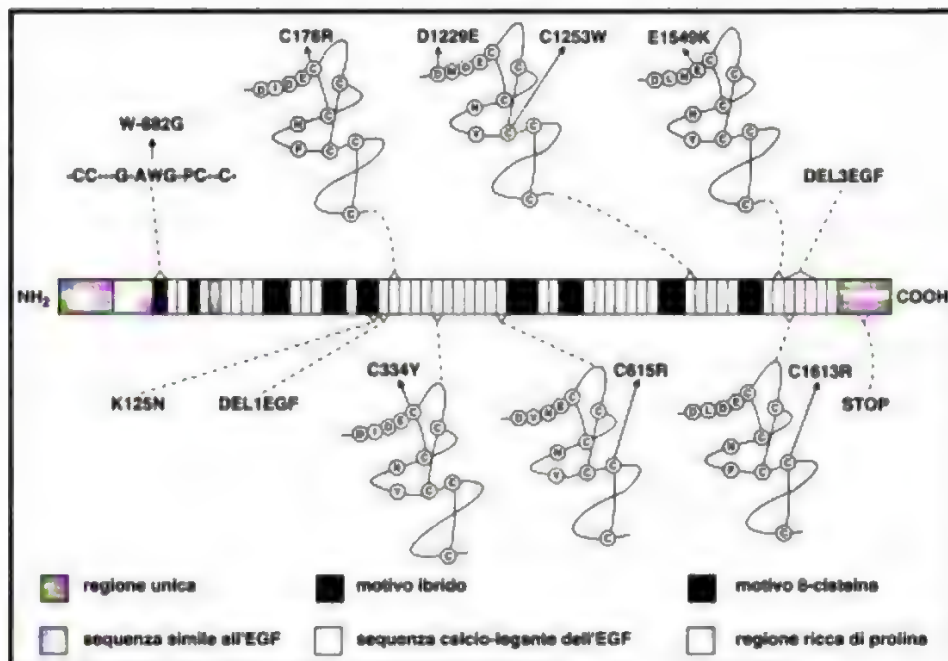


Fig. 2. Rappresentazione schematica della fibrillina-1 (fib-1) e fibrillina-2 (fib-2). I simboli indicano i seguenti elementi strutturali: sequenza simile all'*epidermal growth factor* (EGF) (rettangoli in grigio); sequenza calcio-legante dell'EGF (rettangoli bianchi); sequenza della proteina di legame del *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) (ovali bianchi); altre sequenze (diversi simboli). Nella parte inferiore della figura è riportata la mappa della restrizione enzimatica per il cDNA del *FBN2*. (Da Zhang *et al.*, 1994, ridisegnata e modificata).

Fig. 3. Rappresentazione schematica dei differenti motivi presenti a livello della catena polipeptidica della f., nonché posizione e tipo delle mutazioni conosciute in presenza di sindrome di Marfan. (Da Kainulainen *et al.*, 1994, ridisegnata).



Anche la forma neonatale di sindrome di Marfan è stata dimostrata associata a differenti mutazioni del gene *FBN1*, come pure la presenza di *ectopia lentis* (lussazione del cristallino) che spesso si accompagna alla sindrome di Marfan (fig. 3) (Kainulainen *et al.*, 1994). Mutazioni nella regione

dell'EGF, sottoclasse calcio-legante (CB), sembrano associarsi a fenotipi meno severi, mentre mutazioni a livello del C terminale di *FBN1* indurrebbero fenotipi più gravi. L'ampio spettro di disordini del tessuto connettivo legati ad alterazioni delle f., devono indurre il medico, nel sospetto di



Fig. 4. Caso di sindrome di Marfan. A sinistra: sono evidenti la dolichocefalia (1), l'arachnodattilia (2), la lassità articolare (3). In alto: sono evidenti la sottigliezza della cute (4), le asimmetrie scapolari indotte dalla scoliosi (5), la lunghezza notevole degli arti (6). (Archivio Dr. M. Cutolo).

una di queste patologie, a fare riferimento presso i Centri specialistici per un giudizio diagnostico-prognostico-profilattico sul paziente (Cutolo *et al.*, 1994).

Bibliografia

- Beals R. K., Hecht F., *J. Bone Joint Surg.*, 1971, **53**, 887.
 Carpenter G., Cohen S., *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 7709.
 Cleary E. G., Gibson M. A., *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 1983, **10**, 97.
 Cutolo M., Sulli A., Barone A. *et al.*, *Reumatismo*, 1994, **47**, 216.
 Dietz H. C., Cutting G. R., Pyeritz R. E. *et al.*, *Nature*, 1991a, **352**, 337.
 Dietz H. C., Pyeritz R. E., Hall B. D. *et al.*, *Genomics*, 1991b, **9**, 355.
 Dietz H. C., Pyeritz R. E., Puffenberger E. G. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1992, **89**, 1674.
 Franke U., Furthmayr H., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1384.
 Gibson M. A., Sandberg L. B., Grosso L. E., Cleary E. G., *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 7596.
 Kainulainen K., Karttunen L., Lonnqvist I., *Fibrillin mutations produce diverse clinical phenotypes*, in Cutolo M. ed., *Workshop on The Heritable Disorders of the Connective Tissue: from the Biology to the Clinic*, *Eur. J. Histochem.*, 1993, 37/3.
 Kainulainen K., Karttunen L., Puhakka L. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **6**, 64.
 Kanzaki T., Olofsson A., Morén A. *et al.*, *Cell*, 1990, **61**, 1051.
 Lee B., Godfrey M., Vitale F. *et al.*, *Nature*, 1991, **352**, 330.
 Maslen C. L., Corson G. M., Maddox P. K. *et al.*, *Nature*, 1991, **352**, 334.
 Rosenbloom J., *Meth. Enzymol.*, 1987, **144**, 172.
 Sakai L. Y., Keene D. R., Engvall E., *J. Cell. Biol.*, 1986, **103**, 2499.
 Tsipouras P., del Mastro R., Sarfarazi M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 905.
 Zhang H., Apfelroth S. D., Hu W. *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 1994, **124**, 855.
 Zhang H., Ramirez F., *J. Cell. Biol.*, 1995, **129**, 1165.

MAURIZIO CUTOLO

FIBRINOLISI [v. vol. VI, coll. 1572-1588; Agg. coll. *3219-3220; v. anche FIBRINOLITICI FARMACI*, coll. *3220-3231]

SOMMARIO

Definizione (col. 2303). - **Attivatori della fibrinolisi** (col. 2304). - **Inibitori della fibrinolisi** (col. 2305). - **Attivazione del sistema della fibrinolisi** (col. 2306).

Definizione

Il sistema della fibrinolisi [f.] è un complesso di proteine, ad azione attivatrice od inibitrice, che danno origine alla pla-

smia, enzima proteolitico, particolarmente attivo nei confronti della fibrina e del fibrinogeno, ma anche nei confronti di altre proteine plasmatiche e tissutali.

Attivatori della fibrinolisi

Schematicamente, il sistema della f. (fig. 1) consiste nella trasformazione del plasminogeno, proenzima inattivo, in plasmina. Tale attivazione può essere provocata da diverse sostanze che possono essere distinte in fisiologiche e in esogene o terapeutiche. Al primo gruppo appartengono l'attivatore tissutale del plasminogeno (o TPA, *Tissue-type Plasminogen Activator*, o t-PA, *tissue Plasminogen Activator*), l'urochinasi (v. o uPA, *urokinase-type Plasminogen Activator*), e in minor misura la callicreina.

Al secondo gruppo appartengono diversi prodotti, in parte ancora in via di preparazione e di sperimentazione clinica, da somministrare come farmaci trombolitici o fibrinolitici (v. FIBRINOLITICI FARMACI*) nel trattamento delle trombosi in fase precoce: tra queste proteine la streptochinasi (v. STREPTOCHINASI E STREPTODORNASI) è utilizzata da più lungo tempo e presenta un particolare, indiretto meccanismo di attivazione del plasminogeno (formazione di un complesso streptochinasi-plasminogeno, capace di attivare altre molecole di plasminogeno).

L'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) è una glicoproteina, dal peso molecolare di 68.000 dalton, sintetizzata dalle cellule endoteliali. Lo studio del cDNA che determina la sequenza del t-PA (posto nel cromosoma 8) e la conseguente analisi della sua struttura hanno dimostrato che la molecola del t-PA presenta diverse omologie con altre proteine: iniziando dalla porzione aminotermine, si trova un dominio tipo *finger*, omologo a strutture analoghe della fibronectina; quindi si trova un dominio simile all'*epidermal growth factor* e quindi 2 strutture tipo *kringle*, omologhe ad analoghe strutture presenti nel plasminogeno, nell'urochinasi, nella protrombina, nel fattore Hageman, ed infine il dominio della serina-proteasi, analogo a quello presente in numerose altre serina-proteasi. Così la molecola del t-PA risulta essere una proteina «a mosaico» in cui i singoli domini possono essere funzionalmente autonomi.

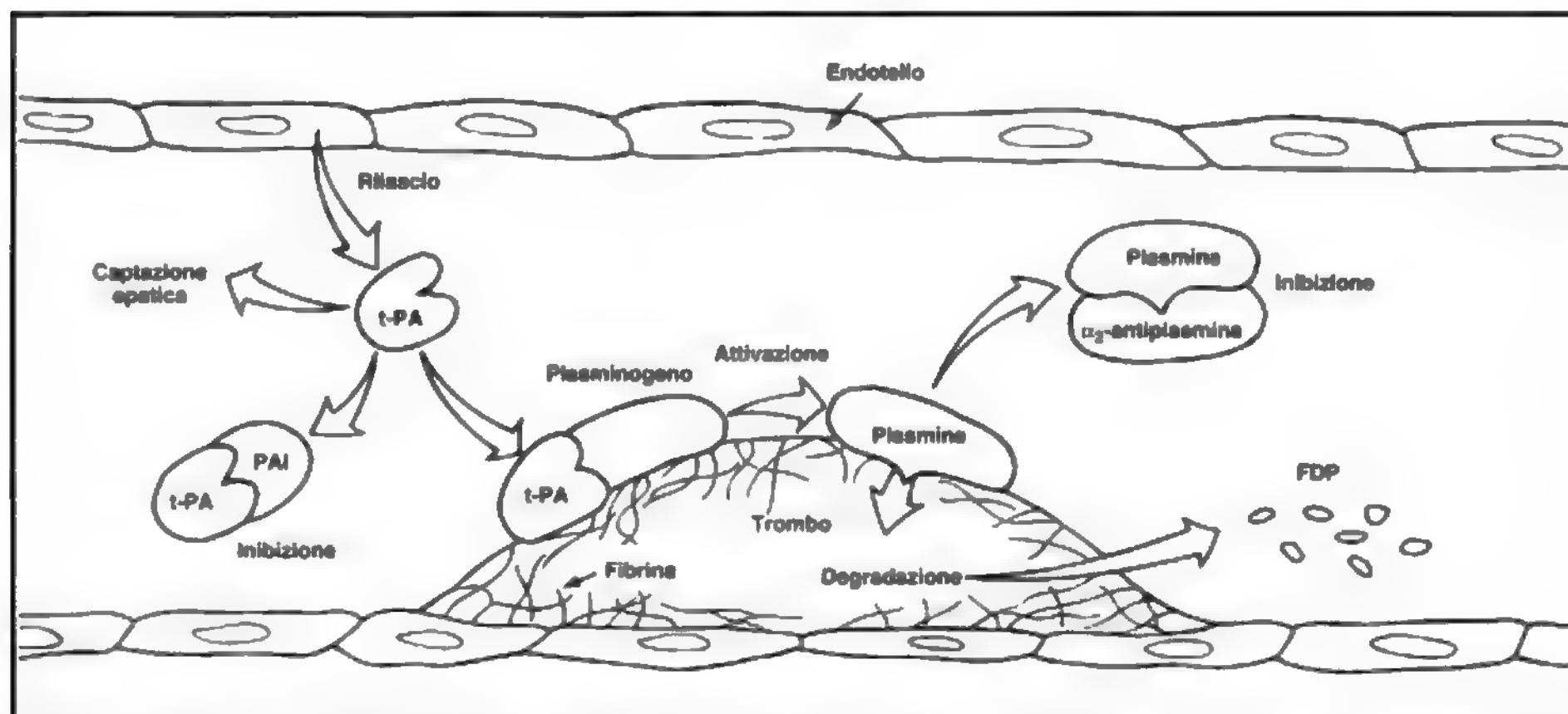


Fig. 1. Rappresentazione schematica del sistema della f. (FDP) prodotti di degradazione della fibrina. (Da Wilman B., Hamsten A., in Heber E., Braunwald E. eds. *Thrombosis: Basic contributions and clinical progress*, 1991, Mosby, St. Louis, modificata e ridisegnata).

Per quanto riguarda il legame del t-PA e del plasminogeno con la fibrina, esso si attua attraverso siti di legame costituiti da lisina, presenti nelle strutture tipo *kringle* del plasminogeno e del t-PA, ove il *kringle-2*, insieme alla regione *finger*, permette il legame con la fibrina. Il *kringle-2* del t-PA interviene anche nella prima fase della reazione con l'inibitore PAI-1, seguita da una fase irreversibile in cui il PAI-1 (v. sotto) si lega alla catena leggera del t-PA. Al contrario la funzione della regione *kringle-1* del t-PA non è nota.

L'urochinasi (v.) viene sintetizzata, come prodotto di un gene posto nel cromosoma 10, in forma nativa come un'unica catena polipeptidica con un peso molecolare di 50.000-56.000 dalton, e formata da 411 aminoacidi. Questa pro-urochinasi o scu-PA (*single-chain uPA*) contiene 4 domini distinti, uno analogo all'*epidermal growth factor* (e simile a quello presente nel t-PA), una regione *kringle*, analoga a quelle presenti nel t-PA, nel plasminogeno e nella protrombina, un peptide di connessione e un dominio proteolitico (residui $\text{his}_{214}\text{-asp}_{255}\text{-scr}_{356}$). All' asp_{302} è legata la catena glicidica, mentre il sito di attivazione si trova a $\text{lys}_{150}\text{-ile}_{159}$. La plasmina e la callicreina operano l'attivazione enzimatica con formazione dell'urochinasi a doppia catena, l' α - e la β -, contenente il dominio proteolitico.

Nel plasma la pro-urochinasi è stabile per lunghi periodi di tempo, non formandosi complessi con gli inibitori fisiologici dell'attivazione del plasminogeno. In questa maniera il pro-uPA svolge una funzione di trasporto che gli permette di giungere sul trombo, trasformandosi in uPA e svolgere la sua azione proteolitica, 500 volte superiore a quella del pro-uPA.

Inibitori della fibrinolisi

L'attivazione del plasminogeno provoca un'intensa, localizzata attività proteolitica, che deve essere ben regolata per non creare problemi clinici. Così, la sintesi di t-PA e di uPA da parte delle cellule endoteliali è regolata da ormoni, citochine e fattori di crescita, mentre l'azione degli attivatori del plasminogeno è neutralizzata dagli inibitori degli attivatori del plasminogeno (o PAIs, *Plasminogen Activator Inhibitors*).

Il PAI-1 è una proteina, a catena singola, del p.m. di 52.000 dalton, sintetizzata per azione di un gene, posto sul cromosoma 7, e già isolato. Esso si trova nel plasma, sotto forma attiva, alla concentrazione media di 0,05 $\mu\text{g/ml}$, e costituisce l'inibitore fisiologico del t-PA. Esso viene sintetizzato dalle cellule endoteliali e in tale processo intervengono l'interleuchina 1, il *Tumor Necrosis Factor* (TNF) e il *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β). Il PAI-1 è presente anche nelle piastrine, nella matrice extracellulare e nei terreni di coltura di diverse cellule. Una volta prodotto in forma attiva, il PAI-1 decade rapidamente per modificazioni conformazionali della molecola.

L'importanza fisiologica della regolazione operata dal PAI-1 è documentata dall'aumentata incidenza di trombosi nei soggetti con concentrazione plasmatica di PAI-1 ridotta.

Il PAI-2 è una proteina non glicosilata, del peso molecolare di 47.000 dalton, sintetizzata per azione di un gene localizzato sul cromosoma 18, già isolato e caratterizzato; il centro reattivo è localizzato nel sito $\text{arg}_{394}/\text{thr}_{401}$.

Il PAI-2 si riscontra a livello intracellulare in un'ampia varietà di cellule normali o trasformate, ma la sua sintesi viene notevolmente attivata per azione di diversi stimoli, come il forbol-estere, l'interleuchina 1, il TNF, l'interleuchina 2, e ridotta dal desametasone.

In condizioni normali, il plasma umano contiene tracce non dosabili di PAI-2. Durante la gravidanza, tale concen-

trazione plasmatica aumenta progressivamente fino ad un valore medio, a termine, di 250 $\mu\text{g/ml}$; contemporaneamente aumentano anche le concentrazioni plasmatiche di t-PA, uPA e PAI-1, per cui, complessivamente, l'azione degli attivatori risulta ridotta. In gravidanza, si riscontra prevalentemente la forma glicosilata di PAI-2, con p.m. di 60.000 dalton. L'incremento del PAI-2 è dovuto ad una sua specifica sintesi da parte della placenta.

Altri inibitori della f. sono stati meno studiati, come le proteasi nexine I e II, e il PAI-3; questa proteina è identica all'inibitore della proteina C, inibisce anche l'urochinasi e la callicreina. Normalmente il PAI-3 si trova nelle urine in quanto viene sintetizzato nel tessuto renale e interverrebbe nella normale funzionalità renale.

L' α_2 -antiplasmina (v.*) è l'inibitore fisiologico della f. conosciuto da maggior tempo. Si tratta di una proteina, a catena singola, del p.m. di 70.000 dalton, presente nel plasma normale alla concentrazione media di 70 $\mu\text{g/ml}$. Nel plasma l' α_2 -antiplasmina reagisce con la plasmina a velocità elevata, prima legandosi in maniera reversibile ai siti di legame per la lisina, e formando poi un complesso stabile con la catena leggera della plasmina, inibendola quindi in modo irreversibile. La plasmina legata alla fibrina è inattivata molto meno facilmente della plasmina libera poiché i siti di legame dell'enzima per la lisina sono legati alla fibrina. D'altra parte, l' α_2 -antiplasmina può essere legata covalentemente alla fibrina in seguito alla formazione di legami crociati con la catena α , indotti dal fattore XIIIa.

Attivazione del sistema della fibrinolisi

In condizioni fisiologiche il t-PA e l'uPA sono capaci di trasformare il plasminogeno in enzima attivo, o plasmina. Il plasminogeno è una proteina a catena singola, con un peso molecolare di 88.000 dalton, presente nel plasma alla concentrazione media di 0,2 $\mu\text{g/ml}$. La molecola intatta di plasminogeno possiede in posizione N-terminale un residuo di acido glutamico e pertanto è definito glu-plasminogeno, per distinguerlo da altre forme parzialmente degradate. Il t-PA e l'uPA agiscono sul sito di clivaggio posto alla posizione $\text{arg}_{461}\text{-val}_{461}$, con formazione di glu-plasmina, costituita da una catena pesante (con 5 anse che contengono i siti di legame per la lisina nell'interazione con la fibrina) e da una catena leggera. A sua volta la plasmina agisce sulla glu-plasmina, trasformandola in lys-plasmina. Questa serie di reazioni può essere invertita, nel senso che la plasmina può agire su molecole di glu-plasminogeno, trasformandolo in lys-plasminogeno, che ha una maggiore affinità per la fibrina: a questo punto gli attivatori del plasminogeno operano sul sito di clivaggio, con formazione di lys-plasmina. Così la plasmina può esistere in tre forme, dette glu-, lys-, val-, quest'ultima priva di 4 delle 5 anse e di tutti i siti di legame per la lisina. Tutte queste forme di plasmina sono endopeptidasi a due catene che idrolizzano i legami di arginina e lisina in proteine, quali il fibrinogeno, la fibrina, i fattori V ed VIII, alcune componenti del complemento, l'ACTH, l'ormone somatotropo, il glucagone.

L'azione degli attivatori del plasminogeno viene fisiologicamente neutralizzata dal PAI-1, e solo in particolari condizioni, come la gravidanza, anche dal PAI-2. La plasmina formatasi viene invece rapidamente neutralizzata: dall' α_2 -antiplasmina, la cui carenza congenita infatti si associa a una sindrome emorragica cutaneo-mucosa.

Infine occorre sottolineare che negli ultimi anni sono stati notevolmente approfonditi gli studi sul ruolo del sistema fibrinolitico a livello tissutale. Queste osservazioni hanno documentato la presenza di attivatori e di inibitori della f. in diversi tessuti, sia in condizioni fisiologiche sia in alcune situazioni fisiopatologiche; in realtà è stato possibile

FIBRINOLISI

documentare che l'attivazione del plasminogeno a livello tissutale interviene in diverse condizioni, quali le interazioni cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare, la formazione del trofoblasto, l'involutione della ghiandola mammaria dopo il periodo dell'allattamento, la cicatrizzazione delle ferite, la spermatogenesi, la involuzione della prostata. Nell'ambito dei rapporti tra cellule e matrice extracellulare numerosi studi hanno esaminato il comportamento delle componenti della f. nei tumori umani, documentando che la ridotta concentrazione tissutale di t-PA, l'aumentata sintesi di uPA e di PAI-1 possono possedere anche un significato prognostico, specialmente nei tumori della mammella e del colon. Tutti questi studi hanno stimolato l'analisi dei recettori cellulari per l'uPA e il t-PA, recettori presenti in diversi tessuti e che permettono la internalizzazione e la degradazione dei complessi uPA: PAI-1 o t-PA: PAI-1.

Bibliografia

- Baker J. B., Gronke R. S., *Semin. Thromb. Haemost.*, 1986, **12**, 216.
 Banyai L., Varadi A. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1983, **163**, 37.
 Bu G., Warshawsky I. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 3427.
 Christensen V., Clemmensen L., *Biochem. J.*, 1977, **163**, 389.
 Christensen V., Sottrup-Jensen L. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1979, **567**, 472.
 Francis C. W., Marder V. J., in Williams W. J., Beutler E. *et al.* eds., *Ematologia* (edizione italiana), 1991, McGraw-Hill, Milano.
 Gandolfo G. M., Conti L., Vercillo M., *Anticancer Res.*, 1996, **16**, 2155.
 Kruithof E. K. O., Baker M. S. *et al.*, *Blood*, 1995, **86**, 14007.
 Loskutov D. J., Sawdey M. *et al.*, in Collier B. S., *Progress in Hemostasis and Thrombosis*, 1988, Saunders W. D., Philadelphia.
 Radtke K. P., Fernandez J. A. *et al.*, *Thromb. Haem.*, 1993, **69**, 723.
 Sawdey M., Podor T. J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1983, **264**, 10396.
 Stiff T. W., Radtke K. P. *et al.*, *Biol. Chem.*, 1987, **368**, 1427.
 Wallen P., Wilman B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **221**, 20.
 Wilman B., Collen D., *Nature*, 1978, **272**, 549.
 Wilman B., Collen D., *Eur. J. Biochem.*, 1978, **84**, 573.

GIUSEPPE M. GANDOLFO E LAURA CONTI

FIBRINOLITICI FARMACI: V. FIBRINOLITICI FARMACI*, coll. *3220-3231; V. anche FIBRINOLISI**.

FIBROBLASTICI FATTORI DI CRESCITA: V. FATTORI DI CRESCITA** (col. **2171).

FIBROMIALGIA

f. *fibromyalgie*. - f. *fibromyalgia*. - f. *fibromyalgie*. - s. *fibromyalgia*.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2307). - **Etiopatogenesi** (col. 2308). - **Anatomia patologica** (col. 2309). - **Sintomatologia** (col. 2310). - **Diagnosi e diagnosi differenziale** (col. 2311). - **Decorso e prognosi** (col. 2313). - **Terapia** (col. 2313).

Introduzione

La fibromialgia o sindrome fibromialgica [SF] è una forma di reumatismo extrarticolare generalizzato con sintomatologia dolorosa cronica ed astenia, associate a senso di tensione e/o rigidità, a carico dei muscoli, dei tessuti articolari e periarticolari, del tessuto sottocutaneo, dei legamenti e delle inserzioni tendinee, accompagnata da una peculiare e spiccata sensibilità dolorosa in siti anatomici specifici, definiti *tender points* (TP). Essa inoltre è modulata da alcuni fattori quali il clima, l'attività fisica, gli stress in genere, la qualità del sonno, sono comunemente presenti anche cefalea, colon irritabile, astenia, dismenorrea.

L'assenza di lesioni anatomopatologiche, di anomalie biochimiche e di alterazioni evidenziabili con le più classiche metodiche strumentali e la frequente presenza di disturbi psicologici (peraltro molto comuni nelle patologie caratte-

rizzate da dolore cronico) hanno creato di frequente notevoli difficoltà di interpretazione etiopatogenetica nonché un atteggiamento di diffidenza della classe medica nei confronti di questi malati. Tuttavia gli elementi fondamentali della SF (dolore in assenza di lesioni tissutali, dolenzia diffusa e generalizzata a livello di tessuti articolari e periarticolari, tendenza alla cronicità) sono stati inseriti in un quadro clinico ben preciso e con criteri diagnostici ormai ben codificati. Si preferisce utilizzare il termine *sindrome fibromialgica* per sottolineare la mancanza di una causa univoca apparente, l'assenza di fenomeni infiammatori e l'associazione con sintomi estranei all'apparato muscolo-scheletrico.

Etiopatogenesi

L'esatta etiopatogenesi della SF è tuttora sconosciuta e nel determinismo della malattia è possibile l'intrecciarsi di cause, ognuna delle quali può avere un peso più o meno importante. Finora non sono stati raccolti dati definitivi su un preciso evento patogenetico, ma l'opinione corrente è che la SF emerga da una complessa interazione tra eventi nocicettivi periferici (a livello muscolo-scheletrico, di tipo metabolico o funzionale) ed alterazioni a livello del S.N.C. (di natura neurochimica o neuropsichiatrica) (fig. 1).

Si può verificare una attivazione dei nocicettori periferici per cause meccaniche (traumi o microtraumi) o per eventi neurochimici, legati all'eventualità di un'inflammatione neurogenica.

Accanto, o in alternativa, a questi fenomeni periferici, è da considerare l'eventualità di disfunzioni del controllo motorio da parte del S.N.C., responsabili di un circolo vizioso «dolore → ipertono muscolare → dolore»; in ogni caso tali eventi riflessi possono senz'altro costituire un elemento favorente la cronicizzazione del processo (fig. 2).

A livello del S.N.C. inoltre possono verificarsi eventi coinvolgenti i sistemi di modulazione del dolore, in particolare quelli preposti all'inibizione della percezione del dolore e/o quelli che regolano il sonno, rappresentati da anomalie dei neurotrasmettitori (serotonina, endorfine, etc.). Tali alterazioni potrebbero contribuire ad incrementare ed autoalimentare la trasmissione o la percezione dell'informazione nocicettiva.

La relativa mancanza di riscontri patologici obiettivi, come dati di laboratorio, istopatologici o strumentali, può indurre l'impressione che nella SF possano essere predominanti o determinanti fattori psicopatologici, con prevalenza dei meccanismi motivazionali-affettivi che danno un significato emozionale allo stimolo nocicettivo. Tale concetto

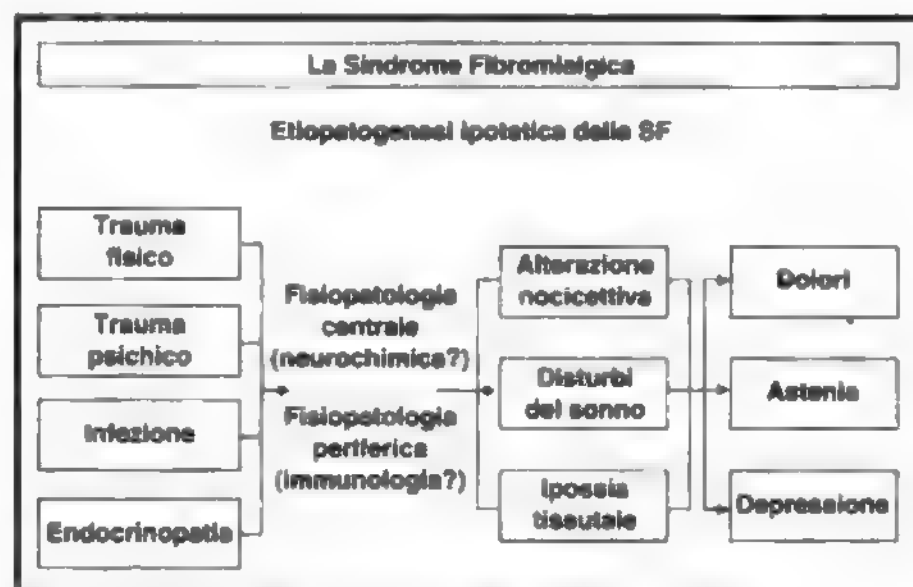


Fig. 1. Schema della patogenesi della f.

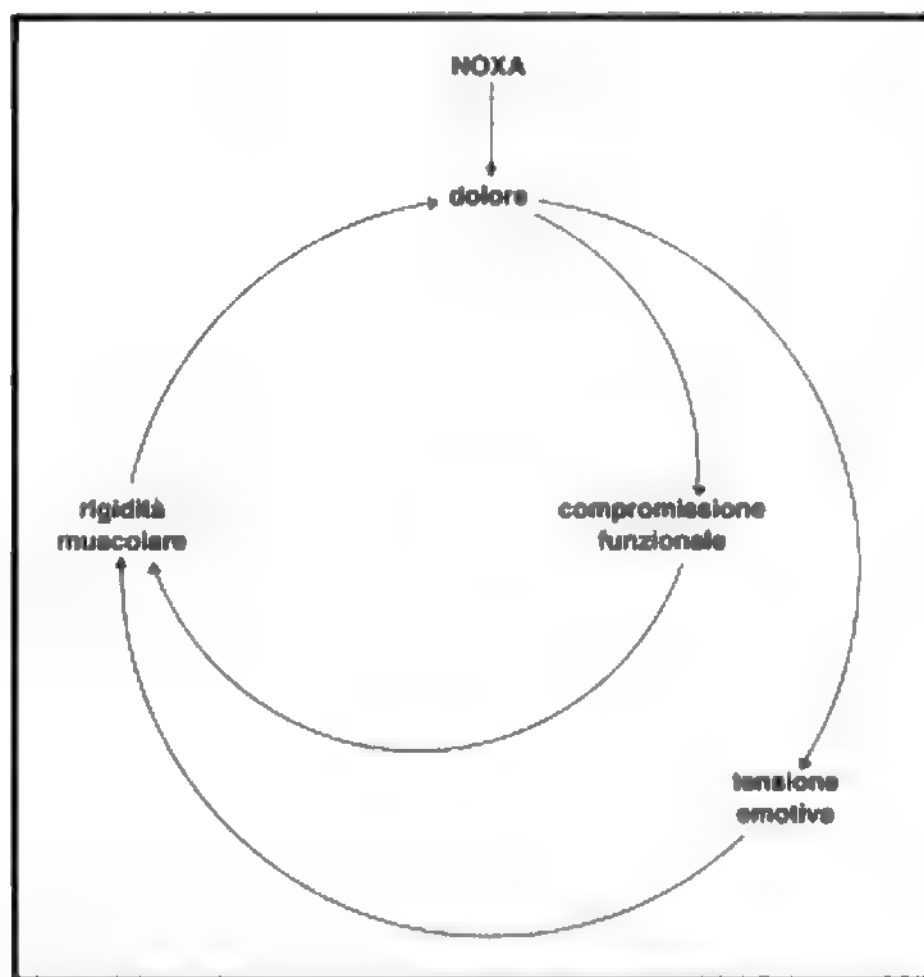


Fig. 2. Circolo vizioso ipotizzato alla base della f.

prende supporto dall'osservazione che, nei fibromialgici, si riscontrano spesso alterazioni dello stato dell'umore, nevrosi ansiose, sintomi ipocondriaci, stati depressivi, insieme a disturbi del sonno ed astenia, interpretabili come segni di un alterato rapporto con se stessi, con gli altri, con la malattia e con gli inevitabili ostacoli della vita quotidiana: la SF, in definitiva, sarebbe una malattia psicosomatica, espressione di una depressione latente somatizzata. Tuttavia, diversi studi psicologici effettuati in questa direzione hanno dato risultati contrastanti, soprattutto per la difficoltà di delineare una relazione precisa di causa ed effetto tra disturbi psicologici ed i sintomi da dolore cronico della SF.

Infine è stato notato come la SF avesse alcuni elementi in comune con la «sindrome da fatica cronica» (*chronic fatigue syndrome*, CFS; v. SINDROME DA FATICA CRONICA*), quali cefalea, anomalie del sonno e del tono dell'umore, astenia, mentre, nei pazienti con CFS sono stati trovati dei TP con maggior frequenza rispetto ai controlli. Tuttavia tali dati devono trovare maggiori conferme, soprattutto in merito agli eventuali meccanismi di base delle associazioni rilevate.

L'impressione generale è che l'etiopatogenesi della SF sia come un puzzle di cui abbiamo forse tutti i pezzi, ma che non riusciamo ancora ad assemblare nella maniera più corretta.

Anatomia patologica

Sotto il profilo anatomopatologico, l'analisi del tessuto muscolare dei soggetti con SF ha fornito dati piuttosto scarsi ed i risultati non sono univoci.

Un dato essenziale è rappresentato dall'assenza di lesioni flogistiche, mentre è stata individuata la presenza di fibre muscolari connesse tra loro da un reticolo di fibre elastiche e reticolari. Inoltre è stata evidenziata una degenerazione delle fibre muscolari, associata a fenomeni di rigenerazione (le cosiddette fibre «tarmate» o «sfilacciate») con accumulo subsarcolemmale di glicogeno, aumento del numero dei mitocondri e dei vacuoli lipidici. Si tratta comunque di alterazioni aspecifiche, presenti sia in soggetti sani che affetti da patologie muscolari di altra natura. Infine anche il dato relativo alla deposizione di immunoglobuline a livello della

giunzione dermo-epidermica viene ritenuto del tutto aspecifico e privo di qualsiasi significato clinico.

Sintomatologia

L'inizio della sintomatologia fibromialgica può talora risalire all'infanzia, ma si presenta più di frequente fra i 25-40 o, secondo alcuni AA., fra i 45-60 anni. Si tratta di una patologia piuttosto comune, rappresentando, in campo reumatologico, la seconda patologia dopo l'osteoartrosi ed è più frequente nel sesso femminile con una prevalenza oscillante fra il 73 e l'88%.

Molto spesso i pazienti riferiscono uno o più eventi associati con l'esordio della malattia: fattori emozionali, stress, mutamenti familiari o ambientali, stati di affaticamento, traumi, interventi chirurgici, «iperattività fisica».

La sintomatologia fibromialgica può manifestarsi sotto le varie forme sintetizzate nella tab. I, ma il quadro clinico è spesso polimorfo con le diverse varianti che tendono a sovrapporsi in misura molto variabile.

Il sintomo cardinale è il *dolore*, o talvolta un senso di indolenzimento, riferito prevalentemente in sede muscolare paravertebrale ed ampiamente distribuito, generalmente a livello cervicale e lombare, con irradiazioni verso gli arti superiori ed inferiori. Quando viene riferito centralmente, viene definito come una sensazione dolorosa vera e propria, mentre nelle sue proiezioni distali tende a sfumare in un senso di gonfiore o di intorpidimento.

Il dolore è avvertito maggiormente al mattino e non è in rapporto con il carico articolare, mentre è aggravato dall'attività fisica intensa, dagli stress psico-emotivi, dai mutamenti meteorologici, dal freddo e dal vento; anche la vita sedentaria e l'ipoattività fisica in genere, le situazioni d'ansia, il periodo premestruale e mestruale sono altrettanti fattori aggravanti. Il dolore invece viene ridotto da una attività fisica moderata, dal calore e dai massaggi. Inoltre i pazienti accusano un senso di rigidità, specie al mattino, definibile come una sensazione di incrementata tensione tessutale o di pesantezza degli arti e riferiscono astenia e profonda stanchezza. Un altro segno patognomico è il riferimento di un sonno non riposante, spesso inquieto, per cui tali soggetti, al mattino, dicono di sentirsi più stanchi di quanto non lo fossero al momento di andare a letto la sera prima.

TAB. I. QUADRI CLINICI DELLA FIBROMIALGIA

	Caratteristiche	Diagnosi differenziale
Sintomatologia articolare	dolore in sede articolare (spalla-polso-mani, etc.); edema soggettivo	artriti, connettiviti
Sintomatologia assiale	dolore in sede cervicale o lombare, spesso irradiato; edema soggettivo; senso di freddo	spondilosi; discopatie; spondiliti
Sintomatologia mialgica	dolori muscolari; astenia diffusa	poliomiosite; polimialgia reumatica
Sintomatologia neurovascolare	senso di freddo; edema soggettivo; parestesie alle estremità	connettiviti; sindrome del tunnel carpale
Sintomatologia generalizzata	«dolore diffuso in tutto il corpo»; sintomatologia assiale più periferica	reumatismo psicogeno; connettiviti

Accanto ai sintomi a carico dell'apparato muscolo-scheletrico, un'accurata anamnesi può mettere in luce una serie di sintomi di natura non reumatica, di solito non collegati con il motivo della visita ed abbastanza aspecifici; tuttavia la loro associazione con la sintomatologia muscolo-scheletrica è considerata caratteristica della SF.

In circa la metà dei casi è presente mal di testa, sia sotto forma di cefalea muscolo-tensiva che di emicrania; tipica è pure l'associazione con la sindrome del colon irritabile e la dismenorrea. Inoltre dal colloquio emerge spesso la sensazione che siano presenti uno stato d'ansia e/o depressione più o meno marcati.

All'esame obiettivo in genere il paziente si presenta in buone condizioni generali: non sono riscontrabili le tumefazioni articolari che egli riferisce con insistenza, né altri segni di flogosi articolare e neppure alterazioni della motilità attiva e passiva, se si eccettua una certa rigidità dei movimenti; tuttavia sono tipici una dolenzia delle pliche cutanee, evocabile facendo rotolare il bordo superiore del muscolo trapezio fra i polpastrelli, ed una iperemia reattiva a livello delle zone palpate.

Però ciò che distingue la SF dalle altre affezioni reumatiche, anzi ne rappresenta la caratteristica fondamentale è la presenza di una dolenzia locale alla pressione, diffusa in molte sedi anatomiche ben identificate, definite *tender points* (TP).

I TP corrispondono a zone dermo-ipodermiche ben delimitate anatomicamente, corrispondenti per lo più ad aree muscolari oppure di inserzione tendinea o legamentosa, e che risultano leggermente dolenti negli individui normali, ma sono esageratamente dolenti nei fibromialgici. Si definiscono «tender» e non «trigger» per differenziarli dai *trigger points* delle sindromi miofasciali: in questi casi infatti la palpazione dà origine ad un dolore che si irradia a distanza, in zone bersaglio ben individuabili, mentre la palpazione dei *tender points* dà luogo ad una dolenzia localizzata; inoltre i *trigger points* sono poco numerosi e più raggruppati, mentre i TP sono più numerosi e diffusamente distribuiti.

Spesso i TP non sono dolenti spontaneamente e sono evidenziabili anche in aree che il paziente non riferisce come dolenti e su cui non ha focalizzato la sua attenzione e quindi è importante che essi vengano ricercati in tutte le sedi ove sono normalmente presenti.

I TP più comuni si riscontrano a livello della parte media del trapezio, all'inserzione sternale degli sternocleidomastoidei, nell'area di inserzione dei muscoli suboccipitali, sul bordo mediale della scapola (inserzione del muscolo soprascapoloide), sulla linea parasternale all'altezza del II spazio intercostale, all'epicondilo e all'epitroclea dell'omero, nel tratto paravertebrale C4-C6 e L4-S1, nei punti medio-glutei, a livello del grande trocantere e sul condilo mediale del femore (fig. 3).

Diagnosi e diagnosi differenziale

I sintomi principali della SF (dolori diffusi, disturbi del sonno, rigidità mattutina ed astenia) si ritrovano in molte altre affezioni, anche non reumatiche; tuttavia il segno più tipico della SF, la *presenza dei TP*, non è di frequente riscontrato negli altri pazienti. I criteri clinici per la diagnosi di SF si basano quindi su di un elevato numero di TP, in presenza di sintomi caratteristici per una SF, mentre non sembra esistere, allo stato attuale delle conoscenze, un dato di laboratorio o un esame strumentale in grado di obiettivare in maniera più consistente tale affezione. Quindi è stato proposto un protocollo diagnostico (American College of Rheumatology, 1990) basato sulla presenza di dolore muscolare ampiamente distribuito associato alla dolorabilità di almeno 11 TP simmetricamente distribuiti (tab. II).



Fig. 3. Mappa dei più comuni *tender points* (TP).

È evidente tuttavia che si devono escludere le molteplici situazioni in grado di dare sintomatologia muscolo-scheletrica diffusa.

L'*osteoporosi* colpisce in genere soggetti in età più avanzata, causa dolori prevalentemente articolari, aggravati dal carico e dai movimenti, al mattino il paziente può lamentare solo una lieve rigidità. L'esame obiettivo e quello radiologico mettono in luce le alterazioni tipiche della patologia artrosica.

L'*osteoporosi* si può differenziare facilmente non solo per l'età, in genere più avanzata, ma soprattutto in base ai dati degli esami radiologici e mineralometrici, oltre che sulle caratteristiche del dolore, profondo e notturno.

Le *spondiloartriti sieronegative* nelle fasi iniziali spesso presentano caratteristiche simili alla SF, specie nelle forme entesopatiche: si tratta infatti quasi sempre di soggetti giovani, ma per lo più maschi, con dolori e rigidità diffusi. In questi casi però vi è spesso netta rigidità a carico del rachide lombare e sono presenti alterazioni degli esami radiologici, ecografici e scintigrafici molto caratteristiche (sacroileite ed entesiti).

La *polimialgia reumatica* si manifesta con dolenzia muscolare riferita ai cingoli scapolare e pelvico, ma colpisce

TAB. II. CRITERI DELL'AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY PER LA DIAGNOSI DI FIBROMIALGIA (1990)

Presenza di dolori diffusi (da almeno 3 mesi).

Dolore alla palpazione di 11 *tender points* su 18.

- inserzione muscoli suboccipitali, bilaterale;
- regione anteriore spazi intertrasversari C5-C7, bilaterale;
- parte media del bordo superiore del trapezio, bilaterale;
- origine del soprascapoloide, lungo il bordo mediale della scapola, bilaterale;
- seconda giunzione costocondrale, bilaterale;
- epicondilo laterale, bilaterale;
- grande trocantere, bilaterale;
- regione mediale del ginocchio, prossimale all'interlinea articolare, bilaterale.

soggetti oltre i 60 anni e si manifesta con scadimento delle condizioni generali, febbre ed incremento notevole degli indici di flogosi; tipico poi è il netto miglioramento dopo terapia cortisonica.

Infine l'*ipotiroidismo*, specie in fase subclinica, può essere a volte confuso con la SF, per la presenza di dolenzia muscolare, astenia, sensibilità al freddo; è sufficiente tuttavia un controllo della funzionalità tiroidea per dirimere il dubbio. Altre situazioni sono riportate nella tab. III.

Decorso e prognosi

Il decorso della malattia è sostanzialmente cronico, con alti e bassi spesso legati all'andamento stagionale o ad eventi stressanti concomitanti ed occasionali. L'andamento può essere remittente-intermittente, fluttuante-continuo o progressivo. La prognosi *quoad vitam* non è sfavorevole, in quanto manca una qualsiasi alterazione organica dei tessuti interessati, mentre è la qualità di vita ad essere fortemente penalizzata da una sintomatologia dolorosa cronica, spesso misconosciuta e mal curabile, con gravi scompensi nell'ambiente familiare e sociale del paziente fibromialgico.

Terapia

Le scarse conoscenze patogenetiche impediscono un approccio terapeutico ben definito, anche se emerge la necessità di una programmazione terapeutica multifattoriale, con il coinvolgimento attivo del paziente. In primo luogo occorre tranquillizzarlo, facendogli comprendere la natura fondamentalmente benigna dei suoi disturbi: una spiegazione semplice, ma accurata, dei meccanismi che danno origine al dolore e dei fattori che lo possono modulare facilita la comprensione delle metodiche terapeutiche e migliora senz'altro la *compliance*. Fondamentale è l'adozione di un programma terapeutico costituito da docce calde o da applicazione di calore sotto altre forme (termoforo) seguite dall'esecuzione di idonei programmi di ginnastica: infatti i migliori risultati si ottengono solo se il paziente accetta di incrementare la propria attività fisica.

Di notevole utilità possono essere le terapie termali, sotto forma di fangobalneoterapia.

TAB. III. PATOLOGIE DA CONSIDERARE NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA FIBROMIALGIA

Polientesopatie
Fase polientesopatica di una sopravveniente spondiloartrite anchilosante
Polimialgia reumatica o rizomelica (età!)
Mialgie delle infezioni virali
Algodistrofie riflesse
Neuropatie da intrappolamento
Vasculiti
Artropatie neurogene (tabetica, siringomielica, ecc.)
Reumatismo steroideo
Fase di esordio dell'artrite reumatoide o di una «connettivite» maggiore
Tendiniti e borsiti
Mialgie da iperlavoro (o da lavori manuali svolti da soggetti non abituati o non allenati)
Atlopatie croniche a carico dell'apparato locomotore
Dolori riferiti (algie viscerogene)
Reumatismo palindromico

I farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) sono comunemente usati, anche se con risultati molto variabili e non sempre eccellenti; buoni risultati sono ottenibili con l'infiltrazione locale dei TP con anestetici locali o semplice soluzione fisiologica oppure ricorrendo alla mesoterapia con miorilassanti, anestetici locali e FANS.

Nei pazienti in cui i fattori psicoemotivi sembrano predominanti risulta consigliabile l'uso di ansiolitici e/o antidepressivi, con risultati abbastanza buoni sulla contrattura muscolare, sul dolore, sulle alterazioni del sonno, sull'ansia e sulla depressione. In realtà l'approccio terapeutico con antidepressivi appare razionale se si considerano le azioni di tali farmaci non solo sul tono dell'umore, ma anche sui complessi meccanismi che modulano la percezione del dolore e lo sviluppo del sonno.

Bibliografia

- Bengtsson A., Henriksson K. G., *Sem. Arthritis Rheum.*, 1981, **11**, 151.
 Boissevain M. D., McGain G. A., *Pain*, 1991, **45**, 227; 239.
 Campbell S. M., Clark S., Tindall E. A., et al., *Arthritis Rheum.*, 1983, **26**, 817.
 Forseth K. O., Gran J. T., *Scand. J. Rheumatol.*, 1992, **21**, 748.
 Henriksson C., Gundmark I., Bengtsson A., Ek A. C., *Clin. J. Pain*, 1992, **8**, 138.
 Horne J. A., Shackell B. S., *Clin. Neurophysiol.*, 1991, **79**, 271.
 Hudson S. I., Goldenberg D. L., Pope H. G., et al., *Am. J. Med.*, 1992, **92**, 363.
 Lantenschlager J., Seglias J., Bruckle W., Muller W., *Clin. Rheum.*, 1991, **10**, 168.
 Simms R. W., Gunderman J., Howard F., Goldenberg D. J., *Arthritis Rheum.*, 1988, **31**, S100.
 Smythe H., *Clin. Rheum. Dis.*, 1979, **5**, 3.
 Smythe H., *Am. J. Med.*, 1986, **81**, 2.
 Wolfe F., Smythe H., Yunus M. B., et al., *Arthritis Rheum.*, 1990, **33**, 160.
 Wolfe F., Simon D. G., Friction J., et al., *J. Rheumatol.*, 1992, **19**, 944.
 Yunus M. B., Masi A. T., Calabro J. J., et al., *Sem. Arthritis Rheum.*, 1981, **11**, 151.
 Yunus M. B., Kalyanraman U. P., *Rheum. Clin. N. Am.*, 1989, **15**, 115.
 Yunus M. B., Ahles T. A., Aldag J. C., Masi A. T., *Arthritis Rheum.*, 1991, **34**, 15.
 Yunus M. B., *J. Rheumatol.*, 1992, **19**, 846.
 Zimmermann M., *Clin. J. Pain*, 1991, **7**, 7.

GIOVANNI BIASI E MAURO GALEAZZI

FINASTERIDE

F. *finastéride*. - I. *finasteride*. - T. *Finasterid*.

Composto a struttura steroidea, la finasteride [f.; N.R.: Proscar; Prostide] inibisce la conversione del testosterone a diidrotestosterone. Benché l'ormone nativo sia capace di agire direttamente su molti tessuti, il diidrotestosterone ne media gli effetti intracellulari e costituisce la forma attiva con cui il testosterone esercita la sua azione a livello prostatico e cutaneo. L'enzima che opera la conversione dell'ormone nativo a diidrotestosterone è la 5 α -reduttasi di cui si conoscono due forme caratterizzate da una omologia del 50%: la prima è localizzata nel fegato e nella pelle; la seconda, oltre che nel fegato, è presente nel tratto urogenitale maschile e nel sistema pilifero della cute sede dei caratteri sessuali secondari maschili. Su questa seconda forma dell'enzima la f. esercita una inibizione 50-100 volte superiore a quella con cui lo stesso farmaco agisce sulla prima.

Il possibile impiego terapeutico di una inibizione della 5 α -reduttasi è stato suggerito dal quadro clinico che caratterizza i soggetti maschili affetti da deficit congenito dell'enzima. La marcata ipotrofia peniena, presente alla nascita insieme alla persistenza di una tasca vaginale, si attenua modestamente alla pubertà nella quale lo sviluppo del sistema pilifero caratteristico del sesso maschile è scarso;

risulta invece normale lo sviluppo a tipo maschile della muscolatura scheletrica e della laringe. Notevole in questi soggetti è l'ipotrofia prostatica e l'assenza delle manifestazioni che frequentemente caratterizzano l'età adulta e senile maschile (ipertrofia prostatica benigna, neoplasie prostatiche, calvizie).

La f., è caratterizzata da buona biodisponibilità per via orale (circa il 60%), da una emivita plasmatica di circa 7 h, da elevato legame con le proteine plasmatiche (90%) e da pressoché totale metabolizzazione a livello epatico. Somministrata alla dose di 0,4-100 mg/die per os, la f. (Proscar®; Prostide®) riduce la concentrazione sierica di diidrotestosterone del 60-80%. La scarsa dose-dipendenza di questo effetto e la non completa inibizione della formazione del derivato diidrogenato viene attribuita all'esistenza di altre forme di 5 α -reduttasi insensibili all'azione del farmaco. D'altra parte in corso di trattamento con f., il testosterone sierico aumenta solo del 10% in quanto esistono altre vie metaboliche di trasformazione dell'ormone. A livello prostatico la caduta del diidrotestosterone indotta dalla f. è più marcata (raggiunge anche valori del 90%) e si associa a un aumento del contenuto in testosterone (in questo l'azione della f. si differenzia dagli effetti della castrazione che riduce il contenuto sia dell'ormone nativo sia del suo derivato diidrogenato).

Nell'ipertrofia prostatica benigna l'efficacia del trattamento con f. è correlata alla severità della patologia prostatica. Nelle forme più blande con scarso o nullo ingrossamento della ghiandola, il confronto con un alfa₁-bloccante (terazosina; v. CATECOLAMINE**) non ha messo in evidenza convincenti effetti della f. (Lepor *et al.*, 1996). Viceversa gli studi clinici controllati condotti su alcune migliaia di soggetti con forme moderate o severe e protratte per periodi anche superiori a un anno, documentano che il trattamento con 5 mg/die di f. attenua la sintomatologia soggettiva e determina una significativa riduzione del volume prostatico e un altrettanto significativo miglioramento dei parametri urodinamici (aumento del flusso massimo di emissione [Rittmaster, 1994]). In uno studio protrattosi per 4 anni, la necessità di un intervento chirurgico o l'insorgenza di una ritenzione urinaria acuta sono state significativamente ridotte dal trattamento con f. (McConnell *et al.*, 1998). V. anche PROSTATA**.

Sul piano degli effetti collaterali, la diminuzione della libido e l'impotenza (osservate nel 4-5% dei casi) indicano che questi fenomeni non sono esclusivamente mediati da un deficit di testosterone. Notevole è la caduta della concentrazione sierica dell'antigene prostatico specifico (PSA) che può anche ridursi del 50%; di conseguenza il livello di PSA da ritenersi nei limiti di norma corrisponde per i soggetti trattati con f. alla metà di quello che si considera fisiologico nei soggetti normali.

L'impiego terapeutico della f. nell'ipertrofia prostatica benigna trova dunque convincenti indicazioni, fra l'altro sostenute dalle favorevoli implicazioni socio-economiche di un più ridotto ricorso a interventi chirurgici. Rimane invece di non facile verifica la ventilata azione preventiva che il trattamento con f. potrebbe esercitare nei confronti dell'ipertrofia e delle neoplasie maligne prostatiche. I dati finora raccolti con la terapia a lungo termine con f. non documentano una diversa incidenza di cancro alla prostata nel gruppo trattato e in quello di controllo.

Restano infine a livello di ipotesi gli impieghi della f. nella terapia dell'acne (ove tuttavia il testosterone sembra svolgere un ruolo determinante), nell'irsutismo e nella calvizie maschile: non si può escludere che in questi campi maggiori possibilità possano ricoprirsi agli inibitori della 5 α -reduttasi di tipo I.

Bibliografia

- Anonimo, *Drug and Therapeutic Bull (DTB)*, 1995, 4, 19-21.
 Hardman J. C., Limbird L. F. eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9 ed., 1996, McGraw-Hill, New York, pp. 1453-1454.
 Lepor H., Williford W. O., Barry M. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, 335, 533-539.
 McConnell J. D., Bruskewitz R., Wals P. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, 557-563.
 Oesterling J. E., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 99-109.
 Rittmaster R. S., *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 120-125.

AMICARE CARPI DE RESMINI

FITORMONI [v. vol. VI, coll. 1696-1700]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2316). - **Auxina** (col. 2316). - **Acido abscissico** (col. 2316). - **Citochinine** (col. 2317). - **Etilene** (col. 2317).

Introduzione

Fatta eccezione per l'*auxina* e l'*ac. abscissico*, che tra tutti i principali fitormoni sono stati identificati nei tessuti delle piante superiori, gli altri sono stati evidenziati grazie ad altre linee di studio. In particolare, la ricerca in fitopatologia ha condotto all'isolamento delle *gibberelline*, gli studi sulle colture cellulari alle *citochinine*, gli effetti del gas illuminante all'*etilene*. Oltre a queste cinque sostanze generalmente considerate come i principali ormoni vegetali, sono oggi considerate sostanze ad attività ormonale anche altri gruppi di composti. Essi comprendono le *poliamine*, i *giasmonati*, l'*ac. salicilico*, i *brassinosteroidi*. Tuttavia, la generalità dei loro effetti su tutte le piante superiori non è stata ancora definitivamente accertata. Una caratteristica generale degli ormoni vegetali è l'assenza di organi specializzati alla loro sintesi, pertanto la loro presenza è riscontrabile in ogni organo della pianta.

Ci si limiterà alla descrizione degli ormoni *ac. abscissico*, *citochinine* ed *etilene*, mentre per le *auxine* e le *gibberelline* si rimanda a quanto precedentemente trattato nella voce della II Edizione (vol. VI, 1696-1700). Per la *auxina* è, tuttavia, necessario un aggiornamento sul suo meccanismo d'azione, oggetto di più recenti ricerche.

Auxina

Meccanismo d'azione. - Il meccanismo attraverso il quale l'*auxina* stimola i diversi effetti fisiologici è stato studiato a livello subcellulare e a livello genico. Mediante l'uso di derivati dell'*auxina* marcati con radioisotopi, è stato possibile isolare proteine leganti *auxina* con possibile funzione recettoriale (Jones, 1994). Il legame dell'ormone a queste proteine porta all'attivazione dell'ATPasi a protone localizzata sulla membrana plasmatica; gli eventi molecolari coinvolti nella trasduzione del segnale primario non sono ancora chiariti. Il conseguente efflusso protonico che ne deriva è responsabile della rapida stimolazione della crescita indotta dall'ormone. Oltre a questi eventi rapidi, l'azione dell'*auxina* può coinvolgere l'attivazione o la repressione di specifici geni. Questa azione più lenta può essere importante nel mantenere la risposta di crescita, oltre che nell'indurre risposte fisiologiche diverse dall'allungamento cellulare.

Acido abscissico

Il nome di questo ormone si deve alla sua presunta implicazione nel fenomeno dell'*abscissione*, cioè al distacco di un organo dal resto della pianta. Tale opinione, sviluppata negli anni '60, non si considera attualmente più valida e l'azione dell'*ac. abscissico* (ABA) si esplica prevalentemente nell'inibizione della crescita e nella chiusura stomatica; più recentemente il suo ruolo è stato accertato anche

nell'accumulo di proteine di riserva di embrioni e nello sviluppo embriogenico dei semi di alcune specie. La struttura chimica dell'ABA mostra la presenza di un atomo di carbonio asimmetrico, che dà origine a due isomeri ottici. In natura, l'ABA è presente come (+)S-ABA: l'enantiomero (–), non naturale, controlla altri tipi di risposte. I due enantiomeri non sono interconvertibili. Inoltre esso mostra anche un'isomeria geometrica e, dei due isomeri *cis* e *trans*, in natura predomina il 2*cis*(+)ABA, che può essere interconvertito al *trans*, che è quasi inattivo.

L'ABA ha una distribuzione ubiquitaria nelle piante vascolari. Esso è stato recentemente trovato anche nel cervello dei mammiferi, dove la sua origine non è stata chiarita.

Biosintesi. – L'ABA è un sesquiterpene e la sua biosintesi deriva dall'ac. mevalonico, specifico precursore dei terpeni. Nonostante la semplicità della sua struttura chimica, i dettagli della via biosintetica sono ancora oscuri e si ritiene oggi che esso derivi dalla degradazione di una xantofilla e quindi dai carotenoidi, piuttosto che da una via alternativa più diretta attraverso il farnesilfosfato (Walton e Li, 1995).

Azione. – Come sopra ricordato, il ruolo fisiologico di questo ormone è in prevalenza quello di inibire processi di crescita e metabolici, quali l'induzione e il mantenimento della dormienza dei semi, l'effetto antagonista alle gibberelline sulla sintesi di α -amilasi nei semi di cereali in germinazione, la crescita di giovani piante. Tuttavia, esso è in grado di controllare anche altri processi in modo non «inibitorio», quali l'induzione della sintesi di proteine di riserva o di proteine da stress termico o salino.

Citochinine

La loro scoperta si deve alla ricerca di Folke Skoog negli anni '40 di sostanze in grado di controllare la proliferazione di tessuti in coltura (v. per rassegne: Miller, 1961; Skoog e Armstrong, 1970). Tra i vari materiali presi in esame, il DNA autoclavato di sperma di pesce era risultato particolarmente attivo ed ha permesso di isolare nel 1955 la prima citochinina, identificata come 6-furfurilaminopurina e denominata *chinetina* (Miller *et al.*, 1955). Essa non è un regolatore di crescita naturale e non è presente come base nel DNA di nessuna specie, essendo un derivato dovuto alla degradazione termica del DNA. La prima citochinina naturale fu scoperta alcuni anni dopo indipendentemente da Miller e da Letham. Letham (1963) ha isolato e identificato dall'endosperma di mais la 6-(4-idrossi-3-metilbut-trans-2-enilamino)purina, che ha denominato *zeatina*. Le citochinine sono presenti anche come ribosidi o ribotidi.

Biosintesi. – La biosintesi delle citochinine avviene mediante modificazione biochimica dell'adenina. Essa avviene nell'apice radicale e nei semi in sviluppo.

Azione. – Le citochinine sono attive nel promuovere la divisione cellulare in cellule in coltura in presenza di auxina e nei tumori della galla del colletto. In tessuti con cellule in rapida divisione esercitano presumibilmente lo stesso ruolo. Esse intervengono nella morfogenesi promuovendo la formazione di gemme e germogli; promuovono l'espansione e ritardano la senescenza delle foglie; stimolano la maturazione dei cloroplasti.

Nonostante siano state isolate proteine leganti citochinine e sia stato riscontrato l'effetto di questi ormoni sull'aumento dei livelli di calcio citosolico, il loro meccanismo d'azione è ancora oscuro.

Etilene

L'etilene è l'unico ormone, nel mondo animale e vegetale, ad essere di natura gassosa. La sua azione fisiologica sulle piante fu infatti scoperta osservando gli effetti del gas usato

nel riscaldamento di serre o laboratori. Oggi esso è considerato uno dei fitoregolatori più importanti e i suoi effetti si esplicano in quasi ogni fase del ciclo della pianta.

Biosintesi. – Il gas etilene (C_2H_4) viene sintetizzato dalla metionina (Lieberman e Mapson, 1964) in molti tessuti della pianta e soprattutto in risposta ad uno stress. L'immediato precursore dell'etilene, l'ac. 1-aminociclopropan-1-carbossilico (ACC), si decompone ad etilene ed altri prodotti attraverso un meccanismo ancora non chiarito, ma che richiede ossigeno. La formazione dell'ACC viene stimolata dall'ormone auxina.

Azione. – La natura gassosa dell'etilene e, quindi, la sua rapida diffusione nella pianta può spiegare molti degli effetti osservati, tra i quali il suo ruolo di segnale in seguito a danno o stress di varia natura. In condizione di anaerobiosi delle radici, ad esempio, si osserva l'epinastia dei peduncoli fogliari, cioè il loro ripiegamento verso terra indotto da etilene. Questo ormone è inoltre in grado di accelerare processi di senescenza di foglie e fiori e la maturazione di frutti, di indurre l'abscissione di fiori e frutti e l'interruzione della dormienza di semi e gemme. Esso inoltre influenza la crescita, inibendola in numerose dicotiledoni e in graminacee oppure promuovendola, come avviene in numerose monocotiledoni come il riso. Un'altro effetto promosso dall'etilene è il controllo dell'apertura dell'uncino, cioè di quella parte del germoglio apicale che nelle piante eziolate si ripiega per evitare danni nell'emergenza dal terreno.

Circa il meccanismo attraverso il quale l'etilene esplicherebbe la sua attività, studi sul suo legame compiuti su varie piante hanno suggerito un modello in cui l'associazione reversibile dell'etilene ad un recettore di membrana darebbe origine ad un secondo messaggero, che attiverebbe le reazioni successive (Sisler e Yang, 1984). L'isolamento di mutanti resistenti specificamente ad etilene (Bleecker *et al.*, 1988) ha consentito di ottenere un sistema sperimentale molto utile per comprendere le basi molecolari dell'azione di questo ormone, tuttora in corso di studio.

Bibliografia

- Bleecker A. B., Estelle M. A., Somerville C. *et al.*, *Science*, 1988, **241**, 1086-1089.
 Jones A. M., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1994, **45**, 393-420.
 Letham D. S., *Life Sci.*, 1963, **8**, 569-573.
 Lieberman M., Mapson L. W., *Nature*, 1964, **204**, 343-345.
 Miller C. O., *Annu. Rev. Pl. Physiol.*, 1961, **12**, 395-408.
 Miller C. O., Skoog F., Saltz M. H. *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1329-1334.
 Sisler E. C., Yang S. F., *BioSci.*, 1984, **34**, 234-238.
 Skoog F., Armstrong D. J., *Annu. Rev. Pl. Physiol.*, 1970, **21**, 359-384.
 Walton D. C., Li Y., *Plant Hormones*, 1955, Kluwer, Dordrecht, pp. 140-157.

PATRIZIA ADUCCI E ALESSANDRO BALLIO

FITOTOSSINE

F. phytotoxines. - *t. phytotoxins.* - *T. Phytotoxine.* - *s. fitotoxinas.*

Con il nome di *fitotossine* [f.] possono intendersi genericamente i metaboliti microbici, enzimi esclusi, che a bassa concentrazione sono capaci di causare un danno alle piante. Pertanto, nell'uso corrente il termine si riferisce a sostanze tossiche per le piante e non a sostanze tossiche prodotte dalle piante.

Numerosi microrganismi fitopatogeni, batteri e funghi, sono capaci di produrre in coltura metaboliti tossici per le piante superiori. Meno frequentemente si può dimostrare la presenza di tali metaboliti nelle piante infette e la loro capacità di riprodurre almeno una parte dei sintomi della

malattia osservati nell'infezione naturale, due condizioni essenziali per poter attribuire alle f. una precisa funzione nella patogenesi.

Già nella seconda metà del secolo scorso erano noti casi in cui sostanze prodotte da microrganismi fitopatogeni davano luogo, in assenza dell'agente patogeno, a sintomi caratteristici della malattia di cui tali microrganismi erano responsabili; ma soltanto una cinquantina di anni or sono qualcuna di queste sostanze è stata isolata e ne sono state caratterizzate la struttura chimica e l'attività nei confronti delle piante. Oggi sono note numerose f., appartenenti a tipi chimici molto diversi fra loro; esse danneggiano la funzionalità delle cellule vegetali con svariati meccanismi. Perciò, analogamente ad altre sostanze naturali biologicamente attive, non è facile elaborare una soddisfacente classificazione delle f.; è consuetudine raggrupparle in base alla specificità della loro azione nei confronti della pianta ospite.

La maggior parte delle f. ha una tossicità che non è limitata all'ospite del patogeno che le produce; esse prendono il nome di f. *non specifiche*, o meglio *non selettive*. Al contrario, si considerano f. *ospite-specifiche*, o meglio *ospite-selettive*, quelle che a basse concentrazioni sono tossiche soltanto per i genotipi o cultivar delle piante ospiti del microrganismo patogeno che le sintetizza; piante resistenti alla malattia non subiscono danno da queste tossine. Appare ovvio ritenere che le tossine ospite-selettive siano autentici determinanti chimici della malattia. Se ne conoscono una quindicina prodotte da funghi, per lo più appartenenti ai generi *Alternaria* e *Cochliobolus*; di molte è nota la struttura chimica. Spesso vengono prodotte come miscele di metaboliti strutturalmente molto simili fra loro. Fra le più interessanti vanno ricordate le tossine prodotte da patotipi diversi di *A. alternata*, patogeni per varie piante da frutto, le tossine HMT, HC e PM, prodotte da funghi responsabili di gravi malattie del mais (le prime due rispettivamente da *C. heterostrophus* razza T e *C. carbonum* razza 1, la terza da *Phyllosticta maydis*), e la vittorina, sintetizzata da *C. victoriae*, patogeno di cultivar di avena (ad es., «Victoria») portanti l'allele dominante nel locus Vb.

Le tossine non selettive costituiscono il gruppo più numeroso di metaboliti microbici fitotossici. La loro complessità molecolare è assai varia; va da composti comuni e semplici come, ad es., l'acido ossalico, a sostanze di elevato peso molecolare (qualche kd) e di complessa struttura chimica. Alcune di esse, oltre allo specifico interesse dovuto al loro possibile ruolo quali fattori di patogenicità o di virulenza nell'interazione ospite-patogeno, possiedono un elevato grado di specificità biochimica, agiscono, cioè, su particolari meccanismi cellulari e si prestano pertanto a chiarire poco conosciuti, o nuovi, capitoli del metabolismo vegetale e talora anche di quello animale. È stato, ad es., recentemente scoperto che la brefeldina A, isolata nel 1958 da colture di *Penicillium decumbens* e successivamente da vari altri funghi, fra i quali ha particolare importanza il patogeno del cartamo *Alternaria carthami*, perturba il complicato processo del traffico intracellulare delle proteine di secrezione dal reticolo endoplasmico all'apparato di Golgi e le loro modificazioni post-traduzionali. Lo studio approfondito degli effetti causati dalla brefeldina A ha consentito di chiarire alcuni aspetti di questi fondamentali meccanismi cellulari negli animali e più recentemente nelle piante.

Alcune f. non specifiche hanno un'azione selettiva sulle ATPasi della membrana plasmatica delle piante e di conseguenza sono state uno strumento di indagine idonea a chiarire alcuni importanti processi fisiologici dei vegetali e talora anche a interpretare le loro basi biochimiche. A questo riguardo meritano di essere ricordate le cebetine e le

beticoline, metaboliti esaciclici clorurati di *Cercospora beticola*, un fungo patogeno della barbabietola da zucchero, che inibiscono la pompa protonica della membrana plasmatica e l'attività fosfolitica della ATPasi. La fusicoccina, il principale principio fitotossico prodotto dall'agente del cancro del pesco e del mandorlo *Phomopsis (Fusicoccum) amygdali*, stimola invece la H⁺-ATPasi della membrana plasmatica attraverso un meccanismo che richiede preliminarmente l'interazione della tossina con recettori specifici, anche essi localizzati nella membrana plasmatica. La tentossina, un tetrapeptide ciclico prodotto da *Alternaria alternata*, un agente di clorosi di varie piante, inattiva la subunità β del componente CF₁ dell'ATPasi dei cloroplasti; per questa proprietà si è fatto ricorso alla tentossina per studi funzionali e biochimici con i cloroplasti. Clorosi è anche causata da varie tossine prodotte da procarioti fitopatogeni; le più studiate sono la coronatina, la faseolotossina, il betalattame della tabtoxina, la tagetitossina, sintetizzate da «pathovars» diversi di *Pseudomonas syringae*, e la rizo-bitossina, isolata originariamente da ceppi di *Bradyrhizobium (Rhizobium) japonicum* e più recentemente da *Pseudomonas andropogonis*. Fra i metaboliti tossici di organismi fitopatogeni appartenenti al genere *Pseudomonas* ne sono stati individuati alcuni che danno luogo a necrosi (siringomicine, siringotossine, siringostatine, siringopeptine, pseudomicine, tolaasine) ed altri capaci di creare anomalie nella crescita delle piante ospiti (ad es., iperplasie); i metaboliti responsabili di questi ultimi effetti corrispondono in qualche caso a fitormoni noti (auxine, citochinine) prodotti in quantità eccessiva, o a nuovi derivati di fitormoni (v.; v.**).

Le proprietà biologiche delle f. non riguardano sempre in modo esclusivo il mondo delle piante superiori. Talune sostanze possiedono spiccata attività antibiotica (ad es., siringomicine e simili), tanto da farne intravedere l'utilizzazione nella lotta biologica contro fitopatie o nella terapia di micosi in campo animale; altre viceversa costituiscono pericolosi inquinanti di alimenti deteriorati da microrganismi, sono cioè anche micotossine (v. IX, 1180) attive contro gli animali. Qualche f., specialmente se rappresenta un fattore di patogenicità o di virulenza, ha trovato applicazione utile nella selezione di piante resistenti nei programmi di miglioramento genetico; qualche altra (fusicoccina) è utilizzabile per interrompere la dormienza di alcuni semi e quindi promuoverne la germinazione. Possibili applicazioni in agricoltura quali erbicidi sono state tentate per le f. prodotte da microrganismi patogeni di piante infestanti.

Bibliografia

- Ballio A., Graniti A., *Experientia*, 1991, 47, 751.
 Durbin R. D. ed., *Toxins in Plant Diseases*, 1981, Academic Press, New York.
 Graniti A., Durbin R. D., Ballio A. eds., *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*, 1989, Springer-Verlag, Berlin.
 Kohmoto K., Yoder O. C. eds., *Host-specific Toxin: Biosynthesis, Receptor and Molecular Biology*, 1994, Tottori (Giappone).
 Marrè E., *Progress in Phytochemistry*, 1980, 6, 253.
 Wood R. K. S., Ballio A., Graniti A. eds., *Phytotoxins in Plant Diseases*, 1972, Academic Press, London.
 Yoder O. C., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1980, 18, 103.

PATRIZIA ADUCCI E ALESSANDRO BALLIO

FITTIZI DISTURBI

1. factitious disorders.

Il disturbo fittizio [d.f.] viene descritto dal DSM-IV, il manuale internazionale sulla classificazione delle malattie mentali (IV ed.), come un quadro psicopatologico caratterizzato da: a) simulazione o produzione intenzionale di segni o sintomi fisici o psicologici; b) la motivazione di tale com-

portamento è quella di assumere il ruolo di malato; c) mancano incentivi esterni che favoriscano il comportamento in questione (ad es. profitto economico, evitare responsabilità legali o migliorare il benessere fisico come nella *simulazione*; v. SIMULAZIONE E MALATTIE SIMULATE). Il d.f. sarebbe più frequente nel sesso maschile ed esordirebbe soprattutto nell'adulto giovane; non si hanno dati certi sulla sua incidenza nella popolazione. Lo si evidenzerebbe con maggior frequenza tra coloro che svolgono occupazioni in ambito sanitario e tra quanti sono stati ricoverati in ospedale nella loro infanzia per una reale patologia. Tra i criteri che il DSM-IV indica come meritevoli di ulteriori approfondimenti vi è il cosiddetto *disturbo fittizio per procura* nel quale il disturbo viene indotto da una persona in un'altra che essa ha in cura (comunemente dalla madre in un figlio piccolo) sempre con lo scopo, comunque, di entrare nel «ruolo di malato».

La presenza di sintomi o segni fisici può essere, in taluni casi, predominante (v. MUNCHAUSEN, SINDROME DI*); in altri sono i sintomi e segni psicologici quelli salienti; in altri ancora sintomi e segni fisici e psicologici possono coesistere.

La presenza di una componente psichica nel quadro clinico è costituita spesso da una sintomatologia psicotica. Non infrequente è anche una condizione di pseudodemenza (il paziente sembra cioè manifestare un decadimento nelle funzioni intellettive piuttosto simile a quello di una demenza tipica). Tuttavia un esame attento evidenzierà delle differenze rispetto al disturbo originale (in pratica il soggetto riproduce una patologia psichica secondo i criteri che, per lui, la contraddistinguono). La sintomatologia apparirà quindi «atipica» e lo stesso potrà osservarsi per il decorso o per la risposta terapeutica. Comune è l'accentuarsi del disturbo allorché il paziente sa di essere visto dal medico. A volte il soggetto può assumere sostanze psicoattive per fornire maggiore credibilità attraverso sintomi espliciti (allucinazioni, insonnia, euforia, etc.).

Il paziente con disturbo fittizio è comunemente evasivo (a volte non collaborativo o addirittura negativistico) all'intervista da parte del medico, anche se potrà descrivere i suoi disturbi con grande drammaticità utilizzando, in certi casi, una vera e propria terminologia medica. Possono esservi risposte di traverso (ossia vicine ma non coincidenti con risposte corrette: ad es. $6 + 7 = 12$). Tutto ciò può condurre a una vera e propria *pseudologia fantastica* (ovvero una storia costruita mediante il sovrapporsi di aspetti realistici ad un fondo in cui domina l'immaginazione). Quando questi soggetti vengono ad un certo punto messi a confronto con la «falsità» della loro sintomatologia, si registra una reazione indignata di diniego oppure un altrettanto perentorio auto-allontanamento dall'ospedale (nel caso di pazienti ricoverati) attraverso una dimissione contro il parere dei sanitari. Comune è poi il ritrovare questi soggetti nuovamente ospedalizzati in altri reparti o nosocomi, anche di città o regioni diverse da quelle di appartenenza.

Una diagnosi differenziale andrebbe posta con un disturbo reale: abbiamo visto sopra, a tal proposito, quali possano essere gli elementi distintivi. Rispetto alla *simulazione* è qui assente la presenza di un incentivo esterno (criterio C secondo il DSM-IV).

La terapia di questo disturbo è resa difficile proprio dalla tendenza del paziente a sottrarsi ad ogni intervento curativo che si fondi sul riconoscimento del disturbo come psichico. Al trattamento si giunge talora a seguito di segnalazioni da parte di medici di diversa specializzazione che hanno richiesto una consulenza psichiatrica o psicologica sul paziente. Il ricovero in ambito psichiatrico può essere utile e sarà soprattutto importante se punto di partenza di

un più articolato e successivo intervento di tipo psicoterapico.

Indubitabile la presenza di una relazione con tratti masochistici, desiderio di intimità, conflitti relativi alla dipendenza. Vanno posti in primo piano, in simili casi, da parte dei terapeuti, i sentimenti controtransferali che i pazienti determinano (disprezzo, tradimento, ostilità, sconcerto). I sintomi «fittizi» sono in realtà il mezzo col quale i pazienti trasmettono la loro comunicazione di malattia e la relativa richiesta di aiuto.

Possono impiegarsi proficuamente sia la psicoterapia individuale che quella di gruppo ad indirizzo analitico. La psicoterapia può essere coadiuvata da una presa in carico di tipo socio-assistenziale diretta a chiarire e migliorare i rapporti inter-personali in ambito familiare e di lavoro. Il ricorso ai farmaci è consigliato solo se coesiste un disturbo psichico effettivo (cosa non rara a verificarsi *in itinere*).

In assenza di un intervento curativo l'evoluzione verso la cronicità è comune con abituale compromissione delle capacità lavorative dati i lunghi ricoveri. Una prognosi più favorevole si avrebbe in quanti posseggono una struttura di personalità depressivo-masochistica, una struttura *border-line* di funzionamento psichico o una componente, seppur limitata, riconducibile a un disturbo antisociale di personalità.

Bibliografia

- AA. VV., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV)*, 1994, American Psychiatric Association, Washington.
 AA. VV., *Factitious Disorders*, in Kaplan H. I., Sadock B. J., Grebb J. A. eds., *Synopsis of Psychiatry*, 1994, Williams & Wilkins, Baltimore.
 Gabrielli F., *Disturbi fittizi*, in AA. VV. eds., *Trattato Italiano di Psichiatria*, 1992, Masson Italia, Milano.

MAURIZIO BUCCA

FK-506 (TACROLIMUS): v. FK-506* (*3244-3245).

FLAVIVIRUS

La famiglia *Flaviviridae* è stata separata dagli alfavirus, una volta classificati nella famiglia *Togaviridae* (v. TOGAVIRUS*) insieme con i flavivirus [f.], perché, nonostante numerose somiglianze fra i due gruppi virali dal punto di vista ecologico, epidemiologico e della struttura e biologia dei virioni, essi differiscono nettamente nella organizzazione e nei meccanismi di espressione del genoma virale. Come negli alfavirus il genoma dei f. è una molecola di RNA monocatenario a polarità positiva, composto di circa 11.000 nucleotidi. Però non è poliadenilato alla terminazione 3' e l'organizzazione genomica è opposta a quella degli alfavirus con le proteine strutturali codificate dalla regione 5' e le proteine non strutturali codificate dalla regione 3' dell'RNA virale. Inoltre, nell'espressione del genoma virale non si forma un RNA messaggero subgenomico, mentre l'unico messaggero è costituito dal genoma virale stesso che contiene per tutta la sua lunghezza un singolo e ininterrotto ordine di lettura il quale viene tradotto in una sola grande poliproteina. La poliproteina virale in una sua porzione possiede attività proteasica. Perciò, con la cooperazione di proteasi cellulari, si autodigerisce per dare luogo alla formazione delle sette proteine non strutturali e delle tre proteine strutturali.

La famiglia *Flaviviridae* comprende più di 70 virus, circa 50 dei quali sono trasmessi da artropodi (zanzare e zecche) e appartengono perciò anche al gruppo degli arbovirus (v. v.*). Molti f. sono patogeni per l'uomo (tab. I) e per altri vertebrati. Fra essi si trovano agenti di gravi malattie umane ampiamente diffuse in tutto il mondo. Generalmente le ma-

TAB. I. PRINCIPALI FLAVIVIRUS PATOGENI PER L'UOMO

Virus	Distribuzione geografica	Vettore e quadro clinico
Febbre gialla	Africa O e C, America S e C	Zanzare-Febbre, congestione e stasi ematica, emorragie, itterizia
Dengue	Asia S e SE, Isole del Pacifico, Nuova Guinea, Caraibi, America S, Africa O	Zanzare-Cefalea, artralgie, eritema, linfadenopatie, emorragie, shock emodinamico
Encefalite Giapponese	Asia E, SE e S, Pacifico O	Zanzare-Encefalite
Encefalite di Saint Louis	America N, Panama, Giamaica, Trinidad, Brasile, Argentina	Zanzare-Encefalite
Valle Murray	Australia, Nuova Guinea	Zanzare-Encefalite
Kunjin	Australia, Sarawak	Zanzare-Encefalite
Rocio	Brasile	Zanzare-Encefalite
Nilo Occidentale	Africa E, O e S, Asia S e SE, India, Mediterraneo	Zanzare-Encefalite
Encefalite dell'ovest	Europa dalla Scandinavia ai Balcani e dalla Germania alla Russia O	Zecche-Encefalite
Encefalite dell'est	Russia E, occasionalmente Russia O e Cecoslovacchia	Zecche-Encefalite
Louping-ill	Isole britanniche	Zecche-Encefalite
Powassan	USA e Canada	Zecche-Encefalite
Negishi	Giappone	Zecche-Encefalite
Foresta di Kyasanur	India, Mysore	Zecche-Febbre emorragica
Omsk	Russia C	Zecche-Febbre emorragica
Epatite C	Europa, USA	Senza artropode vettore-Epatite

N = nord; S = sud; E = est; O = ovest; C = centrale

lattie sostenute da f. trasmessi da zanzare sono più comuni nelle regioni equatoriali e tropicali, mentre le malattie determinate da f. trasmessi da zecche prevalgono nelle regioni temperate. Fra le prime ricordiamo la febbre gialla (v.) che impartisce il nome alla famiglia, la dengue (v.; v.*) e le encefaliti (giapponese, di Saint Louis e della Valle Murray); fra le seconde si annoverano una serie di encefaliti (encefalite dell'est o russa, encefalite dell'ovest o dell'Europa centrale, Louping-ill, Powassan e Negishi) e le febbri emorragiche (malattia della foresta di Kyasanur e febbre emorragica di Omsk) (v. FEBBRI EMORRAGICHE VIRALI*). È opportuno notare che due malattie determinate da f. trasmessi da zanzare, cioè la febbre gialla e la dengue, possono produrre una grave sindrome emorragica. Nel caso della dengue essa si associa talvolta a un severo shock emodinamico, probabilmente a patogenesi allergica per formazione di immunocomplessi. La diagnosi delle malattie da f. è affidata all'isolamento del virus e alla ricerca degli anticorpi con reazioni di neutralizzazione, fissazione del complemento, inibizione dell'emoagglutinazione e con saggi immunoenzimatici e radioimmunologici.

Il virus dell'epatite C

Alla famiglia *Flaviviridae* appartiene il virus dell'epatite C (HCV; v. EPATITE DA VIRUS**, coll. **2008-2017). In realtà il virus non è ancora stato isolato né osservato con sicurezza al microscopio elettronico. Ma il suo genoma è stato clonato dal sangue di scimpanzé inoculati con il siero di individui infetti. Si tratta di una molecola di RNA monocatenario di circa 9400 nucleotidi a polarità positiva, cioè con l'orientamento dell'RNA messaggero e con un ordinamento genico caratteristico del f. L'sso codifica infatti per tre proteine strutturali e cinque proteine non strutturali che derivano, in seguito a taglio post-traduzionale, dalla traduzione di un unico grande polipeptide di circa 3000 aminoacidi. L'analisi

con reazione polimerasica a catena (PCR) del genoma di HCV in diverse parti del mondo ha indicato una notevole eterogeneità nella sequenza nucleotidica e l'esistenza di almeno una dozzina di genotipi.

Poco si conosce del ciclo replicativo virale, poiché non esiste un sistema di cellule in coltura dove il virus possa essere coltivato. La replicazione virale probabilmente si sviluppa nel citoplasma poiché cospicue inclusioni citoplasmatiche si osservano al microscopio elettronico negli epatociti degli scimpanzé infettati sperimentalmente. Lo studio dei tessuti di pazienti per la ricerca degli antigeni virali con immunofluorescenza e dell'RNA virale con ibridazione *in situ* ha dimostrato che il virus è presente non solo nel fegato ma anche in altri organi, soprattutto nei linfociti periferici e negli organi linfoidi. La localizzazione extraepatica e il linfotropismo del virus hanno importanti implicazioni, come la possibilità di reinfezione endogena del fegato trapiantato in pazienti cirrotici e l'evidenza recente che l'HCV possa essere associato ai linfomi. La trasmissione di HCV avviene per via parenterale tramite sangue contaminato e i pazienti più a rischio sono i politrasfusi, gli emofili e i tossicodipendenti. La maggior parte di questi ultimi sono infetti. Circa la metà dei pazienti infettati da HCV però non rientra in queste tre categorie. Perciò devono esistere altre vie di trasmissione dell'infezione, come suggerisce il fatto che HCV possa essere presente nelle secrezioni vaginali e nella saliva. Tuttavia la trasmissione per via sessuale non sembra essere così importante come per il virus dell'epatite B (HBV) (v. EPATITE DA VIRUS**, col. **2003), così come sembra essere relativamente poco frequente la trasmissione transplacentare e perinatale. La ragione di queste differenze probabilmente risiede nella più bassa carica virale di HCV rispetto ad HBV nel sangue degli individui infetti. Il periodo di incubazione dell'epatite C varia generalmente da 6 a 12 settimane anche se può prolungarsi fino a qualche

mezzo. Circa il 75% delle infezioni sono asintomatiche e il quadro clinico è generalmente meno severo dell'epatite B.

Tuttavia l'epatite da HCV cronicizza molto più frequentemente dell'epatite da HBV. Almeno il 50% di tutti i pazienti con epatite C rimane continuamente o intermittentemente viremico per anni e il 20% di questi progredisce verso l'epatite cronica attiva e la cirrosi. Vi è anche una chiara correlazione fra l'infezione cronica da HCV e il carcinoma epatocellulare primario. Infatti più del 90% dei casi di carcinoma epatocellulare negativi per HBV sono positivi per HCV. Il meccanismo dell'oncogenicità di HCV non è chiaro. Probabilmente è un meccanismo indiretto correlato alle alterazioni cromosomiche e alle mutazioni che compaiono durante il processo di intensa proliferazione degli epatociti associato alla rigenerazione post-cirrotica. Non è escluso però un intervento diretto del virus nel processo neoplastico, poiché è stato scoperto che la proteina virale capsidica è un fattore trascrizionale e potrebbe perciò attivare la trascrizione di oncogeni cellulari che favorirebbero la proliferazione degli epatociti. Un ruolo diretto di HCV nella carcinogenesi sarebbe sostenuto da osservazioni recenti che dimostrano l'evoluzione dell'infezione da HCV verso l'epatocarcinoma senza una fase intermedia di cirrosi.

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da HCV si basa sulla ricerca degli anticorpi antivirali nel siero, utilizzando antigeni ricombinanti in saggi immunoenzimatici. Il test più sensibile è la ricerca dell'RNA virale nel siero con PCR che può però fallire nell'individuazione di alcuni portatori cronici per l'andamento fluttuante della viremia.

Recentemente sono stati scoperti due nuovi f.: il primo è il virus GB (GVB; dalle iniziali di un paziente itterico), un nuovo agente di epatite non-A-non-E, che è costituito da più varianti (GBV-A; GBV-B; GBV-C [Simons *et al.*, 1995]); poi è stato scoperto il virus G (HGV; *Hepatitis G Virus* [Linnen *et al.*, 1996]) che con molta verosimiglianza è lo stesso GBV-C. Questi virus hanno una sequenza genomica correlata ai f., ma limitatamente omologa alla sequenza di HCV (*Hepatitis C Virus*). Il virus HGV potrebbe essere responsabile di quel 10-20% di casi di epatite da virus attualmente cosiddetti non-A-non-E, cioè non-A, non-B, non-C, non-D, non-E. V. EPATITE DA VIRUS**, col. **2025.

Bibliografia

- Bradley D. W., *Semin. Virol.*, 1993, 4, 269-282.
 Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., *Microbiology*, 1990, Lippincott, Philadelphia.
 Fields B. N., ed., *Virology*, 1996, Raven, New York, pp. 931-959.
 Linnen J. *et al.*, *Science*, 1996, 271, 505-508.
 Plageman P. G. W., *Arch. Virol.*, 1991, 120, 165-180.
 Reyes G., Baroudy B. M., *Adv. Virus Res.*, 1991, 40, 57-102.
 Schlesinger S., Schlesinger M. J. eds., *The Togaviruses and Flaviviruses*, 1986, Plenum, New York.
 Simons J. N., Leary T. P. *et al.*, *Nature Medicine*, 1995, 1, 564-569.
 White D. O., Fenner F. J., *Medical Virology*, 1994, Academic, New York.
 Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., *Principles and Practice of Clinical Virology*, 1990, Wiley, New York.

GIUSEPPE BARBANTI-BRODANO

FLOXURIDINA

I. *floxuridine*.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2325) - **Farmacocinetica** (col. 2326) - **Farmacodinamica** (col. 2326) - **Esperienze terapeutiche** (col. 2327): *Metastasi epatiche da carcinoma del colon*. - **Altre applicazioni**. - **Tossicità** (col. 2328) - **Conclusioni** (col. 2329).

Introduzione

La floxuridina [f.], conosciuta anche come FUDR[®], è una fluoro-pirimidina, con struttura e funzione simili a quelle

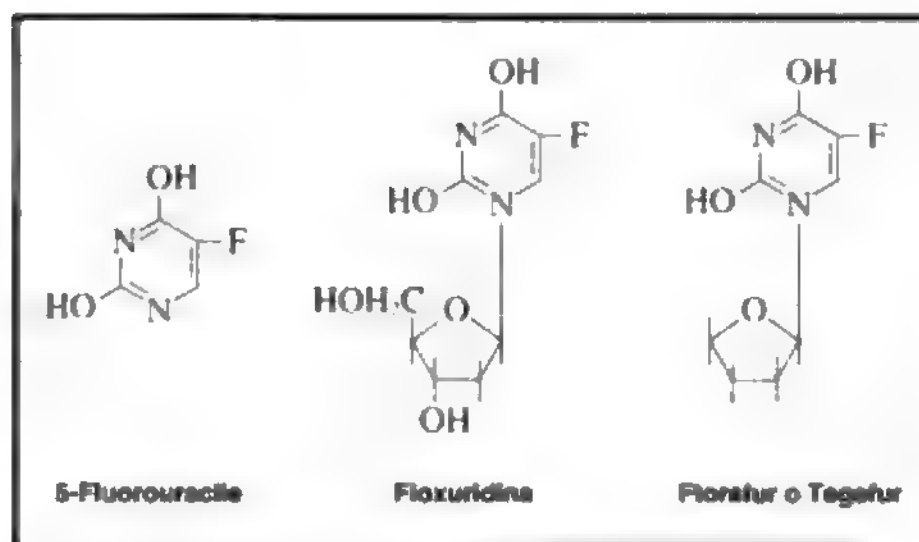


Fig. 1. Struttura delle 5-fluoropirimidine usate in clinica.

del suo pro-farmaco, il 5-Fluorouracile (5-FU) (Karnofsky e Young, 1967). Chimicamente si tratta di una 5-fluoro-2'-deossiridina ($C_9H_8FN_2O_4$) (fig. 1).

Insieme al 5-fluorouracile e ad altri composti costituisce il gruppo degli analoghi delle pirimidine. Questa classe di farmaci ha in comune la capacità di inibire la biosintesi dei nucleotidi pirimidinici o di sostituirsi ad essi e di interferire con la sintesi e la funzione degli acidi nucleici, bloccando, in definitiva, le funzioni vitali della cellula.

La rapida degradazione del farmaco ha limitato il suo uso per via endovenosa, favorendone l'impiego intra-arterioso nelle neoplasie gastro-intestinali avanzate.

Farmacocinetica

Dopo l'iniezione in bolo di alte dosi la f. è convertita in 5-fluorouracile, mentre dopo l'iniezione di piccole dosi (ad es. infusione continua) viene metabolizzata nel metabolita attivo monofosforilato, il 5-fluoro-2'-deossiridin-5'-monofosfato (FdUMP). Il FdUMP si lega alla timidilato sintetasi inibendola.

La f. è scarsamente assorbita per via orale. Dopo somministrazione endovenosa circa il 29% della dose è escreta per via renale sotto forma di metaboliti inattivi (Clarkson *et al.*, 1964). Alla dose di 30 mg/kg in 1 minuto per via endovenosa, le alte concentrazioni plasmatiche iniziali sono seguite da una emivita di eliminazione di circa 15 minuti (Clarkson *et al.*, 1964).

Sia la f. che il 5-FU sono metabolizzati nel fegato (Mukherjee *et al.*, 1963). Dopo infusione in arteria epatica la frazione di estrazione della f. è molto alta (0,69-0,72) paragonata a quella del 5-FU (0,22-0,45). Perciò, quando somministrati in arteria epatica, fino al 92% della f. e dal 22 al 45% del 5-FU sono rimossi dal sangue al primo passaggio attraverso il fegato. Di conseguenza, i livelli venosi periferici di f. dopo infusione arteriosa sono un quarto di quelli ottenuti dopo somministrazione endovenosa (Ensminger *et al.*, 1978). Ciò spiega la ridotta tossicità sistemica spesso riportata per la f. somministrata in arteria epatica (Sullivan e Miller, 1965) e la possibile aumentata tossicità della prolungata infusione endovenosa periferica (De Conti *et al.*, 1973).

Infine, i prodotti metabolici delle fluoro-pirimidine sono largamente escreti attraverso i polmoni come CO_2 (circa il 60%), mentre la frazione eliminata con le urine probabilmente varia tra 10 e 30% nelle 24 ore.

Farmacodinamica

La f. è un agente citotossico fase-specifico. Essa, infatti, agisce specificamente sulla fase S, bloccando il processo di sintesi del DNA. Inoltre, i suoi metaboliti fosforilati possono interrompere anche la sintesi di RNA, portando a morte la cellula.

Le fluoro-pirimidine per esercitare il loro effetto citotossico richiedono l'attivazione intracellulare. Le forme citotossiche attive provengono dalla conversione dei composti attraverso varie vie biochimiche (fig. 2). Quella che riguarda la f. origina dal 5-FU, che è convertito in f. dalla timidina-fosforilasi. Successivamente la f.

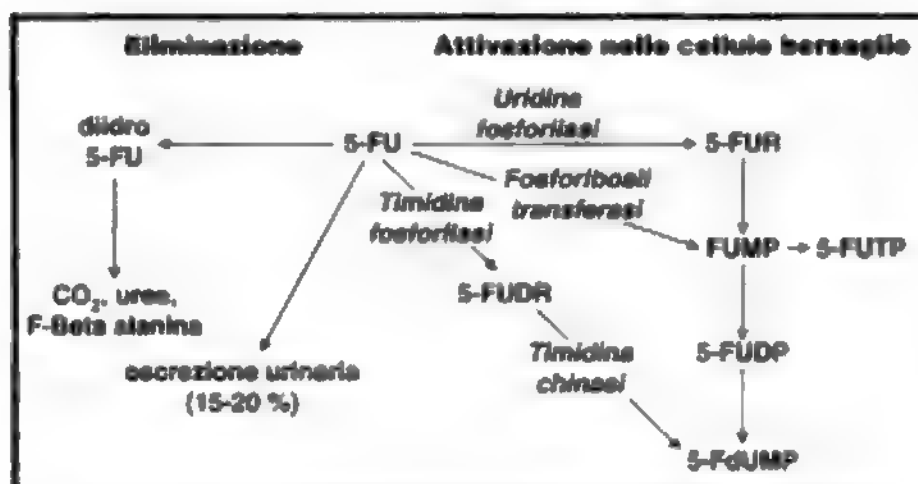


Fig. 2. Vie di eliminazione e di attivazione del 5-fluorouracile.

viene fosforilata dalla timidina-chinasi in FdUMP. In presenza del folato ridotto, il 5,10-metiltetraidrofolato, il FdUMP forma un legame covalente stabile con la timidilato-sintetasi inibendone l'attività e portando ad una deplezione della deossi-timidina-trifosfato (dTTP), un precursore necessario per la sintesi del DNA.

La somministrazione intrarteriosa è permessa da un catetere posizionato chirurgicamente nell'arteria più grande che irrori un determinato tumore (ad es. nel fegato, nella testa e collo, nella colecisti, etc.). Mediante l'uso di varie pompe d'infusione possono essere ottenuti dei flussi molto bassi che permettono la liberazione di dosi di farmaco pari a 0,1-0,6 mg/kg/24 ore. Alla f. infusa è aggiunta eparina (10.000 U/50 ml di soluzione) per prevenire l'ostruzione trombotica del catetere (Seiter *et al.*, 1992). Il catetere può rimanere in sede per settimane o mesi e, generalmente, il trattamento dura da una a sei settimane, con l'infusione continua di una soluzione salina eparinizzata tra i cicli di terapia.

Le dosi intrarteriose di f. variano da 0,1 a 0,6 mg/kg/die per 1-6 settimane. Le dosi più alte variano da 0,4 a 0,6 mg/kg/die e vengono utilizzate nella somministrazione in arteria epatica. In genere la terapia viene continuata per almeno due settimane o fino alla comparsa di rilevanti effetti tossici.

La f. è stata anche somministrata per via endovenosa, nonostante tale uso non sia raccomandato dalla casa produttrice. Nella somministrazione in vena è consigliata la diluizione del farmaco in 500 o 1000 ml di soluzione glicosata al 5% o soluzione fisiologica, con somministrazione continua di 24 ore per molti giorni per ciclo (Sullivan e Miller, 1965). Le dosi variano da 0,5 a 1,0 mg/kg/die da 6 a 15 giorni in infusione continua, ma sono stati utilizzati anche schemi di somministrazione in boli giornalieri per 5 giorni consecutivi, come induzione, e boli giornalieri a giorni alterni, come terapia di mantenimento, fino alla comparsa di ricadute o di effetti tossici.

Esperienze terapeutiche

Metastasi epatiche da carcinoma del colon

Il carcinoma del colon-retto rappresenta attualmente una delle principali cause di morte per cancro nei paesi industrializzati. Nel 18% dei casi esso si presenta con metastasi epatiche già alla diagnosi. Nella metà di questi casi il fegato è l'unico organo metastatizzato. In quest'ultima eventualità la f. si pone come farmaco antitumorale d'elezione, poiché l'elevata estrazione epatica di primo passaggio (95%) si traduce nella possibilità di utilizzare dosi molto elevate con scarsi effetti collaterali.

I risultati di molti studi clinici randomizzati hanno dimostrato che la somministrazione di f. in arteria epatica, confrontata con la somministrazione di fluoro-pirimidine per via endovenosa, aumenta la probabilità di risposta del tumore, anche se non è ancora chiaro se ciò si traduca in un aumento della sopravvivenza totale. Negli ultimi 30 anni sono stati condotti molti studi clinici di fase I e II, che hanno valutato l'infusione intra-arteriosa di 5-FU e f. Sebbene si siano ottenute risposte fino all'83%, non è stato possibile dimostrare corrispondenti aumenti della sopravvivenza (Hohn *et al.*, 1989).

Quando la somministrazione intrarteriosa di f. è stata confrontata con la chemioterapia sistemica con f. o 5-FU per via endovenosa, è stato osservato un netto vantaggio sulla percentuale di risposta (41% verso 14%), ma nessun vantaggio sulla sopravvivenza globale (Meta-Analysis Group in Cancer, 1996).

L'analisi dei dati di 6 studi prospettici randomizzati che hanno confrontato la chemioterapia intrarteriosa con f. con la chemioterapia sistemica hanno mostrato un aumento della sopravvivenza a favore dell'intrarteriosa del 13% ad un anno e dell'8% a due anni (Harmantas *et al.*, 1996). Tali percentuali sono ancora troppo piccole per affermare che vi sia un reale beneficio sulla sopravvivenza globale nei pazienti trattati con f. intrarteriosa rispetto a quelli trattati con fluoro-pirimidine per via sistemica. Tuttavia, esse confermano la tendenza mostrata dagli altri studi, verso un miglioramento della sopravvivenza.

L'infusione intrarteriosa si associa ad una minima tossicità sistemica, ma esiste un significativo rischio di sclerosi dei vasi biliari (colangite sclerosante) se questa via viene usata per molti cicli di terapia (Kemeny *et al.*, 1987; Hohn *et al.*, 1985). La sclerosi biliare viene ritenuta una forma di tossicità dose-limitante per la f. È stato dimostrato che 0,3 mg/kg/die in infusione intrarteriosa continua rappresenta la dose massima di sicurezza in relazione alla comparsa di sclerosi biliare (Andrews *et al.*, 1991).

Altre applicazioni

La f. è stata utilizzata nel trattamento del carcinoma renale metastatico (Baicocchi *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1993; Conroy *et al.*, 1993) dove ha dimostrato di essere attiva, pur senza alcun vantaggio sulla sopravvivenza. Oltre alla somministrazione endovenosa continua di dosi costanti nelle 24 ore, sono state valutate somministrazioni endovenose cosiddette circadiane, cioè infusioni di dosi di farmaco variabili nel corso delle 24 ore, onde prevenire o ridurre la tossicità. Le percentuali di risposta sono risultate equivalenti (Von Roemeling *et al.*, 1988).

L'associazione con l'interferone alfa 2B ha mostrato sinergismo d'azione (Falcone *et al.*, 1993), ma sono necessari ulteriori studi per dimostrare se l'interferone alfa ha aggiunto qualcosa alla f. o viceversa.

Per via intraperitoneale la f. è stata valutata, in via sperimentale, nel trattamento delle neoplasie ovariche e gastrointestinali, in studi di fase I, II e III (Israel, 1995). In qualche caso sono state ottenute risposte obiettive, in pazienti con versamento maligno (Clarkson *et al.*, 1964).

Tossicità

Il principale effetto collaterale della f. infusa per via intrarteriosa è rappresentato dalla colangite sclerosante. Tale complicazione è stata osservata fino al 50% dei pazienti trattati (Kemeny *et al.*, 1987) e spesso ha determinato l'interruzione prematura della terapia. Sembra che la colangite derivi da un effetto tossico diretto della f. sui vasi biliari piuttosto che a metaboliti del farmaco escreti nella bile (Andrews *et al.*, 1991).

Altra importante complicanza è l'ulcera gastrica, osservata nel 17% dei casi. Questa, tuttavia, è prevenibile con l'uso di accurate tecniche chirurgiche nel posizionamento del catetere in arteria epatica.

La f. è mielotossica, potendo pertanto causare una riduzione anche marcata dei globuli bianchi e dei granulociti neutrofili, esponendo così il paziente ad un rischio elevato di infezione. Può poi provocare mucositi (10% dei casi) e danni organo-specifici, in relazione all'arteria in cui viene infusa.

Il danno epatico, che può insorgere dopo l'infusione in arteria epatica, può manifestarsi con alterazioni dei parametri di laboratorio, come un aumento della latticodeidrogenasi (LDH), della fosfatasi alcalina, delle transaminasi e, raramente, della bilirubina.

Le complicanze possono, infine, essere legate al prolungato uso del catetere intrarterioso. Così possono manifestarsi emorragie, trombosi, embolie, ostruzione ed infezione del catetere.

Le dosi di f. dovrebbero essere ridotte di fronte ad un paziente con storia di irradiazione con alte dosi della regione pelvica, con pregressa chemioterapia con agenti alchilanti, con anormale funzione renale e, specialmente, con anormale funzione epatica.

La mielosoppressione da f., più evidente con la somministrazione endovenosa che con l'intrarteriosa (Curreri e Ansfield, 1959; Ansfield e Curreri, 1960), è generalmente comparabile a quella osservata col 5-FU. La leucopenia è l'effetto più frequente. La trombocitopenia è rara. L'anemia può essere osservata dopo molti cicli di terapia in pazienti pesantemente pretrattati.

Con la f. è possibile osservare anche effetti tossici gastrointestinali, come nausea, vomito, anoressia, crampi addominali. Diarrea grave è stata osservata raramente dopo infusione endovenosa continua (Kemeny *et al.*, 1987). Questo è un classico effetto dose-limitante delle infusioni prolungate e di solito necessita dell'immediata riduzione di dose. Altro effetto che può condizionare la riduzione di dose o, addirittura, la sospensione del trattamento è la mucosite, che in genere si manifesta con stomatite.

Alopecia, edema, dermatiti, eruzioni eritematose cutanee, prurito e iperpigmentazione delle vene, sono effetti riportati raramente.

Infrequentemente sono stati notati effetti sul sistema nervoso centrale, come offuscamento del visus, depressione, vertigini e sonnolenza. Tali effetti possono comparire sia in acuto che dopo vari mesi e in genere non esiste terapia specifica. Fortunatamente essi tendono a regredire spontaneamente con l'interruzione del trattamento.

Conclusioni

La f. rappresenta un farmaco molto promettente per la cura delle metastasi epatiche da carcinoma del colon. Tuttavia, agli incoraggianti risultati ottenuti in termini di risposte tumorali (regressioni complete e parziali) non è attualmente possibile affiancare altrettanti miglioramenti in termini di prolungamento della sopravvivenza.

In aggiunta a ciò vanno considerati gli alti costi e le difficoltà tecniche che il trattamento intrarterioso comporta. Né vanno sottovalutati, infine, gli effetti tossici del farmaco, sia pure inferiori a quelli della somministrazione endovenosa.

Pertanto, occorre che un numero sempre maggiore di pazienti venga arruolato in studi clinici randomizzati, che confrontino i risultati dell'uso della f. intrarteriosa con quello di altri farmaci citotossici nel carcinoma del colon metastatico al fegato.

Bibliografia

- Andrews J. C., Kuntsen C., Terio P. *et al.*, *Invest. Radiol.*, 1991, **26**, 461-464.
 Ansfield F. J., Curreri A. R., *Cancer Chemother. Rep.*, 1960, **6**, 21-25.
 Baiocchi C., Landonio G., Cacioppo C. *et al.*, *Tumori*, 1996, **82**, 225-227.
 Clarkson B., O'Connor A., Winston L. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1964, **5**, 581.
 Conroy T., Geoffrois L., Guillemin F. *et al.*, *Cancer*, 1993, **72**, 2190-2197.
 Curreri A. R., Ansfield F., *Cancer Chemother. Rep.*, 1959, **2**, 8-11.

- De Conti R. C., Cohen I. S., Mosher M. B. *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 1973, **107** (4), 553-555.
 Ensminger W. D., Rosowsky A., Raso V. *et al.*, *Cancer Res.*, 1978, **38**, 3784-3792.
 Falcone A., Cianci C., Ricci S. *et al.*, *Cancer*, 1993, **72**, 564-568.
 Harmantas A., Rotstein L. E., Langer B., *Cancer*, 1996, **78**, 1639-1645.
 Hohn D. C., Stagg R. J., Friedman M. A. *et al.*, *J. Clin. Onc.*, 1989, **7**, 1646-1654.
 Hohn D. C., Stagg R. J., Price D. C. *et al.*, *J. Clin. Onc.*, 1985, **3**, 1257-1260.
 Israel V. K., Jiang C., Muggia F. M. *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1995, **37**, 32-38.
 Karnofsky D. A., Young C. W., *Fed. Proc.*, 1967, **26**, 1139-1145.
 Kemeny N., Daly J., Reichman B. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1987, **107**, 459-465.
 Meta-Analysis Group in Cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, **88**, 252-258.
 Mukherjee K. L. *et al.*, *Cancer Res.*, 1963, **23**, 67-77.
 Seiter K., Kemeny N., Sigurdson E. *et al.*, *Reg. Cancer*, 1992, **4**, 166-169.
 Sullivan R. D., Miller E., *Cancer Res.*, 1965, **25**, 1025-1033.
 Von Roemeling R., Rabatin J. T., Fraly E. E. *et al.*, *J. Urol.*, 1988, **139**, 259-262.
 Wilkinson M. J., Frye J. W., Small E. J. *et al.*, *Cancer*, 1993, **71**, 360-364.

NICOLA FAZIO, FILIPPO DE BRAUD E MATTEO AAPRO

FLUCONAZOLO: v. ANTIMICOTICI* (col. *708); ANTIMICOTICI** (coll. **446-447).

FLUDARABINA

1. *fludarabine*.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2330). - **Farmacocinetica** (col. 2331). - **Farmacodinamica** (col. 2331). - **Esperienze terapeutiche** (col. 2332): *Leucemia linfatica cronica*. - *Altre malattie linfoproliferative croniche*. - *Leucemie mieloidi acute e sindromi mielodisplastiche*. - **Tossicità** (col. 2335). - **Conclusioni** (col. 2335).

Introduzione

La fludarabina [f.] monofosfato (Fludara®) è un analogo delle purine derivato dalla vidarabina, molecola studiata 20 anni fa ed abbandonata poiché scarsamente efficace a causa della rapida inattivazione per deaminazione e per la scarsa solubilità. Solo successivamente, nel 1969, grazie a Montgomery e Hewson, l'inserimento di un atomo di fluoro rendeva la molecola più resistente alla deaminazione e la sua formulazione come monofosfato la rendeva solubile (Plunkett *et al.*, 1993) (fig. 1).

La f. monofosfato così sintetizzata si dimostrava scarsamente efficace nel trattamento dei tumori solidi mentre risultava efficace nel trattamento di alcune malattie linfoproliferative croniche, in particolare la leucemia linfatica cronica (LLC).

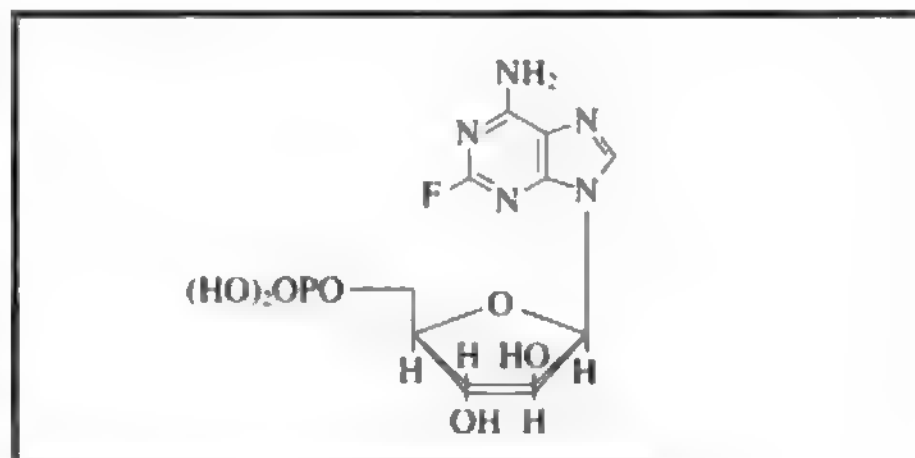


Fig. 1. Formula di struttura della f. monofosfato.

Farmacocinetica

Dopo somministrazione di f. alla dose di 25 mg/m² per infusione endovenosa breve, in 30 min, il farmaco viene defosforilato a F-ara-A raggiungendo immediatamente, dopo l'infusione, il picco plasmatico. A seguito dell'iniezione rapida in bolo i livelli plasmatici di F-ara-A presentano un'andamento trifasico. Si osserva una fase iniziale breve di distribuzione con emivita di circa 5 min, seguita da una fase intermedia con emivita di 1-2 ore ed infine una fase di eliminazione la cui emivita risulta essere di circa 10 ore.

L'escrezione di F-ara-A per via renale nelle 24 ore è in media del 60% e risulta essere correlata alla funzionalità renale espressa dai valori di creatinina sierica e di clearance della creatinina. In presenza di ridotta funzionalità renale conviene quindi ridurre la dose di f.

Farmacodinamica

Dopo la somministrazione per via endovenosa, la f. monofosfato (F-ara-AMP) viene rapidamente defosforilata nel plasma a F-ara-A, che attraverso un meccanismo di trasporto attivo penetra nelle cellule. La F-ara-A intracellulare viene nuovamente fosforilata fino alla forma trifosfato F-ara-ATP da un enzima di cui sono particolarmente ricchi i linfociti: la deossitidinchinasi. La F-ara-ATP è il metabolita più importante la cui attività dipende dall'effetto inibitorio esercitato su numerosi enzimi implicati nel complesso meccanismo di sintesi e di riparazione del DNA (fig. 2).

Un effetto importante della F-ara-ATP è rappresentato dall'interferenza con l'attività dell'enzima reduttasi ribonucleotidica da cui dipende la produzione dei deossinucleotidi necessari per la sintesi del DNA. Inoltre la F-ara-ATP compete con gli stessi deossinucleotidi per l'incorporazione nel DNA. Successivamente, dopo essere stata incorporata nel DNA, interferisce con l'attività della DNA polimerasi, e quindi inibisce l'ulteriore inserimento dei deossinucleotidi, provocando così l'interruzione della sintesi della catena del DNA.

È stata anche osservata una riduzione della escissione della F-ara-AMP incorporata ad opera della attività esonucleasica delle polimerasi di tipo δ ed ϵ . È stato documentato infine che la F-ara-ATP interferisce anche sull'attività della DNA primasi e della DNA ligasi.

A differenza di altri analoghi delle purine, la f., oltre che nel DNA, viene incorporata anche nel RNA determinando un blocco della sua trascrizione e della sintesi proteica. Questi effetti possono essere di rilevanza per giustificare l'attività del farmaco in una

patologia come la LLC in cui le cellule leucemiche sono caratterizzate da una bassa attività proliferativa. Inoltre, studi *in vitro* hanno mostrato che la incubazione di linfociti di LLC con f. induce segni morfologici evidenti di attivazione del processo di morte cellulare per apoptosi (v. **, processo che interviene sia nelle cellule proliferanti che in quelle quiescenti (Robertson *et al.*, 1993). In sintesi a livelli diversi, la fludarabina esercita effetti inibitori molteplici sui meccanismi coinvolti nella sintesi e riparazione del DNA, nella sintesi del RNA e determina un effetto favorente l'apoptosi.

La conoscenza dei meccanismi d'azione con cui si esplica l'attività della f. rappresenta il presupposto indispensabile per formulare protocolli terapeutici in cui la f. è associata ad altri farmaci. È stato dimostrato (Gandhi *et al.*, 1993a e b) che la f. ha la capacità di modulare in senso favorevole il metabolismo intracellulare della citarabina. È stato osservato infatti che la preincubazione *in vitro* con f. monofosfato comporta nelle cellule di leucemia acuta mieloide (LAM), e in misura minore anche di LLC, un incremento del metabolita attivo trifosfato della citarabina.

Questo dato è stato confermato dagli studi clinici nei quali f. e citarabina sono state impiegate in associazione dando luogo ad un effettivo incremento di risposte terapeutiche in pazienti in recidiva o refrattari affetti da LAM o LLC (Gandhi *et al.*, 1992; Estey *et al.*, 1993a e b).

L'interferenza che la f. esercita a vario livello sui sistemi enzimatici implicati nel processo di riparazione del DNA costituisce il razionale per la sua associazione con altri farmaci il cui meccanismo di azione è quello di alterare la struttura del DNA, tra questi il mitoxantrone (v. **, *nuovi farmaci antitumorali*) ed il cisplatino (v. **, v. **). Studi clinici recenti condotti sia nella LLC che in altre malattie linfoproliferative croniche confermano l'efficacia di questi tipi di associazione terapeutica (Mc Laughlin *et al.*, 1994; Zinzani *et al.*, 1995; Feldman *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1993).

Esperienze terapeutiche**Leucemia linfatica cronica**

L'approccio terapeutico della leucemia linfatica cronica (LLC) è tradizionalmente di tipo palliativo essendo questa patologia considerata non eradicabile dalla terapia convenzionale. Al trattamento con il solo clorambucile si sono succeduti nel tempo numerosi studi terapeutici nei quali

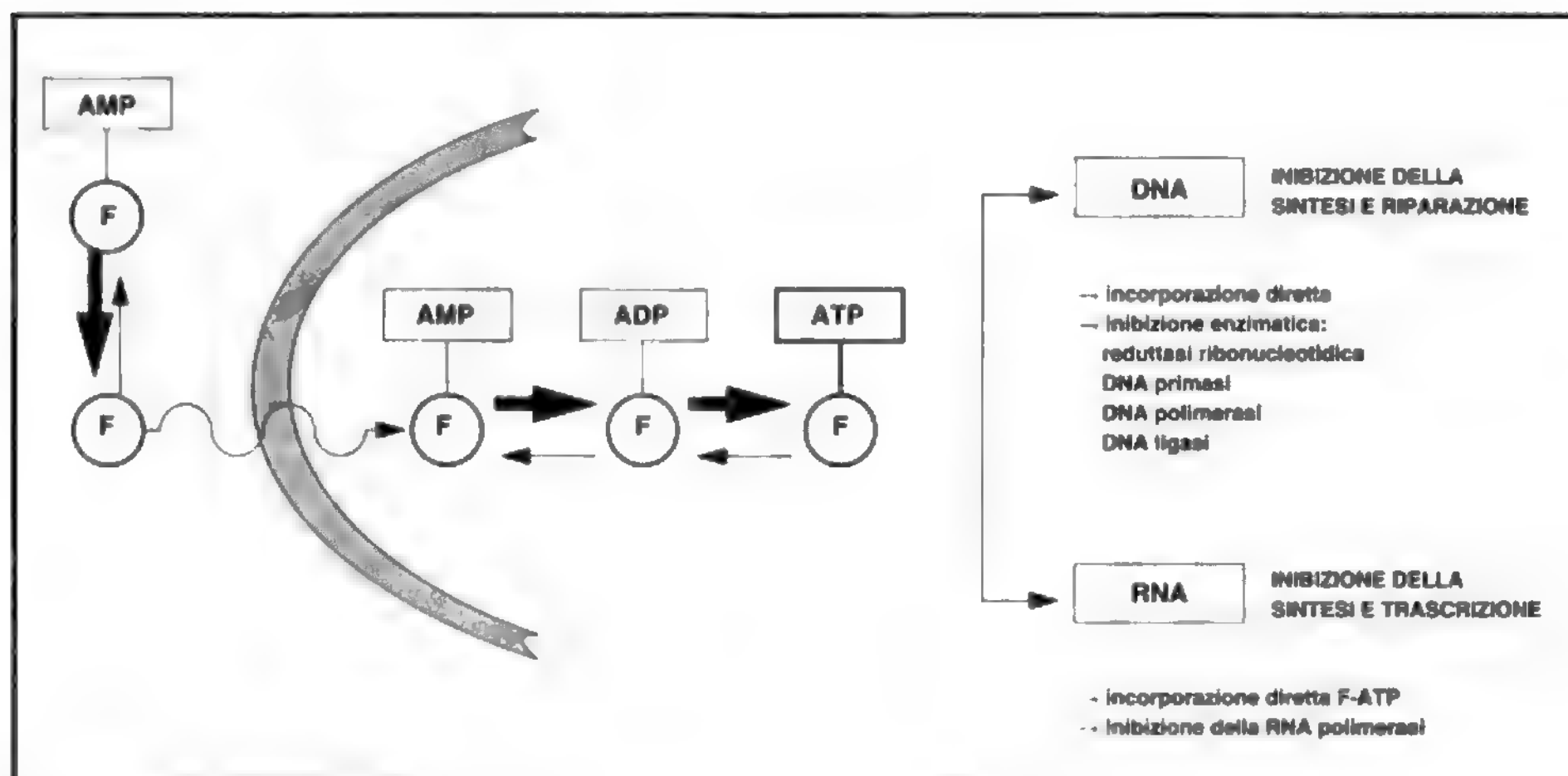


Fig. 2. F. monofosfato: meccanismo d'azione.

sono state impiegate diverse associazioni di farmaci. Tuttavia, nei pazienti così trattati non è stato ottenuto un miglioramento significativo della durata di sopravvivenza rispetto a quella mostrata in passato dai pazienti con LLC trattati con il solo clorambucile. In questi ultimi anni vi è stato tuttavia un rinnovato interesse per il trattamento della LLC grazie alla disponibilità di tre analoghi nucleosidici: la f. monofosfato, la 2-clorodeossiadenosina, la 2-deossicoformicina.

L'efficacia della f. nel trattamento della LLC è risultata evidente sin dalla prima esperienza terapeutica riportata da Grever (Grever *et al.*, 1988). Da allora, centinaia di pazienti con LLC sono stati sottoposti a terapia con tale farmaco. Gli studi terapeutici più rappresentativi riportati in letteratura sono quelli del gruppo del MD Anderson Cancer Center (MDACC).

Inizialmente sono stati trattati pazienti in progressione di malattia e/o refrattari alla terapia precedente (Keating *et al.*, 1989). La f. è stata somministrata alla dose di 25-30 mg/m²/e.v./die per 5 giorni consecutivi ogni tre, quattro settimane. In questi pazienti è stata ottenuta una percentuale elevata di risposte globali pari al 57% che è stata definita completa (RC) nel 13% dei casi. Questi risultati sono superiori a quelli ottenuti con altri schemi di chemioterapia di salvataggio con i quali le risposte globali si limitano al 30% dei casi e quelle complete inferiori al 5% dei casi.

La terapia con f. è stata proposta successivamente anche ai pazienti non precedentemente trattati. In questa categoria di pazienti i risultati sono stati superiori: 79% di risposte globali con 74% RC (Keating *et al.*, 1991). È da notare, tuttavia, che il 50% circa delle RC è stato definito «nodulare», ovvero caratterizzato dalla persistenza di infiltrati nodulari di malattia nel midollo.

Nella categoria di pazienti non pretrattati il tasso di risposte appariva superiore a quello ottenuto con la terapia con alchilanti impiegati a dosaggi convenzionali.

Fattori prognostici che hanno condizionato sfavorevolmente sia la probabilità di risposta che la probabilità di sopravvivenza sono stati: il pretrattamento e la sua entità, la refrattarietà alla precedente terapia con alchilanti, lo stadio avanzato di malattia (Keating *et al.*, 1993). Mentre la sopravvivenza dei non responsivi alla f. monofosfato risulta chiaramente ridotta, non è altrettanto evidente la correlazione tra qualità di risposta (risposte complete e risposte parziali) e durata di sopravvivenza.

La durata di risposta è condizionata anch'essa sfavorevolmente dal pretrattamento, dall'entità di quest'ultimo e anche dalla qualità della risposta ottenuta.

I pazienti sottoposti a terapia con f. e prednisone, pretrattati e non, non hanno ottenuto un diverso numero di risposte e di durata di sopravvivenza rispetto a quello osservato dopo terapia con sola f. Tra questi pazienti è stato osservato invece un incremento di infezioni opportunistiche (O'Brien *et al.*, 1993).

In massima parte i dati disponibili si riferiscono a numerosi studi non controllati, alcuni dei quali italiani, in cui trovano conferma i risultati del gruppo del MDACC (Zinzani *et al.*, 1993; De Rossi *et al.*, 1993; Spriano *et al.*, 1994).

Sono attualmente riportati in letteratura i dati preliminari di due soli studi randomizzati. Il primo è quello riportato dal gruppo cooperativo francese (The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1993) che ha condotto uno studio multicentrico in cui pazienti non pretrattati di stadio B e stadio C sono stati trattati in forma randomizzata secondo tre schemi differenti: CAP (ciclofosfamide, doxorubicina, prednisone), CHOP (ciclofosfamide,

doxorubicina, vincristina, prednisone) oppure f. I pazienti di stadio B, trattati con f. hanno ottenuto il maggior numero di risposte rispetto a quelle ottenute da pazienti trattati con CAP e con CHOP. Nei pazienti di stadio C, invece, la percentuale maggiore di risposte è stata ottenuta dai pazienti trattati con CAP rispetto a quella ottenuta con il CHOP e con f.

Nello studio randomizzato di Hiddemann (Hiddemann *et al.*, 1993) pazienti con LLC, pretrattati e non, hanno ricevuto in forma randomizzata terapia con f. oppure secondo schema CAP. I dati preliminari di questo studio indicano che con la f. sono state ottenute una percentuale di risposte globali superiori rispetto alla terapia con CAP. È tuttavia necessario un periodo di osservazione più lungo per valutare se la maggiore percentuale di risposte ottenute con f. nei pazienti con LLC si correli ad una maggiore durata di sopravvivenza rispetto a quella mostrata dai pazienti trattati con altri schemi terapeutici.

Dati recenti indicano che solo una minoranza di pazienti refrattari alla f. risulta successivamente responsiva alla 2-clorodeossiadenosina. Sembra quindi che nella maggior parte dei casi vi sia resistenza crociata tra f. e 2-clorodeossiadenosina (O'Brien *et al.*, 1994).

Per i pazienti più pesantemente pretrattati, sono stati elaborati, del tutto recentemente, schemi terapeutici in cui la f. monofosfato è stata associata ad altri farmaci sulla base dell'evidenza di un effetto sinergico tra questi. Tra le esperienze condotte vanno ricordate quelle in cui la f. è stata variamente associata al clorambucile, alla citarabina, alla doxorubicina, al cisplatino (Gandhi *et al.*, 1992; Zinzani *et al.*, 1995; Elias *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1992).

Altre malattie linfoproliferative croniche

Sono state condotte alcune esperienze terapeutiche con f. nei pazienti con linfoma non Hodgkin (LNH) in prevalenza a basso grado di malignità e già trattati. I risultati ottenuti indicano che una risposta terapeutica è possibile in più della metà dei casi e che la percentuale di risposte è migliore nei pazienti meno pretrattati e con istologia di tipo follicolare piuttosto che di tipo diffuso. La f. ha mostrato invece efficacia molto ridotta quando impiegata nel trattamento di LNH di grado intermedio o alto di malignità. L'associazione del mitoxantrone e del desametasone alla f. ha comportato, sempre in pazienti con LNH a basso grado di malignità un ulteriore incremento della percentuale di risposta. Questo tipo di associazione è stata recentemente proposta come terapia di prima linea degli LNH a basso grado di malignità in alcuni studi terapeutici (Mc Laughlin *et al.*, 1994).

La f. è stata impiegata con discreto successo anche nel trattamento di pazienti affetti da malattia di Waldenström refrattaria alla terapia con alchilanti (Dimopoulos *et al.*, 1993). Sono state riportate inoltre esperienze terapeutiche in cui la f., da sola o in associazione all'interferone, è stata impiegata con risultati interessanti nel trattamento della micosi fungoide e della malattia di Sézary (Foss *et al.*, 1994).

V. anche LINROMI**.

Leucemie mieloidi acute e sindromi mielodisplastiche

È stato dimostrato *in vitro* che la f. induce un incremento nei blasti leucemici del metabolita attivo della citarabina e che, inoltre, l'effetto citotossico dell'associazione fludarabina-citarabina è potenziato dall'aggiunta del G-CSF (Gandhi *et al.*, 1993a e b; Estey *et al.*, 1993a e b). Queste osservazioni hanno costituito il razionale per l'impiego dell'associazione fludarabina-citarabina da sola o con il G-CSF nel trattamento di pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) a prognosi sfavorevole e di pazienti con sindrome

mielodisplastica. Le risposte osservate con questo tipo di schema terapeutico sono risultate superiori a quelle attese in questo tipo particolare di pazienti.

Tossicità

La f. è generalmente ben tollerata. La tossicità più importante è rappresentata dalla mielotossicità, dalla immunodepressione e dalle conseguenti infezioni. Le infezioni interessano soprattutto i pazienti con malattia di stadio avanzato e più pesantemente pretrattati. È stato descritto nei pazienti trattati con f. associata al prednisone un incremento significativo di infezioni sostenute da *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus*, citomegalovirus, micobatteri e *Listeria monocytogenes* (Anaissie *et al.*, 1992; Girmenia *et al.*, 1994; Bergmann *et al.*, 1993). La marcata e protratta riduzione dei linfociti CD4+ osservata in corso e dopo terapia con f. ha un ruolo importante nel determinismo di questo particolare tipo di infezioni. Bisogna notare, tuttavia, che l'immunodepressione ed il conseguente rischio infettivo rappresentano una caratteristica propria dei pazienti affetti da LLC in fase avanzata di malattia.

È stata segnalata nei pazienti trattati con f. l'insorgenza di anemia emolitica autoimmune (AEAI) (Bastion *et al.*, 1992; Tosti *et al.*, 1992). Anche questa è una complicazione frequente nei pazienti affetti da LLC. L'insorgenza di AEA1 potrebbe essere favorita dall'accentuazione del preesistente squilibrio funzionale tra le sottopopolazioni linfocitarie T indotto dalla terapia. Ai dosaggi abitualmente impiegati è stata osservata raramente neurotossicità, questa è stata modesta e di tipo periferico (Cohen *et al.*, 1993). Ugualmente poco frequente è la sindrome da lisi tumorale che ha interessato pazienti con elevata massa tumorale associata a preesistente alterazione della funzionalità renale (Frame *et al.*, 1992).

Conclusioni

La f. è un farmaco di documentata efficacia nel trattamento di malattie linfoproliferative croniche ed in particolare della LLC e dei LNH a basso grado di malignità (v. LINFOMI**).

Al momento attuale non è ancora chiaro se all'elevato numero di risposte ottenute con questo farmaco corrisponda, rispetto ad altri tipi di terapia, un reale miglioramento della durata di sopravvivenza dei pazienti trattati. Una risposta a tale interrogativo sarà ottenuta dagli studi randomizzati in cui i risultati della terapia con f. sono confrontati con quelli ottenuti con l'impiego di altri farmaci.

Mielotossicità, immunodepressione e conseguente rischio infettivo rappresentano la tossicità più importante in corso di terapia con f. Nei pazienti di stadio avanzato, pesantemente pretrattati, e quindi a maggior rischio infettivo, l'impiego di questo farmaco deve essere ben ponderato e possibilmente associato a misure di profilassi delle infezioni opportunistiche.

Il marcato effetto citoriduttivo della f. nella LLC consente di ottenere risposte complete alcune delle quali caratterizzate da malattia residua minima. Tuttavia, la recidiva sembra essere un evento comunque costante anche nei casi in cui la risposta completa era stata confermata a livello molecolare. Una problematica tuttora aperta concerne quindi l'opportunità di una terapia per il controllo della malattia residua e quale sia quella più appropriata.

Nei pazienti a prognosi più sfavorevole e refrattari alla terapia, rimane da confermare l'efficacia di nuovi schemi terapeutici in cui la f. è associata ad altri farmaci sulla base di un loro effetto sinergico.

Bibliografia

- Anaissie E., Kontoyannis D. P., Kantarjian H. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1992, 117, 466.
 Bastion Y., Coiffier B., Dumontet C. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1992, 3, 171.
 Bergmann L., Fenchel K., Jahn B. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1993, 4, 371.
 Cohen R. B., Abdallah J. M., Gray J. R. *et al.*, *Ann. Int. Med.*, 1993, 118, 114.
 De Rossi G., Mauro F. R., Caruso R. *et al.*, *Haematol.*, 1993, 78, 167.
 Dimopoulos M. A., O'Brien S., Kantarjian H. *et al.*, *Am. J. Med.*, 1993, 95, 49.
 Elias L., Stock-Novack D., Head D. R. *et al.*, *Leukemia*, 1993, 3, 361.
 Estey E., Plunkett W., Gandhi V. *et al.*, *Leuk. Lymph.*, 1993a, 9, 343.
 Estey E., Gandhi V., Keating M. J. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1993b, 12, 301.
 Feldman E., Gandhi V., Plunkett W. *et al.*, *Blood*, 1992, 80, 208a.
 Foss F. M., Ihde D., Linnoila I. R. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, 12, 2051.
 Frame J. N., Dahut W. L., Crowley S., *New Engl. J. Med.*, 1992, 327, 1396.
 Gandhi V., Kemena A., Keating M. J. *et al.*, *Leuk. Lymph.*, 1993a, 10, 49.
 Gandhi V., Estey E., Keating M. J. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993b, 11, 116.
 Gandhi V., Robertson L. E., Keating M. J. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Hematol.*, 1992, 80, 47a.
 Girmenia C., Mauro F. R., Rahimi S., *Br. J. Haematol.*, 1994, 87, 407.
 Grever M. R., Coltman C. A., Files J. C. *et al.*, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1988, 30, 457.
 Hiddemann W., Johnson S., Smith A. *et al.*, *Blood*, 1993, 82, 202.
 Keating M. J., Kantarjian H., Talpaz M. *et al.*, *Blood*, 1989, 74, 19.
 Keating M. J., Kantarjian H., O'Brien S. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1991, 9, 44.
 Keating M. J., O'Brien S., Kantarjian H. *et al.*, *Blood*, 1993, 81, 2878.
 Mc Laughlin P., Hagemester F. B., Swan F. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, 12, 575.
 O'Brien S., Kantarjian H., Beran M. *et al.*, *Blood*, 1993, 82, 1695.
 O'Brien S., Kantarjian H., Estey E. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 319.
 Plunkett W., Gandhi V., Huang P. *et al.*, *Semin. Oncol.*, 1993, 20, 2.
 Robertson L. E., Chubb S., Meyn R. E. *et al.*, *Blood*, 1993, 81, 143.
 Robertson L. E., Kantarjian H., O'Brien S. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1993, 12, 308.
 Spriano M., Clavio M., Carrara P. *et al.*, *Haematol.*, 1994, 79, 218.
 The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, *Seminars in Oncology*, 1993, 20, 21.
 Tosti S., Caruso R., D'Adamo F. *et al.*, *Hematology*, 1992, 238.
 Weiss M., Kemin S., Berman E. *et al.*, *Proc. ASCO*, 1992, 11, 276.
 Zinzani P. L., Bendandi M., Tura S., *Eur. J. Hematol.*, 1995, 55, 262.
 Zinzani P. L., Lauria F., Rondelli D. *et al.*, *Eur. J. Haematol.*, 1993, 51, 93.

FRANCESCA ROMANA MAURO

FLUOXETINA ED ANALOGHI

I. fluoxetine.

SOMMARIO

Introduzione sugli SSRI (col. 2336). - Efficacia antidepressiva degli SSRI (col. 2337). - Dosaggi degli SSRI (col. 2338). - Efficacia selettiva degli antidepressivi SSRI (col. 2339): Depressione grave. - Sintomi d'ansia nella depressione. - Ideazione suicidaria nella depressione. - Farmacocinetica e interazioni farmacologiche degli SSRI (col. 2340). - Sicurezza d'uso e tollerabilità degli SSRI (col. 2341).

Introduzione sugli SSRI

Lo sviluppo degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors*: SSRI) (v. ANTIDEPRESSIVI FARMACI**) ha rappresentato la risposta dell'industria farmaceutica, soprattutto con la fluoxetina (Prozac[®]; fig. 1), all'esigenza dei clinici di poter disporre di nuovi farmaci che, rispetto ai classici antidepressivi triciclici (*tricyclic antidepressants*: TCA; v. IMIPRAMINA E DERIVATI [v.: v.*]), a parità di efficacia presentassero una minore incidenza di effetti collaterali. Infatti i TCA, introdotti or-

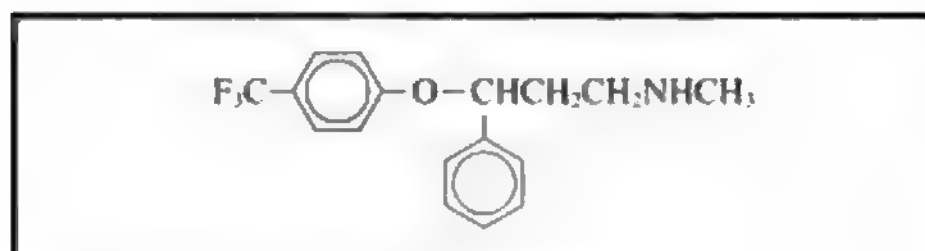


Fig. 1. Formula di struttura della fluoxetina.

mai da oltre un trentennio, per quanto abbiano contribuito in modo evidente al miglioramento della qualità della vita dei pazienti affetti dalla malattia maniaco-depressiva, si caratterizzano tuttavia per un'ampia gamma di azioni che coinvolge l'attività di numerosi neurotrasmettitori, molte delle quali inducono effetti collaterali potenzialmente rischiosi (pazienti anziani o cardiopatici). Occorre inoltre tenere in considerazione che, dal momento che i TCA sono tossici se assunti in sovradosaggio, la loro prescrizione ad un paziente depresso con grave ideazione suicidaria, può mettere a sua disposizione un potenziale strumento autolesivo. In ogni caso gli effetti collaterali dei TCA possono con frequenza causare la sospensione anticipata del trattamento e spesso, nel tentativo di ridurre l'intensità, l'antidepressivo viene prescritto in dosaggi subterapeutici.

Gli SSRI agiscono selettivamente sul sistema serotoninergico, non possedendo attività su altri sistemi recettoriali, e questa caratteristica risulta molto importante per la migliorata tollerabilità e sicurezza d'uso.

Dal momento che la serotonina rappresenta il neurotrasmettitore maggiormente coinvolto nella regolazione del tono dell'umore e nella patofisiologia della depressione, si pensò che un antidepressivo caratterizzato da un'azione selettiva a questo livello avrebbe evidenziato anche una efficacia clinica più potente. Tuttavia l'esperienza clinica ha dimostrato che alla selettività degli SSRI, non corrisponde una maggiore efficacia terapeutica, che si è infatti rivelata paragonabile a quella dei TCA.

Gli SSRI rappresentano pertanto una classe di farmaci con un profilo d'azione recettoriale di maggiore purezza di quello dei TCA e quindi caratterizzati da una migliore tolleranza e da più ampi margini di sicurezza.

Efficacia antidepressiva degli SSRI

La lista degli SSRI attualmente disponibili si è allungata sensibilmente nel corso degli ultimi anni, ed alcuni di essi sono ormai divenuti di impiego clinico routinario. Gli SSRI attualmente disponibili nel Nord America ed in Europa sono il citalopram (Seropram®) (disponibile in Europa a partire da 1988), la fluoxetina e la fluvoxamina (Fevarin®) (disponibili in Europa a partire dal 1983) e, più recenti, la paroxetina (Seroxat®) e la sertralina (Lustral®).

TAB. I. DOSI STANDARD DEGLI INIBITORI SELETTIVI DELLA RICAPTAZIONE DELLA SEROTONINA (SSRI)

SSRI	DOSI
Citalopram	20-40 mg/die
Fluoxetina	20 mg/die
Fluvoxamina	150 mg/die
Sertralina	50-150 mg/die
Paroxetina	20-40 mg/die

I dosaggi standard di riferimento per questi farmaci sono illustrati in tab. I e nel capitolo successivo.

L'efficacia degli SSRI è stata comparata in moltissimi studi clinici controllati con quella di altri antidepressivi (amitriptilina, imipramina, clorimipramina, maprotilina, oxaprotilina, mianserina, dotiepine). Nel complesso, i risultati non hanno evidenziato significative differenze di efficacia tra i due trattamenti posti a confronto.

I dati più sicuri sono stati ottenuti nell'ambito di alcuni trial clinici multicentrici, nei quali è stato possibile confrontare i risultati di due trattamenti somministrati su popolazioni sperimentali sufficientemente estese.

La valutazione dell'efficacia di un farmaco può essere effettuata inoltre anche ricorrendo al metodo della meta-analisi. In questi casi si procede valutando in modo cumulativo i risultati di più studi clinici effettuati precedentemente, potendo così verificare alcune ipotesi sperimentali operando su casistiche estremamente ampie. Studi meta-analitici così impostati sono stati effettuati per verificare l'efficacia della fluoxetina e della paroxetina. Anche in questo caso è emerso, a conferma di quanto fin qui esposto, che la potenza antidepressiva di questi due SSRI appare paragonabile a quella dei TCA.

La letteratura disponibile sugli SSRI offre un numero di studi decisamente minore nei quali sia stata comparata l'efficacia antidepressiva di due differenti SSRI. Non è quindi possibile stabilire con certezza se, all'interno del gruppo degli SSRI, esistano molecole con potenza antidepressiva maggiore. Tuttavia non sembrerebbe che le molecole di questo gruppo si differenzino significativamente tra loro in quanto a potenza antidepressiva.

Dosaggi degli SSRI

Il dosaggio di un nuovo antidepressivo normalmente si stabilisce sulla base di informazioni ottenute, in parte da ricerche sui suoi effetti su animali, ed in parte, da ricerche su esseri umani in cui il dosaggio della sostanza sia stato progressivamente incrementato fino alla comparsa dell'effetto farmacologico. Il dosaggio minimo a cui la sostanza mostra di agire terapeuticamente (dose minima efficace), nel caso di sperimentazioni condotte con farmaci antidepressivi, a causa del loro periodo di latenza può a volte risultare eccessivo. I pazienti possono così essere esposti inutilmente a dosaggi eccessivi di farmaco con un conseguente incremento della frequenza di effetti collaterali, senza che a ciò corrisponda necessariamente un miglioramento della efficacia.

Per ovviare a questi inconvenienti ed ottenere informazioni più attendibili sulla dose ottimale di un nuovo farmaco, si dovrebbero invece valutare i risultati degli studi a «dosaggio fisso». Molti SSRI attualmente in commercio sono stati valutati in studi basati su questa metodologia sperimentale, i cui risultati, nella maggior parte dei casi, hanno dimostrato che nei precedenti studi di titolazione della dose era stato proposto un dosaggio minimo efficace eccessivamente elevato. Ad es., nel caso della fluoxetina, era stata proposta originariamente la dose di 80 mg. Negli studi a dosaggio fisso, effettuati successivamente, fu invece possibile dimostrare che la fluoxetina risultava superiore al placebo già al dosaggio di 5 mg. La risposta terapeutica piena si otteneva tuttavia a dosaggi di 20 e 40 mg. Di conseguenza anche per un farmaco come la fluoxetina, ormai in commercio da oltre un decennio, la posologia di 20 mg proposta come dosaggio minimo efficace, potrebbe in realtà risultare eccessiva per alcuni pazienti. Anche per la fluvoxamina è stato ipotizzato che sia stata proposta una dose minima efficace eccessiva e che l'effetto collaterale della nausea potrebbe essere meno intenso, senza una perdita dell'efficacia antidepressiva, se venisse utilizzata una dose minore.

Negli ultimi anni si è diffusa la consuetudine di effettuare routinariamente gli studi a dose fissa. Di conseguenza le dosi minime raccomandate per gli SSRI introdotti più recentemente, sembrano più vicine a quelle realmente necessarie. La dose minima proposta per la paroxetina è di 20 mg/die. I dati di alcuni studi sembrerebbero tuttavia indicare l'esigenza di raggiungere dosaggi più elevati per il trattamento di pazienti con sintomi di melancolia. Per il citalopram è stata proposta la dose minima efficace di 20-40 mg.

In alcuni pazienti, indipendentemente dall'antidepressivo utilizzato, è necessario ricorrere alla somministrazione di dosaggi più elevati di quelli standard. In questi casi l'uso degli SSRI, che si sono rivelati farmaci molto sicuri e ben tollerati, offre degli indubbi vantaggi rispetto ai TCA. L'esperienza clinica con il citalopram e con la paroxetina, ha evidenziato che l'incremento della dose si rivela utile per il trattamento di alcuni pazienti che non abbiano mostrato una risposta sufficiente ai dosaggi più bassi, specialmente quando siano presenti sintomi melancolici, o comunque di intensità particolarmente grave. Dosaggi più elevati sembrano ugualmente utili quando si evidenzia una comorbidità di sintomi depressivi ed ossessivo-compulsivi.

L'efficacia degli SSRI è stata valutata sia negli studi di trattamento in acuto che in quelli a lungo termine. I risultati di questi ultimi hanno dimostrato come dosaggi pieni di antidepressivo sono necessari anche durante la fase del trattamento di mantenimento a lungo termine o in quella di profilassi per la prevenzione delle ricadute. La fluoxetina, a dosaggi di 20 e di 40 mg/die, si è rivelata efficace per la riduzione del rischio di nuovi episodi. Gli altri SSRI sono apparsi efficaci per questo scopo ai dosaggi di 100 mg per la sertralina, di 20-30 mg per la paroxetina e di 20-30 mg per il citalopram.

Efficacia selettiva degli antidepressivi SSRI

I dati degli studi clinici nei quali l'efficacia degli SSRI è stata posta a confronto con quella dei TCA, hanno dimostrato che la potenza antidepressiva delle due classi di farmaci, se considerata sul piano globale, appare sovrapponibile.

Alcuni aspetti più specifici dell'efficacia antidepressiva sembrano tuttavia in grado di caratterizzare alcune differenze tra gli SSRI ed i TCA. Queste sono state individuate mediante l'adozione della tecnica della meta-analisi, che ha rivelato lievi differenze di efficacia quando si somministrano queste due differenti classi di antidepressivi in sottogruppi di depressi con configurazioni psicopatologiche specifiche.

Depressione grave

L'introduzione di un nuovo farmaco antidepressivo necessita di una adeguata sperimentazione preliminare su pazienti affetti dalle forme di depressione di maggiore gravità clinica. Tuttavia normalmente i pazienti con i sintomi depressivi di maggiore intensità non vengono valutati in studi clinici specifici. Pertanto l'efficacia di un nuovo gruppo di farmaci nel trattamento di queste forme, può essere valutata adottando la tecnica della meta-analisi.

Dall'analisi dei dati di tutti gli studi clinici fino ad oggi condotti non sono emerse differenze significative tra l'efficacia della fluoxetina o della paroxetina vs. quella dei TCA in queste forme di depressione clinicamente più gravi (punteggio della scala di Hamilton > 28). Questo dato è stato confermato anche per la fluvoxamina.

Sintomi d'ansia nella depressione

In alcuni casi il trattamento della depressione maggiore con SSRI comporta, specialmente nel corso delle fasi iniziali della terapia, l'emergenza transitoria di sintomi di agitazione. Questo effetto collaterale potrebbe compromettere la

terapia nei casi in cui si debbano trattare con SSRI pazienti depressi, il cui quadro clinico sia dominato dai sintomi ansiosi. Nel trattamento di queste forme depressive sono stati sempre considerati farmaci particolarmente vantaggiosi quegli antidepressivi caratterizzati da un profilo clinico estremamente sedativo. Tuttavia gli SSRI risultano generalmente privi di effetti sedativi; pertanto sembrerebbe ipotizzabile che questa caratteristica potrebbe risultare negativa nel trattamento di queste forme. I risultati degli studi di meta-analisi condotti fino ad oggi per comparare l'efficacia degli SSRI con quella dei TCA nel trattamento dei quadri depressivi con forte componente ansiosa associata, hanno tuttavia dimostrato che gli SSRI, contrariamente alle aspettative, si rivelano in realtà maggiormente efficaci. Tale superiorità rispetto ai TCA appare particolarmente evidente per la fluvoxamina, la fluoxetina e la paroxetina. Questi dati sembrano peraltro confermati dai risultati degli studi clinici nei quali gli SSRI hanno mostrato notevole efficacia nel trattamento di alcuni disturbi d'ansia, tra cui principalmente il disturbo da attacchi di panico (v. PANICO, ATTACCO DI*).

Ideazione suicidaria nella depressione.

L'ideazione suicidaria rappresenta un sintomo nucleare in una percentuale molto elevata di pazienti depressi. I risultati di alcuni studi condotti su piccole casistiche, nei quali si è tentato di verificare questa ipotesi sperimentale, sembrano indicare una attività maggiore degli SSRI su questo sintomo. Questa superiorità degli SSRI rispetto ai TCA sui pensieri di suicidio inoltre sembra anche riferibile a un più rapido instaurarsi degli effetti terapeutici.

Solo alcuni rapporti aneddotici hanno segnalato che la fluoxetina può a volte determinare un incremento della ideazione suicidaria. Si tratta comunque di osservazioni condotte su casi singoli, trattati con questa sostanza in disegno sperimentale aperto e di pazienti nei quali la prima insorgenza dell'ideazione suicidaria era precedente all'inizio della somministrazione del farmaco. Molti di questi pazienti inoltre ricevevano più farmaci in politerapia.

Farmacocinetica e interazioni farmacologiche degli SSRI

Farmacocinetica. - Gli SSRI rappresentano un gruppo di farmaci piuttosto omogeneo anche se esistono differenze di ordine farmacocinetico e farmacodinamico, alcune delle quali possono spiegare alcune caratteristiche cliniche.

Per qualsiasi antidepressivo la valutazione di caratteristiche quali la selettività d'azione recettoriale, la potenza o la farmacocinetica, devono sempre tenere in considerazione anche gli effetti su ognuno di questi parametri di tutti i metaboliti attivi della sostanza. Ad esempio la clorimipramina, per quanto sia un potente inibitore della ricaptazione della serotonina, non può essere considerato come facente parte del gruppo degli SSRI in quanto possiede anche un metabolita attivo demetilato che risulta un potente inibitore della ricaptazione della noradrenalina. Citalopram, fluoxetina e sertralina possiedono dei metaboliti attivi che, rispetto alla molecola di origine, risultano equipotenti nell'inibizione della ricaptazione della serotonina. Paroxetina e fluvoxamina invece, vengono trasformate direttamente in metaboliti inattivi.

Il livello di attività dei metaboliti attivi degli SSRI varia da sostanza a sostanza, essendo infatti minimo nel caso della sertralina, fino al caso della fluoxetina in cui il metabolita attivo, la norfluoxetina, è addirittura più potente e selettivo della molecola di origine. Gli SSRI vengono rapidamente assorbiti e distribuiti, mentre i tempi di eliminazione variano molto da farmaco a farmaco. Il tempo di emivita plasmatica del citalopram è di 36 ore, della fluvoxamina è di 15 ore, della paroxetina di 20 ore e della ser-

tralina e della nortsertralina di 25 e 66 ore rispettivamente. Il tempo di vita più lungo è quello della fluoxetina, infatti la norfluoxetina, il suo metabolita attivo, presenta un tempo di emivita di circa 1-3 giorni e permane nel sangue in tracce dosabili per periodi molto più lunghi (fino a 15 giorni dopo la sospensione dell'assunzione della sostanza madre). Questo periodo di eliminazione così prolungato del suo metabolita comporta la necessità di adottare alcune misure precauzionali nei casi in cui si debba procedere ad una sostituzione della fluoxetina, al fine di evitare la comparsa di potenziali interazioni farmacologiche.

Questa caratteristica della lunga persistenza nel sangue del suo metabolita attivo, rende invece la fluoxetina un farmaco particolarmente vantaggioso per il trattamento di quei pazienti che non siano in grado di garantire una adeguata aderenza alla prescrizione (*compliance*).

Interazioni. - Molti clinici prescrivono delle associazioni di antidepressivi, anche se il vantaggio che ne deriva in termini di efficacia, deve ancora essere dimostrato attraverso studi condotti in doppia cecità ed è sicuramente controbalanciato da un'incrementata emergenza di effetti collaterali.

Sono state descritte molte interazioni farmacologiche. Ad es. molti antiaritmici, beta-bloccanti, neurolettici ed antidepressivi triciclici vengono metabolizzati dallo stesso citocromo P450-P2-D6. Di conseguenza l'uso combinato con un SSRI può generare alcuni problemi potenziali. Queste interazioni possono causare incrementi della concentrazione plasmatica dell'SSRI e/o del TCA. Dal momento che si tratta di farmaci molto ben tollerati, questo fenomeno generalmente non crea problemi per quel che riguarda la crescita dei livelli di concentrazione plasmatica degli SSRI, mentre alcuni problemi sono stati segnalati in seguito alla crescita dei livelli plasmatici dei TCA. Occorre tener presente a questo riguardo che esiste un polimorfismo genetico di questi sistemi enzimatici, che determina in circa il 7% degli individui adulti di razza caucasica un deficit della metabolizzazione di queste sostanze. In questi soggetti, l'inibizione del sistema enzimatico dovuta all'assunzione contemporanea di un'associazione di farmaci, quali ad esempio neurolettici, antiaritmici e SSRI, necessiterebbe di una supervisione molto attenta e di uno scrupoloso monitoraggio degli effetti collaterali. L'uso combinato degli SSRI e degli IMAO (inibitori della monoaminoossidasi) può causare la comparsa di una sindrome serotoninergica, le cui conseguenze sono potenzialmente letali. Sono stati descritti infatti decessi per ipertermia, in seguito all'assunzione combinata di un SSRI ed un IMAO irreversibile.

Anche se meno pericolosa, l'interazione con gli IMAO reversibili, è sempre potenzialmente rischiosa. Per questi motivi, quando si passa dalla somministrazione di un SSRI a quella di un IMAO o viceversa, è raccomandabile effettuare un periodo di intervallo tra la sospensione di un trattamento e l'inizio del successivo, di durata proporzionata al tempo necessario per l'eliminazione plasmatica dell'SSRI o per il ripristino dell'attività enzimatica delle MAO.

Sicurezza d'uso e tollerabilità degli SSRI

Al confronto con i TCA gli SSRI risultano praticamente privi di effetti collaterali anticolinergici e questo aspetto giustifica la loro grande tollerabilità. A volte tuttavia il loro uso è associato all'insorgenza di alcuni effetti collaterali, la cui natura può essere compresa in base alla conoscenza delle loro caratteristiche farmacologiche. I principali effetti collaterali, generalmente modesti e di breve durata, sono rappresentati da alcuni sintomi gastrointestinali e da alcune difficoltà sessuali (nei pazienti di sesso maschile). I sintomi a carico dell'apparato digerente sono generalmente lievi e tendenti ad una spontanea riduzione di intensità con il pro-

seguimento della terapia. Essi si caratterizzano inoltre come dose dipendenti per cui l'emergenza di nausea, ad es., spesso si rileva solamente a dosaggi eccessivamente elevati. Specialmente in associazione alla somministrazione dei dosaggi più elevati di SSRI, può essere inoltre rilevata una riduzione del peso corporeo, principalmente nei pazienti in eccedenza ponderale prima dell'inizio della terapia antidepressiva. I disturbi della sfera sessuale nel maschio, si presentano piuttosto frequentemente. Infatti negli studi clinici controllati vengono riferiti problemi di ritardo dell'ejaculazione in una percentuale di pazienti 2-3 volte superiore rispetto a quella rilevabile nel gruppo di pazienti trattati con placebo o con i farmaci di controllo.

Per quanto gli SSRI, considerati come categoria di farmaci, si siano rivelati più efficaci dei TCA nel migliorare i sintomi d'ansia associati alla depressione, un piccolo sottogruppo di pazienti può tuttavia riferire un incremento della quota d'ansia o sintomi di agitazione, nel corso delle fasi iniziali del trattamento. Questi effetti sono stati descritti più frequentemente in seguito all'assunzione della fluoxetina, forse come conseguenza della capacità di questa sostanza di agire come agonista sui recettori 5HT_{1c}.

Sono stati anche segnalati fenomeni neurologici di natura extrapiramidale, probabilmente collegati al coinvolgimento della serotonina nella autoregolazione del sistema recettoriale dopaminergico. Questi sintomi extrapiramidali sono piuttosto rari e possono conseguire all'assunzione di qualsiasi SSRI, anche se il maggior numero di segnalazioni riguarda la fluoxetina e la paroxetina.

L'uso dei TCA nei pazienti affetti da disturbo bipolare è considerato associato alla possibilità di causare un viraggio in eccitamento, a tal punto da controindicare l'uso in pazienti con un elevato numero di pregressi episodi maniacali. Questi viraggi nei pazienti bipolari sembrano associati ad elevazioni dei livelli plasmatici di 3-metossi-4-idrossi-fenilglicole (MHPG), il principale metabolita della noradrenalina. Dal momento che gli SSRI agiscono selettivamente sulla serotonina, essi rappresentano conseguentemente un gruppo di farmaci meno problematico da questo punto di vista. Anche una meta-analisi sui dati di tutti gli studi clinici di efficacia degli SSRI vs. TCA ha permesso di evidenziare che, per i primi, la frequenza di viraggi in mania era del 2,2% dei casi trattati, contro un valore dell'11,6%, per i secondi.

L'uso dei TCA è associato ad un numero elevato di suicidi posti in atto mediante l'ingestione di forti quantitativi dell'antidepressivo prescritto. Il decesso normalmente ha luogo per fenomeni cardiotossici legati agli effetti ionotropi dei TCA sul miocardio. Al contrario sono molto rari i casi di decessi in seguito a suicidio attuato mediante ingestione di grandi quantità di SSRI. Nel Regno Unito, ad esempio, è stata calcolata una frequenza di 34 suicidi per milione di prescrizioni di TCA, mentre con gli SSRI lo stesso valore scende a 1,7. Somministrati alla dose minima efficace, compare una frequenza di effetti collaterali non significativamente superiore a quella rilevabile nel caso di pazienti trattati con il placebo.

Bibliografia

- Bech P., Cialdella P., *Inter. Clin. Psychopharm.*, 1992, **6**, 45-54.
- Dominguez R. A., Goldstein B. J., Jacobson A. F., *J. Clin. Psychiatry*, 1985, **46**, 84-87.
- Doogan D. P., Caillard V., *Br. J. Psychiatry*, 1992, **160**, 217-222.
- Gram L. F., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 1354-1361.
- Montgomery S. A., Henry J., McDonald G., *Inter. Clin. Psychopharm.*, 1994, **9**, 47-55.
- Montgomery S. A., *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in the acute treatment of depression*, in Bloom F. E., Kupfer D. J. eds., *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, 1995, Raven Press, New York.

ROBERTO DELLE CHIAIE

FLUSSO DI INFORMAZIONI IN BIOLOGIA

F. flux d'information chez les organismes vivants. - I. information flow in organisms. - T. Informationsfluss in Biologie.

SOMMARIO

Premessa (col. 2343). - La teoria (col. 2343). - L'informazione in genetica (col. 2345). - Informazione e comportamento (col. 2347).

Premessa

La teoria dell'informazione è nata come supporto ai problemi della tecnica delle comunicazioni ed è tuttora intimamente legata ad essa. I massimi contributi alla teoria li hanno dati, indipendentemente, C. E. Shannon e N. Wiener nel 1948. Oltre a sviluppare alcuni dei principali teoremi prospettati dagli ingegneri delle telecomunicazioni e dagli studiosi di linguistica, questi A.A. hanno proposto un'unità di misura (il *bit*) consistente nel quanto di informazione necessario per scegliere correttamente tra due eventi equiprobabili.

L'importanza della teoria dell'informazione per la biologia era stata preconizzata dal fisico teorico Erwin Schrödinger nel 1944; essa è stata poi opportunamente precisata nel 1958 nell'opera curata da Yockey *et al.* Dopo quella data i contributi forniti dalla teoria dell'informazione alla biologia sono stati numerosi e sono confluiti nella *biocibernetica* (v. CIBERNETICA), disciplina che si occupa dei problemi dell'autocontrollo e fornisce base moderna e rigorosa a molti capitoli della fisiologia (Omodeo, 1975). Questa confluenza non è stata casuale, bensì dovuta al fatto che l'autocontrollo di un qualsiasi sistema è pensabile soltanto se esiste un comparatore, dispositivo nel quale vengono confrontati il valore effettivo del parametro sotto controllo con il valore teorico ottimale. Simile operazione implica che vi sia un'informazione geneticamente preconstituita, o erogata esternamente da altri apparati, relativa ai valori ottimali.

La teoria

L'informazione può essere intesa come entropia statistica (o neg-entropia) e così formulata trova applicazione in complessi problemi teorici; in biologia viene più spesso e più praticamente intesa in senso ristretto. In questo caso si presuppone l'esistenza di: 1) un dispositivo che emette segnali (*emittente*); 2) un *canale* idoneo alla trasmissione di detti segnali; 3) un *sistema ricevente*. Quest'ultimo può avere le caratteristiche di un *automa* che agisce in conformità ai segnali che riceve, oppure le caratteristiche di una *memoria* che immagazzina l'informazione ricevuta e la restituisce su richiesta (fig. 1).

La distinzione tra un automa e un dispositivo di memoria non è sempre così ovvia come appare a prima vista: una telescrivente, ad es., può essere intesa sia come un automa che agisce (stampa) in conformità ai segnali che riceve, sia come una memoria che immagazzina il messaggio sul nastro di carta, cioè la sequenza dei segnali ricevuti.

Poiché la trasmittente invia segnali di natura fisica che percorrono un canale di natura fisica e vengono recepiti da un ricevitore che ha la medesima natura, è possibile descrivere il flusso di informazioni dalla partenza fino all'arrivo in termini del tutto conformi alle sole leggi e ai soli principi della fisica. Ma in tal caso sfugge il valore operativo del messaggio: per cogliere questo valore occorre sostituirsi al ricevitore per il quale è del tutto irrilevante se il messaggio giunge come variazione di tensione elettrica, come variazione di frequenza di onde hertziane, o in altri modi ancora: esso riceve segnali che dirigono il suo operare.

Cambiando punto di vista, se si esamina un disco di resina per fonografo sul quale è registrata della musica, è possibile

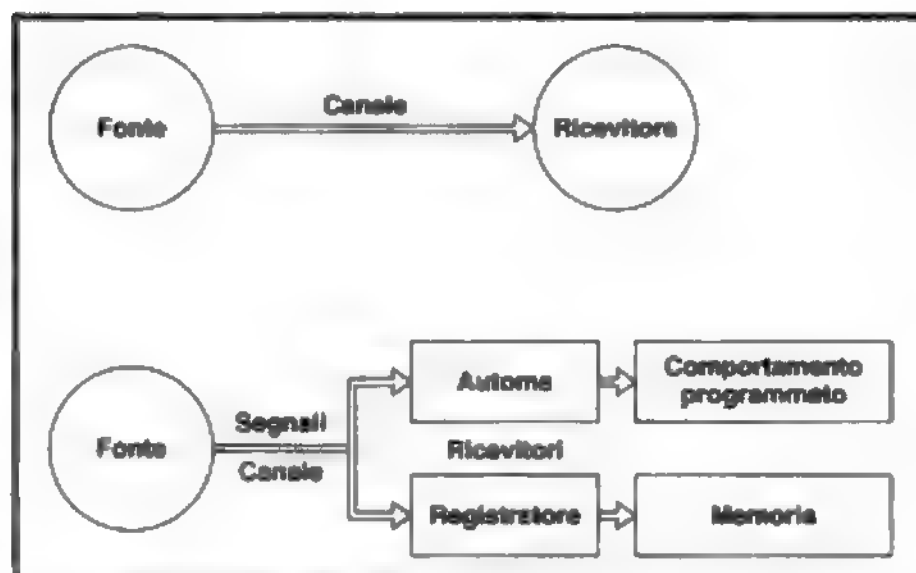


Fig. 1. Presupposto della teoria dell'informazione ristretta, che si utilizza in biologia, è che vi sia una fonte, o trasmittente, che attraverso un canale invia l'informazione sotto forma di messaggi a una ricevente (*sopra*). Se la ricevente ha le caratteristiche di un automa il messaggio si traduce in una serie di operazioni, cioè in un comportamento programmato; se la ricevente ha le caratteristiche di un registratore il messaggio viene archiviato in una memoria (*sotto*).

descrivere una traccia microscopica fatta di molti dislivelli la quale in condizioni opportune modula un flusso uniforme di energia, col risultato di produrre treni di onde sonore di varia frequenza e intensità; ma il messaggio che viene recepito dall'ascoltatore è altra cosa, è estraneo al determinismo fisico.

L'importanza della teoria dell'informazione e dei suoi principi si percepisce nel momento in cui si individua il valore funzionale dei messaggi che vengono erogati dalle strutture dei viventi e che vengono intercettati dallo studioso.

L'informazione non gode del principio di conservazione di cui godono materia ed energia: se il substrato fisico dell'informazione si deteriora, questa si deteriora; se si distrugge il substrato fisico dell'informazione essa è perduta per sempre.

Poiché l'informazione è sempre veicolata da una qualche forma di energia essa ha un costo (termodinamico) che può essere rilevante. Nel caso che l'informazione venga registrata entrano in gioco altri due fattori: la capacità del substrato di memoria che è necessariamente finita, e, nel caso che essa venga immagazzinata sotto forma di molecole (come è il caso della memoria genetica), non è irrilevante l'ingombro e il peso costituito da questo materiale e l'energia spesa nel sintetizzarlo.

Quando si prendono in considerazione casi specifici di comunicazione è opportuno procedere all'identificazione della varietà di segnali, o alfabeto, emessi dalla fonte (ad es.: qual è l'alfabeto del lampeggiare delle lucciole?); delle proprietà del canale (capacità, eventuale schermatura); della natura del ricevitore (automa o memoria?).

Vari settori della biologia possono essere vantaggiosamente considerati dal punto di vista della teoria dell'informazione. La genetica può essere esposta in termini di flusso di informazione da una generazione cellulare all'altra, e la morfogenesi di un organismo pluricellulare può essere intesa come flusso di programmi (o progetti) dal nucleo dello zigote e poi dai nuclei dei blastomeri verso il citoplasma delle cellule embrionali.

Il funzionamento del sistema nervoso può essere inteso come elaborazione dell'informazione proveniente dagli organi di senso, e diramazione di messaggi ai muscoli e alle ghiandole. Ad un livello superiore il comportamento di un organismo nell'ambiente può essere analizzato come ricerca e ricezione di segnali esterni per dirigersi verso il

cibo, verso il partner per la riproduzione, per fuggire i predatori e i pericoli in genere.

Inoltre tutti i processi di regolazione fisiologica presuppongono il ricevimento e la elaborazione dei segnali provenienti dai sensori disseminati all'interno della cellula o all'interno di un organismo pluricellulare.

Infine, l'evoluzione (v.; v.***) degli organismi può essere studiata ed esposta in termini di acquisizione, di perdita o di modifica di informazione ereditaria.

L'informazione in genetica

Il genoma (v. GENETICA [v.; v.*; v.**]; GENOMA UMANO**) di un qualunque organismo può essere definito come una memoria nella quale sono iscritti tutti i programmi (o progetti) che dirigono la sintesi di tutte le specie di polinucleotidi e polipeptidi necessari alla costruzione e al funzionamento dell'organismo e alla sua riproduzione.

Questa memoria eroga l'informazione su due diversi canali: uno di essi — in vista della divisione cellulare — guida la sintesi di un nuovo genoma eguale a quello d'origine: tale processo è in preciso accordo col teorema di von Neumann (1951) relativo all'automa autoriproducibile.

L'altro canale viene attivato o inibito su «richiesta» e conduce sia alla sintesi di vari tipi di RNA sia — per il tramite di questi polinucleotidi — alla sintesi delle corrispondenti specie di proteine (fig. 2). Queste hanno molteplici funzioni: gli enzimi convogliano il flusso di energia nei luoghi adatti; le proteine di sostegno conferiscono resistenza, mentre altre fungono da sensori, cioè da mezzi per il reciproco riconoscimento con quelle parti del genoma coinvolte nella regolazione del flusso d'informazione genetica.

In questo riassunto non c'è nulla di più di quanto è stato descritto attraverso la biochimica, ma va notato che per una migliore comprensione del complesso funzionamento del genoma i ricercatori hanno ritenuto opportuno, o necessario, introdurre termini come «codice» (cioè matrice di trasformazione), «messaggero», «trascrizione» (lo stesso che «translitterazione» dei linguisti), nonché «traduzione» che sono tutti estranei al linguaggio della chimica. È stato persino introdotto il termine di «correttore di bozze» per definire la funzione di «filtraggio del rumore» presente al livello dell'apparato enzimatico che duplica il DNA.

D'altra parte, il fatto che il genoma eroghi i singoli messaggi in rapporto alle condizioni che vigono nell'ambiente cellulare, o nell'ambiente che circonda la cellula, implica che il DNA funga anche da ricevitore di istruzioni specifiche. A livello molecolare il ricevere informazione implica il reciproco riconoscimento tra superfici di Van der Waals complementari: una data sequenza di nucleotidi del DNA da una parte, una molecola proteica dall'altra.

La reale esistenza di questo fenomeno è stata accertata da F. Jacob e J. Monod nel 1961, i quali hanno dimostrato che la sintesi delle proteine del *lac*-operone di *Escherichia coli* viene regolata attraverso l'interazione di una proteina detta *repressore* con la sequenza di nucleotidi del DNA indicata come *gene operatore*: il meccanismo della regolazione è del tipo a «retroazione positiva con fuga a zero». Poco tempo dopo è stato riconosciuto che la sintesi di altri apparati enzimatici è regolata in modo simile, ma non identico, attraverso la congiunzione di un *aporepressore* con un *corepressore* che, così uniti, riconoscono il gene operatore dell'apparato in questione e ne regolano la sintesi. La regolazione avviene attraverso un meccanismo a «retroazione negativa» (fig. 3). In tempi recenti è stata inoltre identificata una vasta famiglia di geni, i geni omeotici (v. OMEOTICI GENI**), che specificano la sintesi di proteine chiave nei processi di morfogenesi. Anche in questo caso dette proteine riconoscono sequenze speciali di nucleotidi del DNA, che fungono da «indirizzi di memoria» e in tal modo promuovono o interrompono determinati processi morfogenetici.

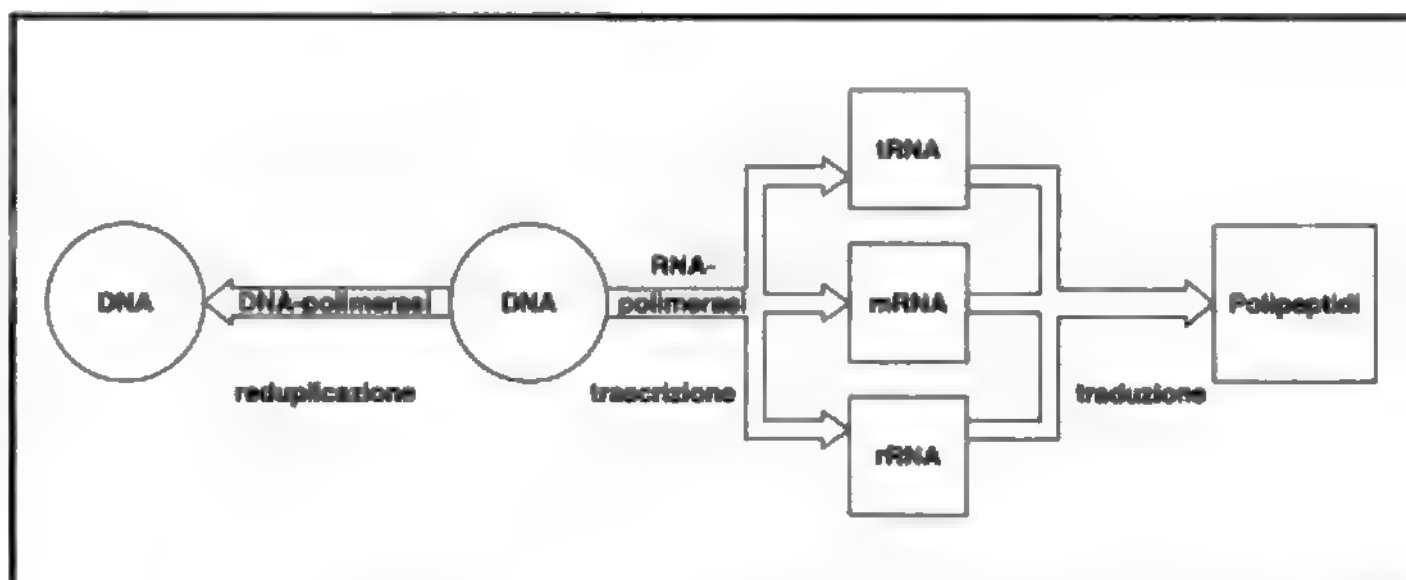
Non è importante interpretare a fondo tutte le reazioni e i processi che si susseguono nel controllo dell'erogazione dell'informazione genetica. È però importante notare due fatti: 1) il genoma *interagisce* con l'ambiente pericellulare *per il tramite di proteine che esso stesso specifica*: repressori, aporepressori, e poi il gruppo delle proteine dei geni omeotici e di altri geni che intervengono nelle varie fasi dello sviluppo embrionale; la *sintesi di queste molecole* ha un modico costo termodinamico poiché per ciascuna specie ne vengono prodotte poche, *ha invece un notevole costo informatico dato che impegna una frazione cospicua del genoma*; 2) queste proteine interagiscono con il gene regolatore secondo il consueto schema della dinamica delle reazioni chimiche, motivo per cui la loro concentrazione nel ristretto ambiente del nucleo o del citoplasma è determinante per i tempi e per il livello sul quale si attesta il controllo.

Le conseguenze di questi due fatti, solitamente trascurati, hanno rilevanza molto grande sia per la genetica, sia per l'evoluzione.

Poiché la proteina di controllo che interagisce col tratto del filamento di DNA è approssimativamente globulare, il rapporto tra la lunghezza del tratto riconosciuto e il volume della proteina di controllo è una funzione cubica. L'esistenza di un simile rapporto ha una conseguenza importante: all'aumentare dei siti controllati le porzioni di genoma deputate a specificare le proteine di controllo crescono come il cubo della lunghezza dei siti.

Ciò implica che, con l'evolversi della complessità di un organismo e dell'affidabilità del suo funzionamento, la quota del genoma che durante l'ontogenesi specifica la quantità e

Fig. 2. Il genoma di una cellula è fonte di un duplice flusso di informazioni. Il canale della sintesi proteica attraverso i processi di trascrizione e traduzione porta al montaggio di catene polipeptidiche (a destra). Il canale della duplicazione porta alla sintesi di un nuovo genoma per la cellula figlia. In questo secondo caso funge da canale e da filtro per il rumore il complesso enzimatico della DNA-polimerasi. Nel primo caso queste funzioni sono svolte dal complesso enzimatico della RNA-polimerasi, dei ribosomi e dell'RNA messaggero.



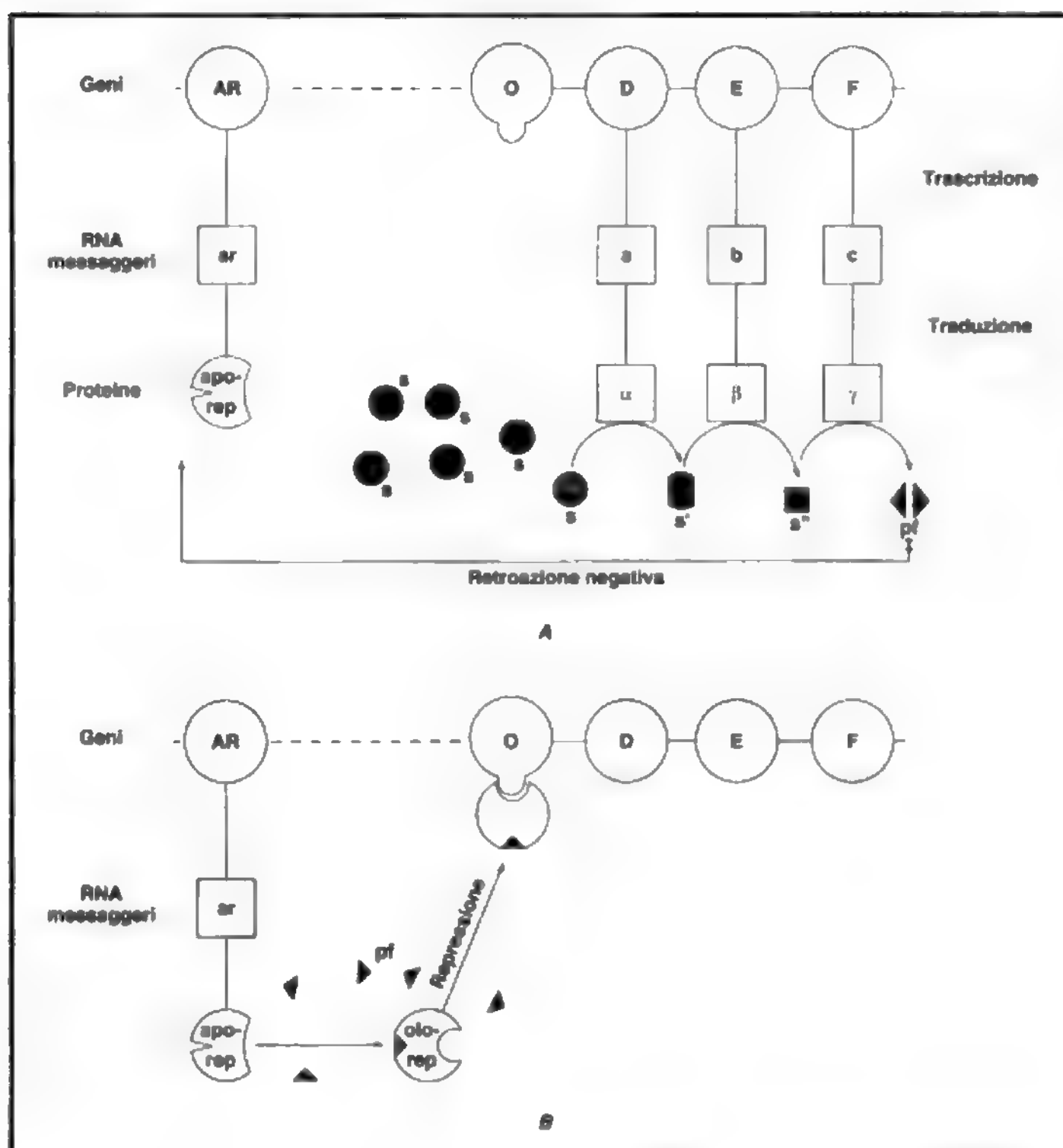


Fig. 3. Modello di regolazione a retroazione negativa di un operone batterico. In A la serie di geni strutturali eroga l'informazione occorrente alla produzione degli enzimi α , β e γ che sintetizzano a partire dal substrato s il prodotto finito pf . Infatti l'apopressore da solo non riconosce il gene operatore O. Quando il prodotto finito ha raggiunto la concentrazione critica (fig. B) esso si comporta da corepressore e modifica l'apopressore in modo tale che esso può interagire col gene operatore riportando così tutto il sistema in condizioni di riposo. AR, gene che specifica la molecola dell'apopressore; α , β , γ , molecole di RNA-messaggero.

la messa in opera delle singole proteine che fungono da pietre costitutive dell'organismo stesso, cresce molto di più del resto. In altre parole: quanto più complesso l'edificio tanto più vasto il progetto dell'architetto rispetto a quello delle fabbriche di materiali per l'edilizia.

Essendo poi il numero di molecole deputate al controllo della erogazione dell'informazione genetica decisivo per l'estrinsecazione delle fondamentali caratteristiche morfologiche, diventa chiaro che detti caratteri non varieranno solo per le mutazioni considerate dalla genetica mendeliana. Esse varieranno anche a seguito delle «mutazioni silenziose» (che riguardano l'impiego di codoni alternativi) e per tutti quegli altri fattori che agiscono sulla velocità di sintesi delle molecole proteiche (v. GENETICA [v. v.*; v.**]).

Questa serie di eventi rende plausibili le variazioni lente e graduali preconizzate da studiosi di genetica ed evoluzione e documentate da studiosi di paleontologia (Simpson, 1944).

Informazione e comportamento

Come è stato accennato all'inizio, un controllo può essere effettuato solo a condizione che esista un comparatore che confronti i dati provenienti dai sensori del sistema con quelli prefissati o con quelli forniti estemporaneamente da altra fonte. Si tratta di una esigenza logica alla

quale non si può sfuggire, anche se si usa parlare di controllo a retroazione, o a *feedback*, come se tutto dipendesse da questa parte del circuito, che non sempre è essenziale.

Infatti il canale informativo che agisce sull'alimentazione del sistema può essere vuoi a retroazione, vuoi a preazione (cioè a *feedforward*). Negli organismi viventi di solito è a retroazione, poiché questa disposizione offre maggiore affidabilità, ma non sono pochi gli esempi di dispositivi a preazione che controllano da soli, o insieme a disposizioni a retroazione, particolari funzioni fisiologiche. I più noti sono i riflessi, condizionati e non condizionati, che tendono a effettuare la correzione nel momento in cui interviene il disturbo, o ancor prima.

Quanto alla retroazione essa può essere negativa o positiva: nel primo caso il dispositivo insiste nel riportare il parametro sotto controllo al valore ottimale; nel secondo caso esso porta a zero lo stimolo che ha innescato la correzione. In fisiologia la retroazione positiva è tipica dei processi digestivi, o comunque distruttivi; la retroazione negativa è propria dei processi che stabilizzano la concentrazione di innumerevoli composti, nonché la concentrazione degli idrogenioni, e dei processi che stabilizzano la temperatura e la quantità delle scorte.

A proposito del controllo sulle scorte è importante notare che i dispositivi corrispondenti segnalano in certo modo

un «bisogno» dell'organismo — sia esso una cellula o un animale pluricellulare — e che il ripristino delle scorte è possibile solo a condizione che l'organismo raggiunga una adatta fonte di rifornimento. I bisogni (intesi come sopra) innescano pertanto programmi di ricerca e debbono essere ritenuti causa del comportamento motorio di ogni sorta di organismi.

Tutti gli organismi mobili hanno comportamenti motori definibili come «intenzionali» in quanto portano l'organismo stesso ad una meta che sarà il cibo, l'acqua, il partner sessuale, o anche — nel caso degli organismi che vivono per più di un ciclo stagionale — ad un ambiente più consono alla sopravvivenza in quella stagione.

Il comportamento animale diretto a un fine, o intenzionale, è stato per lungo tempo un grosso problema concettuale per gli studiosi di etologia (cfr. Thorpe, 1956), ma oggi può essere prospettato come attività motoria controllata, conseguente all'insorgere di un bisogno: in tal modo gli aspetti apparentemente misteriosi vengono meno.

Il programma per raggiungere la meta presuppone il reperimento di segnali sensoriali idonei al soddisfacimento del bisogno che ha innescato il comportamento, dopodiché la traiettoria viene seguita elaborando l'informazione raccolta, secondo moduli logici non diversi da quelli impiegati nel controllo fisiologico; salvo che la regolazione in questo caso agisce sul vettore o sui vettori del sistema. Questa azione si esplica per mezzo di effettori che hanno le stesse caratteristiche di un timone o di uno sterzo. Quanto alle strategie impiegate e all'elaborazione dei segnali (cf. Fraenkel e Gunn, 1961), esse possono venir interpretate nella loro genesi secondo le vedute dell'evoluzione.

Non è il caso di entrare nei dettagli, basterà dire che la regolazione sarà a retroazione negativa nel caso che la traiettoria debba essere parallela a una linea esistente nell'ambiente, o debba formare un angolo fisso con un allineamento dato; sarà a retroazione positiva con «fuga a zero» se si tratta di sfuggire a un predatore o a un fattore nocivo (gas tossico, temperatura troppo alta o troppo bassa); sarà a retroazione positiva, cioè con incremento progressivo dell'intensità del segnale, se si tratta delle ricerche dell'alimento, o del partner per l'accoppiamento (cfr. Waddington, 1966; Piaget, 1967).

Poiché i programmi possibili sono pochi e vincolati dal numero e dal tipo di organi di senso impiegati nel corso della «navigazione», un approccio informatico è di grande aiuto nello studio dell'etologia.

V. anche: BIOLOGIA, *aspetti attuali della biologia*, II, 2301-2313; CIBERNETICA, III, 2183-2193; INFORMATICA [V.; V*]; RECCETTORI [V.; V.*; V.**]; SEGNALI CELLULARI**.

Bibliografia

- Fraenkel G. S., Gurn D. L., *The orientation of animals*, 1961, Dover Publ., New York.
 Gerard B. W., Dwyer J. W. eds., *Information processing in the nervous system*, 1964, Excerpta Medica, Amsterdam.
 Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 318.
 Neumann J. von, *The general and logical theory of automata*, in *Cerebral mechanism in behaviour*, 1951, Hixou Symp., Wiley, New York. Cfr. anche Somenzi V. e Cordeschi R. (a cura di), *La filosofia degli automi*, 1986, Boringhieri, Torino.
 Omodeo P., *Omeostasi*, in *Enciclopedia del 900*, vol. IV, 1975, Istituto dell'Enciclopedia Italiana, Roma, pp. 902-925.
 Omodeo P., *Impiego del concetto di informazione in genetica*, in *Il concetto di informazione nelle scienze della vita*, 1997, Franco Angeli ed., Milano.
 Piaget J., *Biologie et connaissance*, 1967, Gallimard, Paris.
 Simpson G. G., *Tempo and mode in evolution*, 1944, Columbia U.P., New York.
 Thorpe W. H., *Learning and instinct in animals*, 1956, Methuen, London.

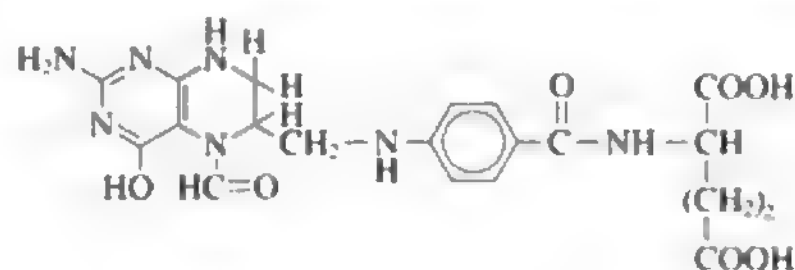
- Waddington C. H., *Principles of development and differentiation*, 1966, Allen & Unwin, New York.
 Wiener N., *Cybernetics*, 1948, Wiley, New York.
 Yockey H. P., Platzman R., Quastler H. eds., *Information Theory in Biology*, 1958, Pergamon Press, London-New York.

PIETRO OMODEO

FOLINICO ACIDO

Sin.: *citrovorum factor*, leucovorin, F. *acide folinique*. - I. *folinic acid*. - T. *Folinicsäure*.

L'acido folinico [ac. f.] o leucovorin (ac. tetraidropteroil-glutamico) è un farmaco che viene impiegato nel trattamento dell'anemia megaloblastica (esclusa l'anemia perniziosa) e ora soprattutto come antidoto degli antagonisti dell'ac. folico, come il metotressato, la pirimetamina e il trimetoprim e comunque nel trattamento dei tumori con altri antiblastici (effetto *rescue*), al fine di ridurre la tossicità. Nel caso di inavvertito sovradosaggio di metotressato, l'ac. f. deve essere immediatamente somministrato possibil-



ac. folinico (leucovorin)

mente entro 1 h: se viene impiegato dopo più di 4 h, il trattamento può non essere efficace.

L'ac. f. può essere anche impiegato per aumentare la citotossicità del 5-fluorouracile nel trattamento del cancro avanzato coloretale (Hansen, 1990), e assieme al mitoxantrone e al 5-fluorouracile nel trattamento del carcinoma mammario metastatico (Colozza *et al.*, 1996).

L'ac. f. è rapidamente assorbito dopo somministrazione orale ed è rapidamente metabolizzato per più del 90% entro 30 min. Se somministrato per via parenterale il metabolismo è minore (circa 66-72%) e più lento. L'inizio dell'azione è dopo 20-30 min per via e.v. La durata dell'azione è di 3-6 h. La via di eliminazione è renale per l'80-90%, fecale per il 5-8%.

L'ac. f. può aumentare le crisi epilettiche, specie nei bambini, per la sua limitazione degli effetti anticonvulsivanti dei barbiturici, idantoinici e primidone.

Le dosi variano come segue:

- a) come antidoto in caso di inavvertita *overdose* di metotressato: 10 mg/m² per via i.m. o e.v.;
- b) come antidoto della pirimetamina e del trimetoprim: 5-10 mg/die;
- c) come antianemico (anemia megaloblastica secondaria a deficienza di folato): 1 mg/die per via i.m.;
- d) in associazione con 5-fluorouracile o con metotressato: la dose, somministrata per via e.v., varia a seconda dei protocolli di terapia ma generalmente è di 150 mg, da somministrare 1 h prima dell'antiblastico.

Bibliografia

- Colozza M., Gori S., Mosconi A. M., *Brest Cancer Res. Treat.*, 1996, **38**, 277-282.
 Hansen R. M., *Arch. Intern. Med.*, 1990, **150**, 2265-2269.
 Martindale *The Extra Pharmacopoeia*, 31 ediz., 1996, Pharmaceutical Press, London, pp. 1040-1041.
 USP DI (Drug Information for the Health Care Professional), 1995, Rockville, pp. 1705-1707.

RFD.

FORMAZIONE PERMANENTE DEL MEDICO

FORMAZIONE PERMANENTE DEL MEDICO

Sin.: formazione continua del medico. *i. continuing medical education.*

SOMMARIO

Il concetto di formazione (col. 2351). - Gli obiettivi della formazione permanente del medico (col. 2352). - Le modalità della formazione permanente del medico (col. 2354). - Le ragioni della formazione permanente del medico (col. 2355). - La valutazione della formazione permanente del medico (col. 2356). - La situazione attuale in Italia (col. 2357).

Il concetto di formazione

Il termine *formazione*, con o senza i suoi vari attributi, fra i quali quelli di *permanente* e di *medica* sono solo due dei tanti, non appartiene ormai più al solo lessico didattico e pedagogico ma chiama in causa molti altri ambiti di conoscenza e di attività (specie in campo psico-sociale) tanto che viene oggi a configurarsi — come dice Riccardo Massa — un *mondo della formazione* che travalica ampiamente gli approcci tradizionali della pedagogia in generale e della pedagogia medica in particolare. Nel contempo si deve segnalare la tendenza della cultura pedagogica più avanzata a riappropriarsi a tutto campo dei vari aspetti dei processi di formazione (come testimoniato dal nuovo corso di laurea in Scienze dell'educazione, nell'ambito di una nuova Facoltà di Scienze della formazione).

È per questo che prima di entrare nel merito della riflessione sullo specifico problema della formazione permanente (o formazione continua) del medico [f.p. del m.], sembra opportuno ricordare i due principali significati concettuali che, secondo la riflessione pedagogica più recente, entrano in gioco nei processi di formazione, intesa come dinamica tra insegnamento e apprendimento.

Si può per questo partire dalla contrapposizione tradizionale tra educazione e formazione. Le ragioni di tale contrapposizione non sono sempre chiare ed evidenti, perché dipendono sovente da presupposizioni di tipo ideologico. Per lo scopo di questa trattazione si potrebbe dire, correndo però il rischio di semplificare troppo il dibattito su questi temi e di mortificare le diverse posizioni al riguardo, che i due concetti indicati differiscono principalmente per due aspetti: la dimensione prevalente su cui essi intervengono e il contesto in cui si realizzano. Il concetto di educazione rinvia infatti alle dimensioni complessive dell'*esistenza umana* (individuale e di gruppo), avendo come intento l'autentica e continua scoperta dei propri vincoli e delle proprie possibilità esistenziali (fisiche, mentali, spirituali). Il contesto nel quale trova cittadinanza è quello dei processi di socializzazione primaria e secondaria. Il concetto di formazione rinvia invece alla dimensione della *competenza umana* (individuale e di gruppo) e in esso si mira all'insegnamento e all'apprendimento di culture, conoscenze, abilità o atteggiamenti determinati. Si colloca quindi sempre all'interno di un contesto organizzato.

Non si deve tuttavia ritenere che queste differenze siano assolute e che di conseguenza i due processi menzionati siano mutuamente esclusivi. Non si dà un autentico intervento formativo senza un'attenzione anche alle dimensioni esistenziali, così come un intervento educativo non può prescindere dalla trasmissione e dall'acquisizione di una qualche forma di competenza. Quella distinzione è dunque valida solo se intesa come sfumata e non nitida e precisa.

Visto in questi termini, anche l'ambito della f.p. del m. acquista una dimensione e una valenza più ampie, che non si possono esaurire nelle uniche prospettive dell'*informazione* e dell'*addestramento* ma che necessariamente devono fare riferimento alle complesse problematiche esistenziali

che sottendono alla costruzione e alla trasmissione di atteggiamenti personali e di un'autentica *cultura medica*. Anzi, il caso della f.p. del m. risulta esemplare sotto il profilo epistemologico e pedagogico proprio perché sta al crocevia di esperienze complesse, relative da un lato all'acquisizione di abilità e di competenze specifiche e dall'altro alla assunzione di attitudini relative a una rielaborazione continua dei propri atteggiamenti di tipo esistenziale. La formazione medica, quindi, chiede e consente di ripensare il concetto di formazione in un orizzonte più ampio e complesso, ponendosi oggi al di fuori della contrapposizione cui si è accennato tra educazione e formazione.

Gli obiettivi della formazione permanente del medico

Da quanto detto si comprende come la definizione in chiave teorica degli obiettivi che caratterizzano la f.p. del m. sia legittimata solo in termini generali, giacché essi vanno sempre calibrati alle situazioni particolari che si affrontano, alle prospettive che si adottano, alle figure professionali che sono di volta in volta coinvolte. In questo senso si possono, generalmente parlando, individuare almeno cinque diversi obiettivi, che tuttavia si devono realizzare sempre unitariamente: il *sapere*, il *saper fare*, il *saper essere*, il *saper apprendere*, e il *saper sapere*. Non è qui il caso di insistere sul fatto che tale distinzione risponde soprattutto a esigenze analitiche ed espositive; nella realtà questi diversi obiettivi andrebbero perseguiti in simultanea armonia.

Il primo obiettivo (*sapere*) si riferisce alla necessaria acquisizione, da parte del formando, delle conoscenze teoriche che costituiscono il fondamento della pratica medica. Esercitare la professione di medico, a qualunque livello lo si faccia, richiede indiscutibilmente un grande bagaglio conoscitivo, sia in ragione dell'elevatissima complessità dell'oggetto di intervento (l'organismo umano nelle sue varie sfaccettature) sia in ragione delle molteplici dimensioni che devono essere tenute in considerazione in questa attività. Una diretta conseguenza di tale comune consapevolezza è rintracciabile nel progetto curricolare delle Facoltà universitarie di Medicina e Chirurgia, dove si è stabilito che il giovane che aspiri a diventare medico debba studiare e dare prova di conoscere una notevole quantità di nozioni che attengono alle più diverse discipline. Naturalmente questo obiettivo (la trasmissione del sapere) è specifico anche della f.p. del m. e non solo di quella di base. Ciò che si apprende, magari anche con notevole investimento di risorse personali, diventa infatti (spesso) rapidamente superato, obsoleto, addirittura scorretto.

Con il secondo obiettivo (*saper fare*) si intende sancire l'importanza che un medico disponga anche di adeguate abilità operative. Fino a pochi anni addietro, e ancora oggi in molte realtà locali, la preparazione universitaria del medico in Italia si era lentamente evoluta nella direzione che privilegia grandemente la preparazione teorica a scapito di quella pratica. Questa impostazione ha raggiunto forme estreme, per le quali si poteva giungere all'assurdo che medici magari anche brillantemente laureati non avessero mai frequentato un reparto clinico durante il corso di laurea e che dal punto di vista tecnico non fossero nemmeno in grado di fare un'iniezione intramuscolare! Ciò ha fatto sì che l'apprendimento della maggior parte del corredo di abilità manuali che ogni medico dovrebbe possedere venisse demandato alle esperienze *post-lauream*, cioè soprattutto alla f.p. del m. Non è possibile soffermarci qui su quali problemi questo abbia finito con l'indurre, sia sul piano dell'adeguatezza delle competenze operative di molti medici sia su quello della strutturazione mentale delle stesse conoscenze teoriche, apprese in ambiente per così dire «asettico» e ripulito da ogni riferimento concreto alla prassi.

È sufficiente questa puntualizzazione per sottolineare da un lato l'importanza che la f.p. del m. si faccia carico anche della preparazione tecnica (o, se si preferisce, manuale) di base (oltre a quella specialistica che le è connaturale) e, da un altro lato, il fatto che i vari obiettivi che abbiamo schematicamente riconosciuto al processo di formazione vengono raggiunti solo se perseguiti unitariamente.

L'opportunità che un medico debba essere in grado di rapportarsi in maniera umanamente adeguata al paziente è espressa dal terzo obiettivo (*saper essere*). Anche in questo caso il ruolo della formazione permanente è decisivo, per almeno due ordini di considerazioni. Anzitutto v'è da registrare una grave carenza, caratteristica soprattutto del passato, della formazione di base anche rispetto a questo fondamentale obiettivo. Ciò investe di particolari responsabilità l'ambito della formazione permanente, che assume di fatto il ruolo di ultimo baluardo a difesa di una convincente e adeguata formazione del medico in Italia. A onor del vero bisogna dire che dal 1989 nel nostro Paese è iniziato un processo di trasformazione, tuttora in atto, delle Facoltà di Medicina e Chirurgia con il chiaro intento di rimediare alle ormai croniche e strutturali deficienze della formazione universitaria. Come in ogni processo di cambiamento, tuttavia, i risultati, soprattutto iniziali, sono sempre inferiori alle attese e ci vorrà presumibilmente ancora molto tempo e lavoro prima che la formazione di base possa vantare da questo punto di vista un elevato e omogeneo livello qualitativo su tutto il territorio nazionale. Il secondo ordine di considerazioni che fa attribuire un ruolo importante alla f.p. del m. anche rispetto all'obiettivo del *saper essere* riguarda la sfera culturale. Nell'età della tecnica si sta sempre più assistendo in medicina all'allontanamento della figura dell'uomo dalla scena clinica, con il conseguente gravissimo impoverimento dell'aspetto relazionale nell'attività del medico. La formazione permanente allora, poiché trova una delle sue principali ragioni d'essere nella necessità di mantenere aggiornati i professionisti proprio rispetto ai nuovi traguardi che scienza e tecnica sono state in grado di raggiungere, rischia di portare essa stessa un paradossale contributo all'impoverimento della pratica medica. Ciò potrebbe infatti avvenire qualora si pensasse di impostare tutte le attività di formazione permanente solo nei termini dell'aggiornamento tecnico.

Ma per diventare (e soprattutto rimanere) buoni medici non è solo necessario possedere molte conoscenze, eccellenti capacità e competenze tecniche, umane e relazionali: si richiedono soprattutto forti motivazioni e tenace costanza. Occorre una continua volontà di imparare e di migliorarsi; volontà che non è innata ma che dipende fortemente da ciò che si è appreso e da come lo si è appreso. E non c'è solo questo aspetto. Oggi il medico è sottoposto ad un vero e proprio bombardamento incessante di informazioni, scientifiche e non, molte delle quali di scarsissima se non nulla validità (per tacere delle vere e proprie pressioni, di natura completamente diversa, ad assumere determinati comportamenti ...). Ne consegue che uno degli obiettivi della formazione del medico, sia essa di base o permanente, deve proprio essere focalizzato sul *saper apprendere*. Su quella capacità, detto in altre parole, di tener vive le motivazioni all'apprendimento e contemporaneamente di saperle soddisfare correttamente, essendo in grado di districarsi con cognizione di causa nella selva di conoscenze in cui il medico è costretto a muoversi.

L'ultimo obiettivo che abbiamo riconosciuto alla f.p. del m. si riferisce alla prospettiva del *saper sapere*. Con essa non ci si vuole riferire ad una specifica capacità; semmai è un modo per indicare l'attitudine epistemologica con cui un soggetto conoscente si pone nei confronti della stessa co-

noscenza. Si tratta di una caratteristica tutt'altro che secondaria, poiché rappresenta la chiave stessa con cui la conoscenza viene utilizzata nella pratica per il perseguimento di specifici fini. D'accordo con quanto affermava Augusto Murri, si può dire che «... senza sapere è impossibile diventare buon medico, ma con tutto lo scibile medico in testa si può essere in pratica un esimio ignorante». Le scienze cognitive insegnano che il ruolo della conoscenza nei processi di risoluzione di problemi è tutt'al più necessario ma certo non sufficiente. Una parte di primo piano spetta alla *rap-presentazione mentale* della realtà e di ciò che di essa si conosce o, se si preferisce, alla *strutturazione mentale* delle conoscenze. È proprio in questa caratteristica metacognitiva che si precisa quello che ho definito *saper sapere*.

Si potrebbe forse aggiungere che, fra tutti gli obiettivi analizzati, gli ultimi due risultano essere i più ambiziosi, ma anche i più importanti. In accordo con quanto sostenuto dalla scienza pedagogica, infatti, il processo formativo va inteso non come lo sforzo di imporre dall'esterno una forma precostituita a un individuo, ma piuttosto come il tentativo di consentire e promuovere la maturazione di tutte le sue potenzialità positive, all'interno di una data prospettiva (nel nostro caso l'esercizio della professione medica). Se si accetta questa definizione, diventa del tutto evidente che un autentico processo formativo deve essere finalizzato prima di tutto a fornire agli individui i mezzi per raggiungere una adeguata autonomia di giudizio e di scelta.

Ciò tuttavia, sia detto con precisa chiarezza, non significa affatto teorizzare l'indipendenza di ogni medico nella sua pratica professionale dalle conoscenze disponibili. Al contrario, significa sostenere che egli debba essere così ben consapevole delle possibilità e dei vincoli delle conoscenze e delle tecniche mediche da poter prendere, volta per volta, decisioni corrette.

Le modalità della formazione permanente del medico

La formazione è generalmente considerata una pratica consapevole, intenzionale, finalizzata, organizzata e controllata; e in effetti molto spesso è proprio così, o perlomeno così intenderebbe essere. È però opportuno riconoscere che esiste, ed è tutt'altro che marginale, anche una pratica formativa latente, inconsapevole, occasionale e incontrollata. Si tratta, ad es., del modello dell'*imparare a bottega*, dell'*imparare in-situazione*, dove l'apprendimento non è strutturato ma pur presente, veicolato dall'imitazione, dall'esempio, dal provare a fare, dal risolvere problemi pratici, etc. In questi modelli di formazione la curva di apprendimento è tipicamente molto ripida all'inizio ma raggiunge altrettanto velocemente un *plateau* e, se il processo non è supportato da altre azioni, può addirittura subire un generale decremento.

In questa sede interessa occuparci della f.p. del m. in quanto pratica consapevole e intenzionale; tuttavia questo richiamo ci è parso doveroso perché tale pratica si sovrappone sempre a quella inconsapevole e con essa deve fare i conti. Ciò che si è appreso nel corso del *mestiere*, infatti, si sedimenta spesso come automatismo difficile da mettere in discussione (e da correggere qualora si dimostrasse sbagliato o non ottimale), perché diviene parte importante dell'autocomprensione della propria identità professionale.

Venendo alla specifica riflessione sulle modalità della f.p. del m., occorre distinguere due aspetti: quello della *progettazione formativa* e quello della *azione formativa*. Ancora una volta si tratta di una distinzione che non deve essere presa alla lettera, nel senso che i due aspetti non possono non essere strettamente correlati e in gran parte simultanei.

È possibile individuare tre momenti principali attraverso cui scandire sia la progettazione sia l'azione formative: l'analisi delle condizioni iniziali, la definizione degli obiet-

tivi principali, la scelta dei mezzi e delle strategie metodologiche da impiegare. A questi si può aggiungere, soprattutto se ci si colloca in ambito di ricerca, la precisazione dei criteri per valutare gli esiti del processo stesso (v. sotto).

Per analisi delle condizioni iniziali si intende la valutazione dei bisogni formativi, delle aspettative, delle risorse disponibili, dei prerequisiti, etc. che si trovano come riferimento di partenza per il processo formativo. Organizzare un intervento di formazione svincolato dalle contingenze in cui si trovano i destinatari dell'intervento stesso aumenta vertiginosamente il rischio di fallire. Ecco perché, per fare solo un esempio, non possono essere ritenuti convincenti i pacchetti didattici preconfezionati e omologati, neppure quelli più attentamente progettati e allestiti.

Il secondo momento che va progettato e che va realizzato è quello della definizione degli obiettivi che si vogliono perseguire. A questo proposito si è già detto molto nel paragrafo precedente, a cui si rimanda. Va solo aggiunto che deve essere sempre fatto uno sforzo per rendere quelle indicazioni di carattere generale pertinenti e consone alle singole situazioni particolari.

Infine, vi è il momento della progettazione e dell'attuazione delle diverse strategie formative. Qui si fa riferimento sia agli aspetti interattivi, intesi come stili comunicativi e di relazione, sia alle vere e proprie tecniche e modalità di insegnamento e formazione. Affrontare qui in dettaglio tutti questi aspetti richiederebbe molto più dello spazio a disposizione e d'altra parte non rientra neanche negli scopi di questa breve trattazione, per cui si rimanda ai numerosi testi prodotti al riguardo.

Le ragioni della formazione permanente del medico

L'esigenza di una valida f.p. del m. è un dato di fatto inequivocabile, le cui ragioni sono così tante e variegiate da far sorgere il dubbio, nel tentativo di una loro elencazione, di dimenticarne qualcuna.

Il primo elemento, che sta davanti agli occhi di tutti, si riferisce di certo alla già citata rapidissima evoluzione delle conoscenze e delle tecniche disponibili. Non c'è bisogno di fare esempi specifici; basti pensare, per dare solo qualche cifra, che solo sull'archivio bibliografico MEDLINE, uno dei tanti specializzati nelle scienze bio-mediche, sono indicizzate circa 3800 diverse riviste scientifiche, per un totale di più di 350.000 articoli all'anno!

All'enorme produzione di conoscenze e di tecniche si aggiungono poi l'effetto *oblio* e l'effetto *lacuna ereditata*. Il primo è accentuato vieppiù dalla complessità e dalla vastità delle stesse conoscenze di base, ed è responsabile del naturale deterioramento qualitativo delle prestazioni, in particolare quando non si mantenga uno studio costante. Il secondo si riferisce alla possibilità di aver ricevuto una formazione di base inadeguata, almeno per qualche sua parte. È chiaro che quando si deve non solo far passare nuovi messaggi ma anche correggere vecchie abitudini e credenze, l'impegno diviene assai più gravoso.

Ma non è solo la prospettiva del tenersi aggiornati che rende ineliminabile l'esigenza di una formazione continua del medico, vi sono importantissime ragioni anche sui versanti dell'organizzazione del lavoro e delle più vaste dinamiche sociali.

Rispetto all'organizzazione del lavoro bisogna anzitutto osservare che, nel mondo della sanità, essa può vantare un elevato livello di complessità, sia per le diversissime tipologie di malati, sia per la presenza di molte figure professionali coinvolte, sia per l'esigenza di adeguate e spesso sofisticate strutture. Ciò rende l'organizzazione stessa più fragile e critica e induce l'esigenza di mantenere un programma di formazione permanente del personale.

Per di più, l'organizzazione sanitaria, soprattutto quando ci si riferisce al lavoro del medico, è caratterizzata da una spiccata autonomia periferica nei processi decisionali, il che se da un lato distribuisce le responsabilità, dall'altro obbliga a tenere alto il livello qualitativo dei singoli professionisti. Se poi a questo si aggiunge il dato secondo cui dai medici dipende l'80% della spesa sanitaria, si può ben comprendere l'impossibilità di rinunciare a una qualche forma di controllo, soprattutto quello indiretto che si ottiene attraverso la loro continua formazione.

Ancora si può aggiungere, per il medico di oggi, l'importanza di lavorare in stretta collaborazione e sinergia con altre figure professionali. Una simile capacità non è innata ma va appresa e perseguita continuamente. Anche a questo la formazione permanente deve saper dare una risposta.

Come è già stato detto, esistono anche importanti ragioni di ordine sociale (e politico) che giustificano l'esigenza di una buona f.p. del m. Non c'è neppure bisogno di ricordare l'entità degli investimenti che, soprattutto nelle società occidentali, si fanno annualmente sulla sanità, per sottolineare la grande responsabilità sociale che i professionisti coinvolti, e in particolare i medici, hanno a questo riguardo. Ma il bisogno di formazione continua non viene solo dall'esigenza di far fronte alla elevata responsabilità di questa categoria di professionisti, esiste anche la complessa problematica relativa alla variabilità e ancor più al continuo mutamento dei bisogni e delle richieste di salute della popolazione.

Di fronte a una simile situazione è del tutto ovvio che un programma di formazione continua diviene addirittura fondamentale per una convincente pratica professionale.

La valutazione della formazione permanente del medico

Se dunque la f.p. del m. riveste un'importanza cruciale nel panorama della sanità pubblica e privata, come risulta evidente da quanto detto nei paragrafi precedenti, la valutazione della sua qualità emerge come un'esigenza che non può essere disattesa. Ciononostante non esistono molti esempi in letteratura di simili valutazioni e, per di più, gran parte di essi prestano il fianco a critiche importanti.

C'è infatti la diffusa tendenza, in medicina, a intendere gli interventi formativi come azioni mirate a far assumere, ai professionisti di volta in volta coinvolti, specifici comportamenti considerati ottimali in determinate situazioni. In questo modo l'obiettivo della formazione perde del tutto la sua connotazione epistemologica (basata quindi e comunque su di un *sapere*) e si cortocircuita sul semplice *fare*. La valutazione viene così subordinata alla verifica dell'adozione di protocolli o linee-guida di comportamento da parte dei medici o, addirittura, all'analisi dell'effettivo ottenimento dei benefici effetti sulla salute dei pazienti, che dovrebbero direttamente discendere, secondo un'ottica a dir poco vetero-positivista, dall'adozione di quegli stessi protocolli.

Come si vede, una simile impostazione è davvero molto lontana dalle elaborazioni delle moderne scienze dell'educazione e non pare, sotto questo aspetto, del tutto convincente. La spesso dichiarata, quando non addirittura vantata, indipendenza del mondo della formazione (in particolare medica) dalla pedagogia non sembra essere stata, almeno per la medicina, un grande affare.

La prima questione che va dunque risolta è senza dubbio riferibile alla scelta degli indicatori da considerare per esprimere un giudizio di qualità. Mutuando quanto viene fatto in ambito di valutazione dell'assistenza sanitaria, si possono distinguere indicatori di *struttura* (ciò che si ha a disposizione per la formazione), di *processo* (ciò che viene fatto nella formazione) e di *esito* (ciò che si ottiene dalla

formazione). Accettando in linea generale questa impostazione come utile griglia di lettura, si tratta di entrare nel merito dei singoli indicatori per ognuna di tali tipologie, nonché delle modalità per la loro rilevazione. Sebbene non sia possibile fare una trattazione dei pro e dei contro dei singoli indicatori utilizzabili svincolata dalle situazioni specifiche, si può senz'altro affrontare il discorso almeno sulla loro natura.

A proposito degli indicatori di esito, che sono quelli più utilizzati in letteratura, l'approccio che appare più corretto e convincente è quello di fare riferimento agli obiettivi individuati e riconosciuti per il processo formativo del medico. Andrebbero quindi elaborati e validati indicatori per valutare quanto si è ottenuto in termini di *sapere*, *saper fare*, *saper essere*, *saper apprendere* e *saper sapere*, naturalmente con la principale preoccupazione di sceglierli in modo che siano pertinenti e adeguati alle singole situazioni particolari.

Anche rispetto agli indicatori di processo conviene fare riferimento a quanto detto sulle modalità della f.p. del m. In particolare, parrebbe opportuno valutare le modalità con cui si sono affrontati, sia in termini di progettazione sia in termini di azione formativa, i tre momenti principali individuati: l'analisi delle condizioni iniziali, la definizione degli obiettivi formativi, i mezzi e le strategie pedagogiche impiegate.

Infine, l'analisi della struttura andrebbe condotta attraverso due scansioni principali: il *setting* e le risorse umane disponibili (sia in termini di formatori sia in termini di formandi).

Anche in questo caso andrebbe fatto uno sforzo per non disarticolare il giudizio nelle sue singole parti ma, al contrario, per leggere unitariamente i dati disponibili in una valutazione qualitativa complessiva.

Un'ultima considerazione va riservata alle modalità di rilevazione degli indicatori. La valutazione formale dei processi di formazione permanente in medicina sembra ormai appartenere in esclusiva al mondo della epidemiologia. Ma se è sicuramente importante che una simile attività venga condotta attraverso un ragionare per popolazione e, all'interno di esso, seguendo una rigorosa metodologia epidemiologica, sarebbe altrettanto importante che ad esso venisse affiancato anche un approccio per individuo. A riprova di questo stanno quelle poche ma altamente significative esperienze di valutazione della formazione del medico effettuate attraverso un dispositivo clinico. Questo solo, infatti, può catturare anche le più nascoste o latenti dinamiche relazionali, così importanti e centrali in qualsiasi processo formativo.

La situazione attuale in Italia

L'entrata in vigore del decreto legislativo n. 502/1992, con le successive modifiche, sul «riordino della disciplina in materia sanitaria» ha cambiato radicalmente l'assetto del Servizio Sanitario Nazionale italiano. Non è certo questa la sede in cui entrare nel merito dei cambiamenti introdotti: ciò che interessa qui sottolineare è la grande attenzione che si è cominciato a riservare alla valutazione e al miglioramento della qualità del Servizio Sanitario stesso. Si tratta, per il discorso che stiamo affrontando, di una questione di grande importanza, giacché è proprio a partire da questo rinnovato interesse per la qualità dell'assistenza sanitaria che la problematica della f.p. del m. (e più in generale del personale sanitario) sta cominciando ad ottenere l'attenzione che merita.

Alla fine del 1996 sono stati definitivamente approvati il nuovo contratto nazionale della dirigenza medica nonché le convenzioni per i medici di medicina generale e per i pe-

diatri di base. A dimostrazione di quanto affermato, si può notare che in questi contratti è stato riservato un ampio spazio alla trattazione delle questioni relative all'aggiornamento professionale, alla partecipazione alla didattica e alla ricerca finalizzata e, da questo punto di vista, sono presenti diversi aspetti di rilievo.

Innanzitutto l'Azienda o l'Ente deve costituire un apposito fondo per le attività di aggiornamento e formazione professionale. In questo fondo confluirà, fra l'altro, una quota delle risorse disponibili che l'Azienda o l'Ente ha il compito di stabilire su base annuale. Ciò dovrebbe rappresentare una forma di tutela e di garanzia per le attività formative, in quanto le risorse ad esse destinate verranno gestite autonomamente rispetto alle altre voci di spesa delle Aziende o degli Enti.

Per quanto riguarda le iniziative formative vere e proprie, esse sono inquadrare (relativamente ai medici ospedalieri) entro due modalità: quelle obbligatorie e quelle facoltative. È interessante notare che, anche rispetto alla formazione obbligatoria, si parla ora di *processi formativi*, rimandando quindi all'idea di una più coerente e razionale progettualità educativa. Ciò è ancora più evidente se si considera che tali percorsi formativi possono essere anche individuali e quindi contrattati con l'Azienda o l'Ente dai singoli professionisti sulla base delle personali esigenze, inclinazioni e aspirazioni.

Anche la precisazione dell'orario di lavoro evidenzia la posizione di privilegio che è stata riservata al problema della formazione. Quattro delle trentotto ore settimanali sono infatti destinate per contratto ad attività non assistenziali quali l'aggiornamento professionale, la partecipazione ad attività didattiche e l'attività di ricerca finalizzata.

Più interessanti ancora risultano gli articoli relativi all'aggiornamento obbligatorio e facoltativo e alla formazione permanente delle convenzioni per i medici della medicina generale e per i pediatri di base. Qui si prevede, anche e soprattutto per la formazione obbligatoria, un'accurata analisi dei bisogni formativi sia dei Servizi sia dei medici sia della comunità. Non solo. Si fa anche esplicito riferimento a una didattica basata sull'apprendimento per obiettivi, organizzata in piccoli gruppi, nonché a idonee modalità di valutazione della qualità dei corsi stessi. Infine, sono espressamente previste iniziative per la formazione dei formatori, i cosiddetti *animatori di formazione* per i quali, per di più, esistono ora gli albi professionali regionali.

Tutto ciò non può che essere visto positivamente, nella speranza che anche in Italia, come avviene già in altri Paesi, una f.p. del m. di qualità, adeguata alle esigenze di tutte le parti in causa nel panorama assistenziale, divenga un obiettivo primario del Servizio Sanitario Nazionale così come della classe medica nel suo complesso.

Bibliografia

- Beccastrini S., *La formazione permanente nei servizi sociali e sanitari*, 1996, Angeli, Milano.
- Bertolini P., *Dizionario di pedagogia e scienze dell'educazione*, 1996, Zanichelli, Bologna.
- Bertolini G. (a cura di), *Diventare medici. Il problema della conoscenza in medicina e nella formazione del medico*, 1994, Guerini Studio, Milano.
- Bertolini G., Massa R. (a cura di), *Clinica della formazione medica*, 1997, Angeli, Milano.
- Cox K. R., *Insegnare la Medicina*, 1988, Raffaello Cortina, Milano.
- Demetrio D., *L'educazione nella vita adulta*, 1995, NIS, Roma.
- Martin A., Ghetti V. (a cura di), *La formazione del medico in Italia oggi. Situazione e prospettive*, 1992, Angeli, Milano.
- Massa R. (a cura di), *La clinica della formazione*, 1992, Angeli, Milano.
- Nordio S., *Quali pensieri in medicina, Pluriverso*, 1996, 5, 109-119.

GUIDO BERTOLINI

SOMMARIO

Trattamento cruento: aspetti innovativi (col. 2359): *Nuovi chiodi endomidollari. - Nuovi tipi di placche. - Protesizzazione immediata in fratture articolari. - Materiali di osteosintesi - riassorbibili. - Materiali di osteosintesi a «memoria di forma». - Monitoraggio estensimetrico del callo osseo. - Induzione del callo osseo. - «Cemento biologico».*

Trattamento cruento: aspetti innovativi

Nel corso degli ultimi anni la ricerca tecnologica ha portato ad alcune innovazioni significative nell'ambito del trattamento cruento delle fratture ossee, in particolare relativamente a nuovi strumenti e nuovi materiali per l'osteosintesi, nonché a nuove metodologie di induzione e di monitoraggio della formazione del callo osseo.

Nuovi chiodi endomidollari

Nel precedente volume di aggiornamento (1991) sono già stati descritti i chiodi tipo Kuntscher e i chiodi bloccati tipo Grosse-Kempf per la riparazione di f. diafisarie di ossa lunghe. Nuovi modelli si sono nel frattempo resi disponibili e sono entrati nell'uso corrente; se ne descrivono alcuni a scopo esemplificativo (fig. 1).

I chiodi «gamma» realizzati dalla scuola di Strasburgo (Grosse e Taglang, 1989) permettono la sintesi endomidollare a cielo chiuso delle f. laterali e sottotrocanteriche del femore, con un montaggio che può essere stabilizzato mediante una vite distale di bloccaggio. Il chiodo «a fascio» per femore e tibia, ideato da Marchetti e Vicenzi (1992), è bloccabile prossimalmente in modo tradizionale, ma è costituito distalmente da un fascio di elementi precaricati elasticamente che, liberati nel corso della introduzione, si allontanano tra loro stabilizzando la f.; ne deriva una sintesi stabile, ma elastica, tale da indurre una rapida callificazione, prevalentemente periostale. Chiodi endomidollari sono disponibili anche per le ossa lunghe dell'arto superiore; la via di introduzione e le soluzioni adottate per l'eventuale bloccaggio variano da modello a modello.

In generale le varie tecniche di inchiodamento endomidollare (quelle descritte e altre in progressiva diffusione) si propongono il trattamento della f. a cielo chiuso, con rispetto e stimolo della riparazione periostale. Vantaggio non secondario è poi la precoce possibilità di ripresa dei movimenti articolari e del carico.

Nuovi tipi di placche

L'introduzione dell'osteosintesi «stabile» con placche e viti ha costituito negli anni settanta un fondamentale momento



Fig. 1. Chiodi endomidollari per il trattamento di f. diafisarie. A sinistra: chiodo «GAMMA-lungo» in f. di femore complicata da f. mediocervicale; al centro: chiodo «a fascio» in f. di tibia; a destra: chiodo «CLOS» bloccato in frattura di omero.

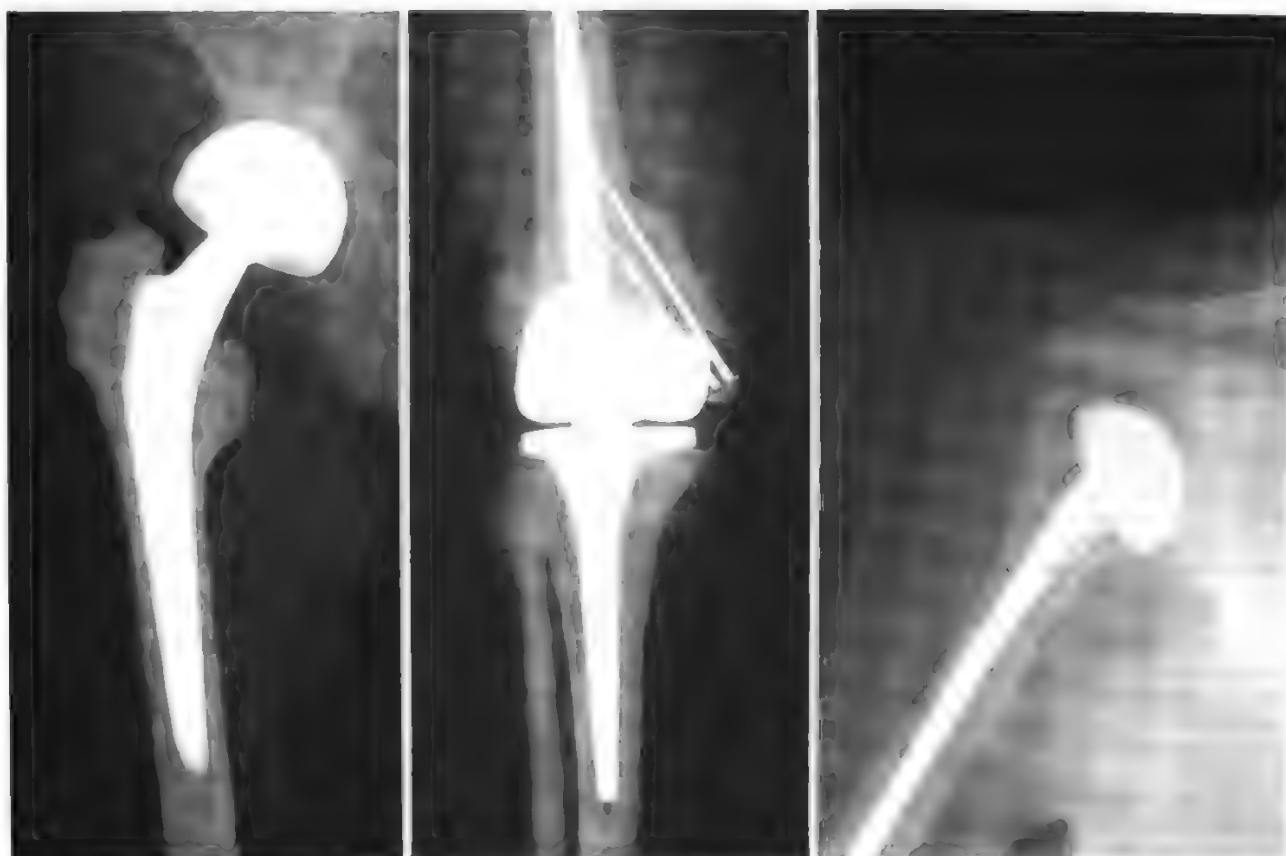


Fig. 2. Protesi articolari per il trattamento di f. epifisarie in pazienti anziani. A sinistra: endoprotesi d'anca a cupola mobile in f. basicervicale di femore; al centro: protesi di ginocchio vincolata in f. sovraintercondiloidea di femore; a destra: protesi di spalla in frattura-lussazione della testa omerale.

di crescita per la chirurgia riparatrice delle ossa; tali mezzi di sintesi restano tutt'oggi componente indispensabile, anche se non unica, del complesso di strumenti tecnologici che occorrono al chirurgo ortopedico. Tuttavia la comprensione dei limiti biologici di tali materiali sta portando a tentativi di miglioramento strutturale degli stessi. Ad esempio placche a «flessibilità variabile» (cioè meno rigide alle estremità per evitare il brusco passaggio delle forze di carico all'osso), placche «aderenti» (cioè con superfici rugose per migliorare l'aderenza all'osso, senza danneggiarne il trofismo), placche «osteconduttrici» (cioè rivestite di materiali che dovrebbero stimolare la crescita ossea, come l'idrossiapatite o il fosfato tricalcico).

Il tempo e la ricerca diranno dei reali vantaggi di tali innovazioni.

Protesizzazione immediata in fratture articolari (fig. 2)

Alcune f. articolari possono presentare difficoltà di consolidazione, rischi di necrosi ossea, gravi esiti invalidanti (rigidità, artrosi post-traumatica).

Le f. del collo del femore in paziente anziano già da anni sono abitualmente trattate mediante la sostituzione della testa femorale distaccata con protesi articolari parziali o totali. Più recentemente la sostituzione protesica viene utilizzata per gravi f. articolari di ginocchio, in particolare sovra-intercondiloidee femorali; ciò sempre in caso di pazienti di non giovane età (oltre ai 50-55 anni), soprattutto se in presenza di pregressa degenerazione artrosica dell'articolazione.

Anche nel caso di importanti f. della spalla (comminute, f. lussazioni, etc.), la sostituzione protesica dell'epifisi omerale prossimale è un tipo di trattamento che si sta diffondendo con successo; in tale caso l'intervento può essere proposto anche a pazienti in età meno avanzata (40-50 anni), stante le minori richieste meccaniche a cui è sottoposto l'arto superiore. Piccole protesi articolari sono disponibili anche per gravi f. che coinvolgono le articolazioni metacarpo-falangee ed interfalangee, quando per particolari esigenze lavorative sia troppo grave un esito con limitazione del movimento articolare.

Materiali di osteosintesi «riassorbibili»

La ricerca tecnologica ha realizzato mezzi di sintesi in materiali biodegradabili (polimeri dell'acido lattico); sono disponibili cambre, viti e lastre per la realizzazione intraoperatoria di placche. Questi prodotti vengono solitamente utilizzati per il trattamento di f. di piccoli segmenti ossei. Tali materiali hanno proprietà meccaniche che sono simili a quelle dell'osso e che si conservano per un tempo minimo di circa tre mesi, di solito sufficiente per la guarigione della f. in trattamento. Dopo tale periodo inizia un progressivo processo di riassorbimento, con contemporanea sostituzione da parte di nuovo tessuto osseo. Il processo di riassorbimento può durare fino a tre anni dall'impianto e avviene per idrolisi, con progressiva trasformazione in composti intermedi, fino all'eliminazione attraverso il ciclo di Krebs.

Il vantaggio di tali prodotti è quello di evitare un secondo intervento di rimozione dei mezzi di sintesi; il limite consiste nel fatto che la loro utilizzazione deve essere riservata solo a f. per le quali si preveda sicuramente la guarigione entro i tre mesi nei quali è garantita la tenuta meccanica del materiale.

Materiali di osteosintesi «a memoria di forma»

Per «memoria di forma» si intende la capacità di alcuni recenti mezzi di sintesi di variare e poi recuperare la propria forma sotto particolari stimoli termici. Questo fenomeno è possibile per alcune leghe metalliche che possiedono due strutture cristalline differenti con due coefficienti di dilatazione diversi. In chirurgia traumatologica sono disponibili «graffe» in lega di nichel e titanio che a temperatura ambiente si presentano dure e resistenti, mentre variando intraoperatoriamente la loro temperatura diventano duttili e malleabili tanto da poter essere allargate e distese. Dopo il posizionamento delle «graffe» a ponte sulla f., il ritorno alla temperatura originaria determina il recupero della forma primitiva, con chiusura delle «graffe» stesse e conseguente effetto compressivo sulla rima di f. Sono disponibili «graffe» che diventano malleabili se raffreddate a meno di 0 °C e ritornano dure a temperatura ambiente (memoria di forma «a freddo»), così come «graffe» aperte a temperatura ambiente che si chiudono se riscaldate (memoria di forma «a caldo»). Tali mezzi di sintesi sono indicati nel trattamento di f. di piccole ossa, tipicamente dello scafoide carpale (fig. 3).

Monitoraggio estensimetrico del callo osseo

Nel caso una f. di ossa lunghe sia trattata con fissatori esterni (FRATTURE*, coll. *3280-3281), è oggi disponibile la tecnologia di monitoraggio della consolidazione del callo osseo, mediante l'applicazione di *sonde estensimetriche*. Tali strumenti vengono applicati ai controlli ambulatoriali periodici e rilevano, ad es. durante l'esecuzione di alcuni passi, la deformazione del complesso fissatore esterno più segmento osseo, sottoposto al carico. Il segnale viene

inviato ad un computer che fornisce curve caratteristiche di deformazione nel tempo; lo studio di tali dati fornisce informazioni oggettive sulla progressiva ripresa di resistenza meccanica del callo osseo, cioè, in abbinamento alle tradizionali metodi di studio per immagini (radiografia, ecografia), della sua guarigione.

Induzione del callo osseo

Allo scopo di evitare i casi di ritardo di consolidazione ossea, in caso di f. difficili da guarire, sono talora utilizzati mezzi fisici di stimolo alla formazione del callo osseo, come i campi magnetici pulsati (*magnetoterapia*). Di più recente introduzione è l'applicazione a tale scopo della *litotripsia extracorporea*; essa si basa sull'applicazione di onde d'urto di tipo elettro idraulico con conseguente formazione di numerosi frammenti ossei e di microfissurazioni a livello delle estremità della f.; si ha quindi un aumento della superficie ossea trattata, nonché dell'apporto ematico locale. Tutto ciò comporta un effetto di stimolazione sulla rigenerazione ossea che conduce ad un più veloce consolidamento.

«Cemento biologico»

Si è recentemente diffusa la notizia di una nuova possibilità di trattamento delle f. ossee mediante l'iniezione percutanea nel focolaio di f. di una sostanza che agirebbe da «collante biologico» a presa rapida, con successiva progressiva sostituzione con osso normale.

Tale materiale, ideato negli U.S.A. e sperimentato anche in altre nazioni, è una pasta di fosfato di calcio immersa in una soluzione di fosfato di sodio; appena preparato esso va iniettato nella sede di lesione (in anestesia locale), quindi inizierebbe il processo di solidificazione (completa in circa 10 minuti) durante il quale la f. va mantenuta ridotta con l'ausilio dell'amplificatore di brillanza. L'immediata consolidazione del focolaio di f. eviterebbe o ridurrebbe al minimo l'uso di mezzi di sintesi metallici interni, così come di apparecchi di immobilizzazione esterni. Inoltre indagini sperimentali su animali avrebbero dimostrato una progressiva sostituzione nel tempo di tale materiale con osso nor-

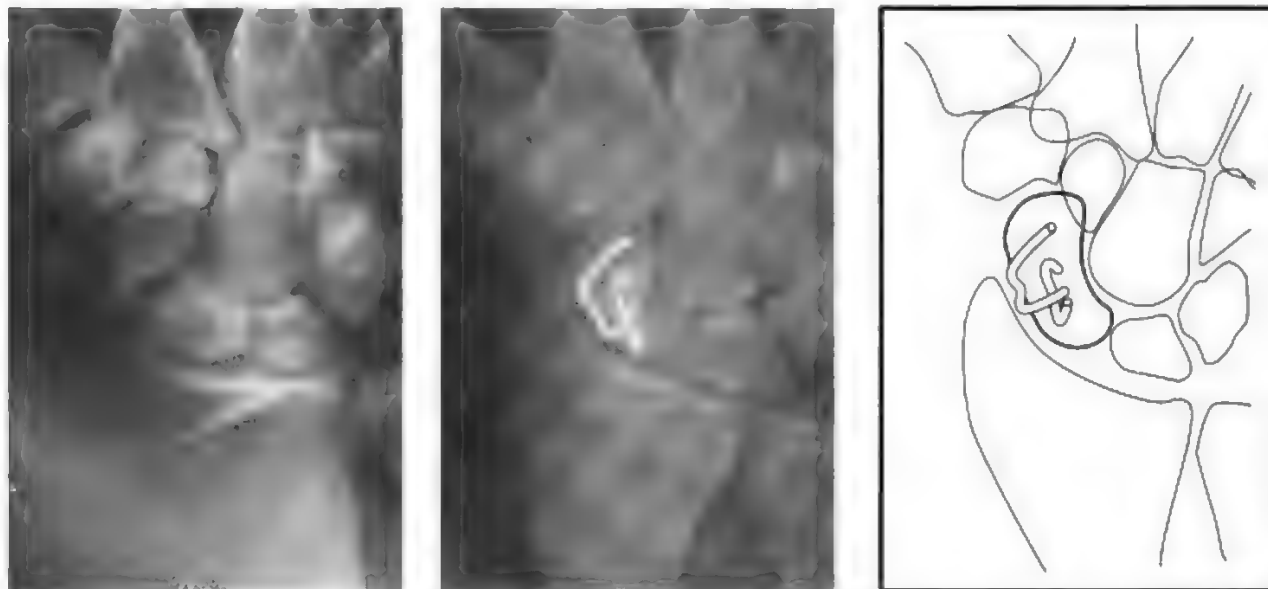


Fig. 3 A sinistra: f. di scafoide carpale in ritardo di consolidazione; al centro: trattamento mediante trapianto autoplastico cortico spungioso e sintesi con «due graffe a memoria di forma, a caldo»; a destra: rappresentazione schematica.

male; i minerali costituenti, identici a quelli del tessuto osseo, verrebbero riassorbiti dall'organismo.

Bibliografia

- Bell K. M., Johnstone A. J., Court-Brown C. M., Hughes S. P. F., *J. Bone Joint Surg.*, 1992, **74-B** (3), 400.
 Bocchi L., Canigga M., Maniscalco P., *Il chiodo endomidollare bloccato CLOS: un nuovo mezzo di sintesi per le fratture diafisarie di omero*. Atti VI Congresso CIOD, Sesto di Pusteria, Febb. 1995.
 Cella R., Perissinotto A., *Strain analysis*, in «*Advances in Ilizarov apparatus assembly*», 1994, Medicalplastic Ed., Milano.
 Grosse A., Taglang G., *Gamma locking nail. Tecnica chirurgica*, 1989, Howmedica.
 Haster-Bensmann G., Baumgart T., *New material for implantation in orthopedic surgery*. Part II in, *Current concepts of internal fixation of fractures*, 1980, Springer Verlag, New-York, 127.
 Marchetti P. G., Vicenzi G., *The universal elastic «bundle» nail*, 1992, Masetti Ed., Bologna.
 Meyrueis J.-P., Cazenave A., Zimmermann R., Meyrueis J., *Matériel d'ostéosynthèse. Vis et plaques*, Editions Techniques, *Encycl. Méd. Chir.* (Paris-France), Techniques chirurgicales - Orthopédie-Traumatologie, 44-015B, 1995.
 Neer II S., *Chirurgia della spalla*, 1992, Verduci, Roma.
 Ricciardi L., Perissinotto A., Dabalà M., *Morfologia ecografica evolutiva del callo osseo e sua correlazione meccanica*, *Giornale Ital. Ortopedia e Traumatologia*, 1992, **XVIII** (2), 231-238.

FRANCO GHISELLINI E REMO CELFA

FRIEDREICH, MALATTIA DI [v. vol. VI, coll. 2004-2007]

SOMMARIO

Definizione (col. 2365). - **Etiopatogenesi** (col. 2365). - **Anatomia patologica** (col. 2366). - **Sintomatologia** (col. 2366). - **Decorso e prognosi** (col. 2366). - **Diagnosi** (col. 2366). - **Terapia** (col. 2367).

Definizione

La malattia o atassia di Friedreich è una malattia genetica dovuta ad un processo degenerativo spino-cerebellare che si manifesta con atassia progressiva del tronco e degli arti, disartria, e grave deficit delle sensibilità profonde. Si associa frequentemente a cardiomiopatia e diabete mellito.

Etiopatogenesi

La malattia è trasmessa con modalità autosomica recessiva. La frequenza stimata dei portatori sani nella popolazione europea è di 1/120 e la prevalenza dei malati è di 1/50.000 (Skre *et al.*, 1975; Romeo *et al.*, 1983). Il gene responsabile della malattia è localizzato nella regione cromosomica 9q13-21.1 (Hanauer *et al.*, 1990) e codifica per una proteina, denominata *fratassina*, presente nei tessuti selettivamente colpiti dalla malattia: midollo spinale, cuore, fegato, pancreas e muscoli scheletrici (Campuzano *et al.*, 1996). La *fratassina*, la cui precisa funzione è al momento ignota, è con molta probabilità una proteina mitocondriale (Koutnikova *et al.*, 1997; Wilson e Roof, 1997; Babcock *et al.*, 1997). Nei malati la mutazione più frequente è costituita dalla espansione di una sequenza di trinucleotidi GAA ripetuti, localizzata in uno degli introni. Negli alleli normali il numero di ripetizioni varia da poche unità a qualche decina, mentre gli alleli espansi possono contenere svariate centinaia di copie. L'espansione determina una ridotta espressione dell'mRNA, interferendo col processo o di trascrizione del gene o di maturazione del trascritto primario. In alcuni casi sono state descritte anche mutazioni puntiformi del gene, costituite da singole sostituzioni aminoacidiche che possono alterare considerevolmente la struttura o la lunghezza del prodotto genico. Il 90% circa dei malati è omozigote per alleli espansi, mentre metà circa dei rimanenti casi è eterozigote per un allele espanso e per una mutazione puntiforme (Campuzano *et al.*, 1996; Dürr *et al.*, 1996). Il mec-

canismo mutazionale prevalente, colloca la m. di F. tra le malattie da mutazioni dinamiche (v. TRINUCLEOTIDI INSTABILI, MALATTIE DA**). Tuttavia essa riveste alcuni caratteri particolari rispetto alle altre malattie di questo gruppo che sono in prevalenza dominanti piuttosto che recessive, e dovute ad espansione di sequenze trinucleotidiche localizzate in esoni piuttosto che in introni.

Anatomia patologica

Le alterazioni più gravi sono a carico del midollo spinale con degenerazione sia della guaina mielinica che delle fibre nervose dei cordoni posteriori (fascio di Goll) e laterali (fascio spinocerebellare dorsale e fascio piramidale crociato). I gangli posteriori mostrano un marcato depauperamento cellulare con degenerazione delle radici posteriori. I nervi periferici e particolarmente il nervo surale mostrano alterazioni sia assonali che mieliniche. Il cervelletto è generalmente normale, ma è possibile talora osservare atrofia delle lamelle cerebellari, alterazioni a carico delle cellule di Purkinje, nei nuclei pontini e del midollo allungato e nei nervi ottici (cfr. figg. 1 e 2 della voce FRIEDREICH, MALATTIA DI, VI, 2005).

A carico degli altri organi si riscontra frequentemente una degenerazione grassa con fibrosi del miocardio. Le malformazioni scheletriche consistono essenzialmente in una cifoscoliosi e nella presenza di piede cavo, varo-equino.

Sintomatologia

La malattia esordisce generalmente nel secondo decennio di vita con disturbi dell'equilibrio ed astenia agli arti inferiori. È caratterizzata da atassia del tronco e degli arti, sia superiori che inferiori, disartria, nistagmo, grave deficit delle sensibilità profonde, atrofia muscolare della porzione distale degli arti, piede cavo con dita a martello e assenza dei riflessi osteotendinei. È frequente il riflesso plantare in estensione. I malati presentano inoltre scoliosi toracolumbare associata spesso a cifosi, cardiomiopatia ipertrofica, anomalie elettrocardiografiche e talvolta diabete mellito. Nelle fasi terminali della malattia l'invalidità motoria è completa, si instaurano contratture osteotendinee stabili e la morte interviene generalmente per insufficienza cardiaca e/o per broncopneumopatie intercorrenti.

I potenziali evocati somatosensoriali sono marcatamente ridotti o assenti e l'indagine electroneurografica evidenzia una grave riduzione della velocità di conduzione sensitiva. La patologia miocardica è evidenziabile sia all'esame elettrocardiografico che mostra un'inversione dell'onda T e segni di ipertrofia ventricolare, che all'ecocardiografia.

Decorso e prognosi

Nella sua forma tipica la malattia insorge prima dei 20-25 anni ed in genere verso la pubertà. La scomparsa della deambulazione autonoma avviene in media intorno ai 15 anni di malattia, e la morte intorno ai 38-40 anni di vita. Esistono tuttavia varianti caratterizzate da una insorgenza assai più tardiva, da un decorso più benigno, da un minor coinvolgimento cardiomiopatico (Barbeau *et al.*, 1984), dalla conservazione dei riflessi osteotendinei. È stato osservato che queste caratteristiche cliniche si trovano in malati con espansioni della sequenza di GAA ripetute relativamente piccole (< 500 ripetizioni) mentre il quadro classico è prevalente in malati con espansioni di maggiore entità (Dürr *et al.*, 1996).

Diagnosi

I criteri diagnostici minimi per la forma tipica di m. di F. stabiliti da Geoffroy *et al.* (1976) sono: 1) eredità autosomica recessiva, 2) insorgenza inferiore ai 20 anni, 3) inizio con deambulazione atassica, 4) assenza di riflessi osteotendinei, 5) segni elettrofisiologici di neuropatia sensoriale assonale. Tuttavia l'identificazione della mutazione preva-

lente (espansione di triplette ripetute GAA) ha permesso di verificare che lo spettro clinico della malattia è più ampio di quello della forma classica e che circa 1/4 dei malati con espansione della sequenza ripetuta non risponde a tutti i criteri suindicati.

La m. di F. va distinta dalle atassie cerebellari autosomiche dominanti (v. ATASSIE SPINOCEREBELLARI**) per la diversa distribuzione familiare degli affetti e per l'assenza di una atrofia cerebellare marcata. La diagnosi differenziale rispetto ad altre atassie recessive è basata, oltre che sulla presenza dei criteri diagnostici minimi, anche sulla normalità dei livelli sierici di Vit. E per distinguerla dall'atassia da deficit di Vit. E.

L'analisi molecolare del numero di triplette GAA potrà confermare la diagnosi clinica se il reperto è di omozigosi per gli alleli espansi. Tuttavia una omozigosi per alleli normali od una eterozigosi per un allele espanso e uno normale non permetteranno di escludere la m. di F., data la possibilità di mutazioni puntiformi. La caratterizzazione della mutazione nelle coppie di portatori sani consentirà inoltre di effettuare la diagnosi prenatale del feto nel corso di una gravidanza.

Terapia

Non si conosce alcuna terapia che possa prevenire l'insorgenza della m. di F. od arrestarne o migliorarne il decorso.

La terapia è solo sintomatica ed ha lo scopo di migliorare la qualità della vita dei pazienti. Dubbi miglioramenti temporanei della sintomatologia cerebellare sono stati ottenuti con il TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*), con il 5-idrossi-triptofano associato o meno con la benserazide (Trouillas *et al.*, 1982; Klein *et al.*, 1986; Filla *et al.*, 1989; De Witt *et al.*, 1982). Terapie riabilitative, fisiche occupazionali e del linguaggio rivestono un ruolo importante nella gestione dei pazienti. Infine la presenza di diabete e di cardiomiopatia richiederanno terapie specifiche.

Bibliografia

- Babcock M. *et al.*, *Science*, 1997, **276**, 1709-1712.
 Barbeau A. *et al.*, *Canad. J. Neurol. Sci.*, 1984, **11**, 526-544.
 Campuzano V. *et al.*, *Science*, 1996, **271**, 1423-1427.
 Dürr A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**(16), 1169-1175.
 Filla A. *et al.*, *Riv. Neurol.*, 1989, **59**, 83-88.
 Geoffroy G. *et al.*, *Canad. J. Neurol. Sci.*, 1976, **3**, 279-286.
 Hanauer A. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, **46**, 133-137.
 Klein P. *et al.*, *Adv. Neurol.*, 1986, **45**, 603-604.
 Koutnikova H. *et al.*, *Nature Genetics*, 1997, **16**, 345-351.
 Le Witt P. A. *et al.*, *Lancet*, 1982, **ii**, 981.
 Romeo G. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1983, **35**, 523-529.
 Rosenberg R. N., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**(16), 1222-1224.
 Skre H., *Clin. Genet.*, 1975, **7**, 287-298.
 Trouillas P. *et al.*, *Rev. Neurol.*, 1982, **138**, 415-435.
 Wilson R. B., Roof D. M., *Nature Genetics*, 1997, **16**, 352-357.

MARINA FRONTALI

G

GANCICLOVIR: GANCICLOVIR* (col. *3287-3289); v. anche ACICLOVIR E ANALOGHI** (coll. **18-22).

GANGLIOSIDOSI [v. vol. VI, coll. 2120-2132]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2369). - Gangliosidosi G_{M1} (col. 2370). - Gangliosidosi G_{M2} (col. 2372).

Introduzione

Le gangliosidosi [g.] sono malattie da accumulo lisosomale caratterizzate dall'incapacità della cellula di degradare i gangliosidi, sfingolipidi composti da ceramide e acido siatico. I gangliosidi sono componenti importanti delle membrane delle cellule nervose. Il blocco dell'attività di enzimi lisosomali a tappe diverse nella degradazione degli sfingolipidi causa l'accumulo di specifici gangliosidi (G_{M1} o G_{M2}) (fig. 1).

I reperti clinici tipici delle g. sono la demenza progressiva e la cecità. Sono state perciò a lungo raggruppate come sindrome da idiozia amaurotica. L'idiozia amaurotica è stata suddivisa nel corso di questo secolo in varie malattie, dapprima sulla base della presenza di coinvolgimento viscerale dimostrabile clinicamente o anatomopatologicamente. La *malattia di Landau* (attualmente definita g. G_{M1} , o g. generalizzata) presenta un importante coinvolgimento viscerale.

Intorno al 1940, l'analisi biochimica dei lipidi accumulati permise un'ulteriore suddivisione: la forma con accumulo di ganglioside G_{M1} , la forma con accumulo di ganglioside G_{M2} , le forme in cui il materiale accumulato non era identificabile con metodi biochimici.

Con l'avvento della microscopia elettronica, a partire dagli anni '60, si osservò che l'aspetto morfologico delle inclusioni delle g. era uguale: i corpi membrano-citoplasmatici, inclusioni circondate da membrana singola, che possono presentarsi come lamelle parallele o concentriche e che sono presenti in cellule neuronali e gliali. Altre forme

di idiozia amaurotica presentavano invece accumuli diversi (e furono chiamate ceroido-lipofuscinosi).

Negli anni '70 furono identificati gli enzimi deficienti in alcune forme di idiozia amaurotica, permettendo così una classificazione etiologica.

Nell'ultimo decennio sono stati clonati e sequenziati i geni che codificano per gli enzimi, la cui deficienza causa le g., e sono state identificate numerose mutazioni in questi geni.

Attualmente dunque le g. vengono distinte in malattie da accumulo di ganglioside G_{M1} e malattie da accumulo di ganglioside G_{M2} :

gangliosidosi G_{M1}

gangliosidosi G_{M2} : — malattia di Tay-Sachs, o variante B
— malattia di Sandhoff, o variante O
— variante AB

Sono tutte malattie trasmesse come carattere autosomico recessivo.

Gangliosidosi G_{M1}

La g. G_{M1} è causata dalla deficienza della beta-galattosidasi lisosomale, l'enzima che scinde il residuo galattoso terminale dal ganglioside G_{M1} e da altri composti contenenti galattoso. Per la normale degradazione del G_{M1} da parte della beta-galattosidasi, è necessaria la presenza della proteina attivatrice degli sfingolipidi (SAP-1) o saposina B, una glicoproteina di 9 kDa (Wenger e Inui, 1984; O'Brien *et al.*, 1988).

L'esame anatomopatologico dimostra atrofia cerebrale e cerebellare, caratterizzata istologicamente da rarefazione neuronale e gliosi. I neuroni residui sono rigonfi da materiale che, all'esame ultrastrutturale, è costituito da corpi membrano-citoplasmatici all'interno di lisosomi. Nei visceri sono presenti cellule vacuolate e istiociti schiumosi.

Le caratteristiche cliniche della malattia permettono di distinguere i pazienti in tre tipi, a seconda del grado di coinvolgimento del sistema nervoso, della precocità dell'esordio, della rapidità dell'evoluzione, dell'importanza del coinvolgimento viscerale. La gravità del quadro clinico di-

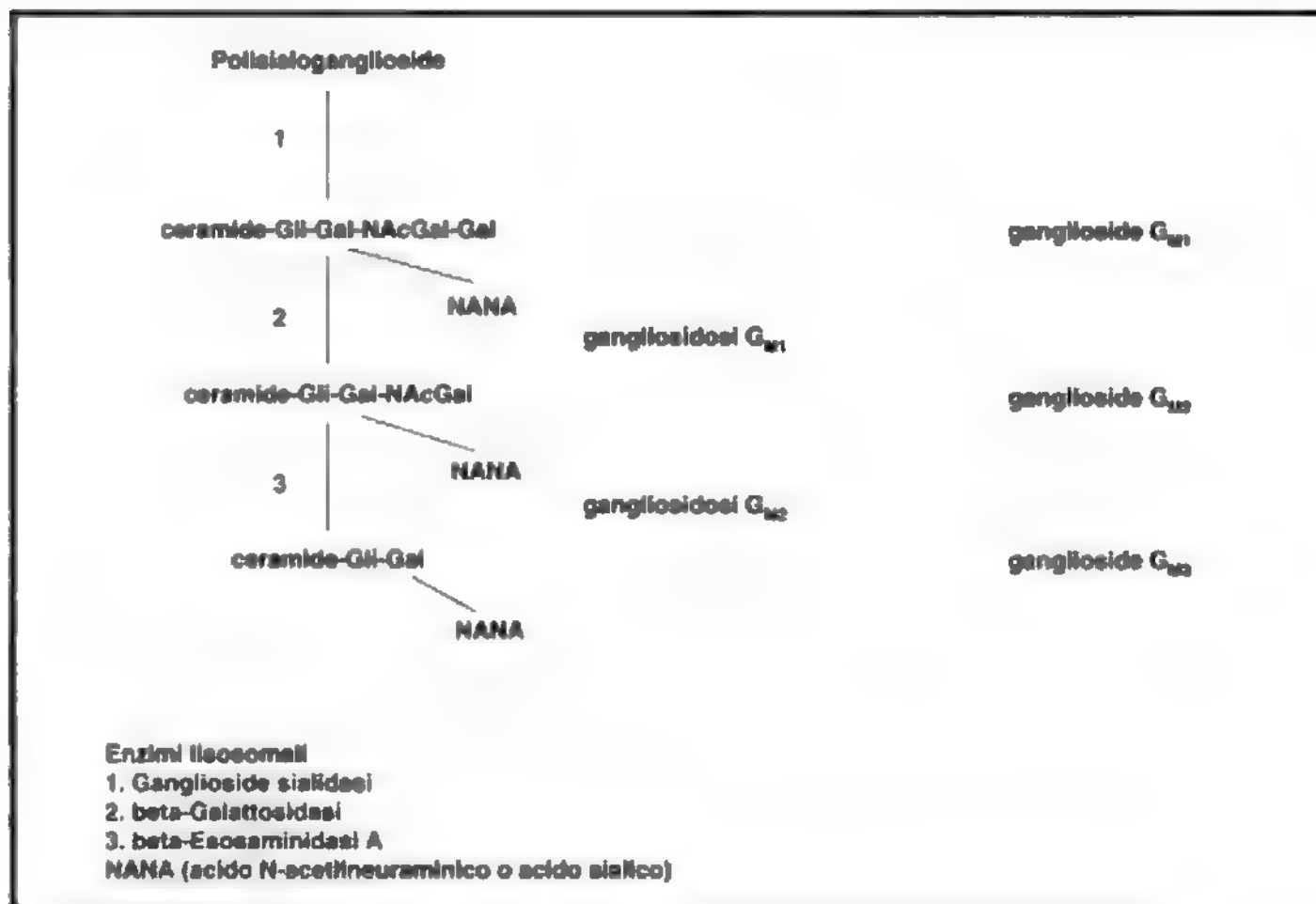


Fig. 1. Schema del blocco della degradazione degli sfingolipidi.

pende in modo inverso dal livello di attività enzimatica residua.

La *forma infantile* esordisce poco dopo la nascita. La malattia si presenta con l'arresto dello sviluppo psicomotorio, seguito in breve da spasticità grave. Si riconoscono una *facies* gargoloide, distensione addominale con epato-splenomegalia ed ernia ombelicale, disostosi multipla, talvolta macrocefalia. Precoci e gravi sono le manifestazioni epilettiche, spesso con mioclono audiogeno. Si manifesta cecità, spesso con la macchia rosso-ciliegia all'esame del fondo dell'occhio, e sordità. La morte interviene verso i due-tre anni.

La *forma giovanile* esordisce tra i 6 mesi e i 18 mesi, con arresto dello sviluppo motorio e psichico, debolezza muscolare e incoordinazione motoria. Compaiono precocemente spasticità e crisi epilettiche. Non sono evidenti l'accumulo viscerale e le deformità ossee e non si sviluppa cecità. La morte interviene tra 3 e 7 anni.

La *forma adulta* inizia intorno all'adolescenza con atassia cerebellare, spasticità progressiva, disartria. Frequenti, anche se non costanti, sono distonia e demenza. Non si manifesta organomegalia. Le alterazioni radiologiche sono poco evidenti. La sopravvivenza è lunga.

La diagnosi definitiva è eseguita mediante il dosaggio enzimatico della beta-galattosidasi. Possono essere utili la dimostrazione dell'accumulo di corpi membrano-citoplasmatici nei neuroni del S.N.A., analizzati mediante l'esecuzione di una biopsia rettale, e la dimostrazione di oligosaccaridi urinari mediante cromatografia su strato sottile. È possibile la diagnosi dei portatori, che presentano un'attività enzimatica inferiore alla norma, intorno al 50% di quella dei controlli. È possibile la diagnosi prenatale su villi coriali e su amniociti.

Non esiste alcun trattamento specifico.

Il gene responsabile è stato clonato e sequenziato (Oshima *et al.*, 1988); è localizzato in 3p21.33 (Takano e Yamanouchi, 1993). Numerose mutazioni sono state caratterizzate. Tra queste G1479A (Arg487His; Mosna *et al.*, 1992) è frequente in pazienti italiani. Altre mutazioni puntiformi causano la forma infantile (Boustany *et al.*, 1993; Morrone *et al.*, 1994). C2451 (Thr82Met; Chakraborty *et al.*, 1994)

causa la forma adulta. Una revisione delle mutazioni note è presentata da Suzuki *et al.* (1995).

Galattosialidosi. - È una forma per alcuni aspetti vicina alla g. G_{M1} .

La beta-galattosidasi è presente nei lisosomi all'interno di un complesso plurimolecolare contenente anche la alfa-L-N-neuraminidasi (la cui deficienza causa la sialidosi) e una proteina protettiva. La *proteina protettiva* è una glicoproteina, sintetizzata nei fibroblasti umani come precursore di 54 kDa, la cui forma matura, un eterodimero di subunità di 32 e 20 kDa, unite da ponti disolfuro, si aggrega con la beta-galattosidasi per formare un complesso di elevato peso molecolare che comprende la neuraminidasi (Galjart *et al.*, 1988). È possibile che anche la saposina B, o proteina attivatrice degli sfingolipidi, sia presente in questo complesso.

La *galattosialidosi* è causata dalla deficienza della *proteina protettiva*. Il fenotipo biochimico è caratterizzato dalla deficienza combinata di beta-galattosidasi e di alfa-L-N-neuraminidasi. L'etiologia della galattosialidosi, così definita da Andria e collaboratori (1981), è stata chiarita da d'Azzo *et al.* (1982).

Esiste un ampio polimorfismo clinico. La forma infantile è simile alla g. G_{M1} . La forma giovanile è stata descritta soprattutto in bambini giapponesi, ed è caratterizzata da alterazioni scheletriche, dismorfismi, opacità corneale, macchia rosso-ciliegia all'esame del fondo dell'occhio, angiocheratoma. I sintomi neurologici comprendono spasticità, segni di disfunzione extrapiramidale, segni cerebellari. Frequenti anche i disturbi della visione e il mioclono.

Il gene responsabile è localizzato sul cromosoma 20 (20q13.1). Sono state descritte mutazioni gravi, che impediscono la produzione di mRNA dimostrabile, associate a fenotipo precoce e grave (Galjart *et al.*, 1988), e mutazioni puntiformi, con sostituzione di un singolo aminoacido, associate a fenotipo tardivo (d'Azzo *et al.*, 1995).

Gangliosidosi G_{M2}

La gangliosidosi G_{M2} è caratterizzata dall'accumulo intralisosomale di ganglioside G_{M2} . È dovuta alla deficienza di

esosaminidasi (E.) A, che determina la mancanza di rimozione del residuo N-acetil-esosamina dalla molecola di ganglioside G_{M2} . L'attività dell'E. è costituita da tre isoenzimi (E. A, E. B, E. S), costituiti dall'aggregazione di due subunità simili: subunità alfa e subunità beta. L'E. A è l'eteropolimero alfa-beta, l'E. B è l'omopolimero beta-beta, l'E. S è l'omopolimero alfa-alfa. L'E. S rappresenta nell'uomo solo il 5% dell'attività totale e partecipa probabilmente alla degradazione di glicoproteine. Solo l'E. A, in presenza di una glicoproteina attivatrice, è in grado di degradare il ganglioside G_{M2} . L'E. B degrada invece altri composti contenenti un residuo N-acetil-esosaminico terminale con legame beta-glicosidico (oligosaccaridi, mucopolisaccaridi, glicoproteine).

Anche nella g. G_{M2} si distinguono clinicamente tre forme principali, a seconda dell'età di esordio. Come nella g. G_{M1} , l'età di esordio e la gravità clinica sono correlate all'entità dell'attività enzimatica residua.

La malattia di Tay-Sachs ad esordio infantile è la forma tipica. Esordisce intorno a 6 mesi di età con debolezza muscolare, ipotonia, irritabilità ed eccessiva risposta agli stimoli sonori (miocloni audiogeni). La malattia progredisce con regressione dello sviluppo psicomotorio, disturbo della vista fino alla cecità (assai spesso con macchia rosso-ciliegia al fondo dell'occhio), sordità, spasticità, crisi epilettiche. Si sviluppa macrocefalia, ma non organomegalia. La morte interviene in genere prima dei tre anni di età. Le mutazioni responsabili della malattia di Tay-Sachs sono frequenti nella popolazione ebraica Ashkenazi e nei canadesi di origine francese. In queste popolazioni la frequenza dei portatori è di circa 1:30.

La malattia di Sandhoff ad esordio infantile è simile alla malattia di Tay-Sachs, ma presenta anche coinvolgimento viscerale (fegato, milza, rene, polmone). Nelle urine sono presenti oligosaccaridi, dimostrabili mediante cromatografia su strato sottile. Per il meccanismo di inserzione di copie di basi nella malattia di Sandhoff, v. fig. 3 della voce GENETICA MEDICA E UMANA*, a col. **2462.

La forma giovanile di g. G_{M2} è caratterizzata da esordio tra 2 e 6 anni di età, con declino intellettivo, disturbo della marcia con atassia e spasticità, seguiti da spasticità progressiva e crisi epilettiche. La morte sopraggiunge in genere durante l'adolescenza. In una forma particolare di malattia di Tay-Sachs ad esordio giovanile, definita variante B1 e frequente nel bacino mediterraneo, sono spesso riferite crisi di pavor nocturnus sensibili al trattamento antiepilettico.

Nella forma adulta di g. G_{M2} (la malattia di Tay-Sachs adulta è la più frequente), la sindrome clinica si presenta come una degenerazione multisistemica lentamente progressiva. Il sistema motorio (specie il secondo neurone di moto) e il cervelletto sono interessati precocemente e in modo prevalente. Sono frequenti sintomi psicotici.

Il gene che codifica per la subunità alfa è localizzato sul cromosoma 15 (15q23 → q24) ed è definito *HEXA*. Il gene che codifica per la subunità beta è localizzato sul cromosoma 5 (5q13) ed è definito *HEXB*. Il gene che codifica per la proteina attivatrice è localizzato sul cromosoma 5 (5q32 → 33) ed è definito *GM2A*.

Mutazioni del gene *HEXA* causano deficienza isolata di E. A, il quadro biochimico della malattia di Tay-Sachs. Mutazioni del gene *HEXB* causano deficienza combinata di E. A ed E. B, il quadro biochimico della malattia di Sandhoff. Mutazioni del gene *GM2A* causano la variante AB della g. G_{M2} , in cui è assente l'attività degradatrice del ganglioside G_{M2} da parte dell'E. A, ma l'attività di E. A ed E. B verso substrati artificiali idrosolubili è normale.

I geni *HEXA* e *HEXB* dimostrano un'identità di sequenza del 57%; 12 dei 13 introni interrompono i geni in posizioni corrispondenti. Il gene *HEXA* è lungo 35 kb e

contiene 14 esoni. Anche il gene *HEXB* contiene 14 esoni; è lungo 45 kb. Il gene *GM2A* è lungo circa 16 kb.

Le mutazioni conosciute del gene *HEXA* sono numerose.

La mutazione più frequente, che rappresenta quasi l'80% degli alleli patologici della popolazione Ashkenazi, ma che ha anche distribuzione panetnica, è un'inserzione di 4 nucleotidi nell'esone 11 (ins1277TATC; Myerowitz e Costigan, 1988), che determina la formazione di un codone stop, 9 nucleotidi a valle della mutazione. Una seconda mutazione frequente, che rappresenta quasi il 20% degli alleli patologici fra gli Ashkenazi, è una transversione G a C nel primo nucleotide all'estremità 5' dell'introne 12 (Arpaia *et al.*, 1988). Essa determina un'alterazione dello *splicing*. Nella popolazione canadese di origine francese, la mutazione più frequente è una delezione di 7,6 kbasi, che si estende dall'estremità 5' fino all'interno dell'introne 1 (Myerowitz e Hogikyan, 1986). Entrambe queste mutazioni causano la forma infantile della malattia.

Nel bacino mediterraneo è frequente una mutazione originata nel Portogallo settentrionale, causa della variante B1 della malattia di Tay-Sachs (G533A). Essa determina la sostituzione Arg178His nella regione del sito attivo, con produzione di subunità alfa inattiva (Ohno e Suzuki, 1988). In pazienti con forma adulta (che spesso presentano un fenotipo di malattia del motoneurone) è frequente la mutazione G986A (Gly269Ser), che determina una riduzione dell'associazione tra subunità (Navon e Proia, 1989). Gravel *et al.* (1995) presentano un'ampia revisione delle mutazioni note.

Sono state identificate alcune mutazioni del gene *HEXB*. La più comune, che rappresenta circa il 30% degli alleli patologici nell'Europa settentrionale, è una delezione all'estremità 5' del gene *HEXB* ($\Delta 5'$) (Bolhuis e Bikker, 1992). Questa delezione rimuove circa 16 kbasi di DNA, che comprendono il promotore di *HEXB*, gli esoni 1-5 e parte dell'introne 5. Questa mutazione causa la forma infantile della malattia. Sono state descritte altre mutazioni che aboliscono il normale *splicing* del mRNA o che producono un codone stop prematuro (McInnes *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1992; Zhi-Xin *et al.*, 1994; Gomez-Lira *et al.*, 1995a). Una mutazione puntiforme (C1214T, che determina la sostituzione Pro405Leu) è stata caratterizzata come la causa più frequente della forma adulta (Gomez-Lira *et al.*, 1995b).

La proteina attivatrice del ganglioside G_{M2} (GM2AP) consiste in una catena polipeptidica di 162 aminoacidi, forma un complesso con certi glicosfingolipidi e stimola la loro degradazione mediante un'interazione specifica con l'esosaminidasi A. Questa proteina è essenziale *in vivo* per l'idrolisi del ganglioside G_{M2} e del glicolipide G_{A2} . Il gene che produce la proteina attivatrice è localizzato sul cromosoma 5 ed è costituito da 4 esoni. Sono attualmente note poche mutazioni in questo gene: una transizione T412C (Schroder *et al.*, 1991), una transversione G506C (Schroder *et al.*, 1993), una delezione di tre basi (delAAG262; Schepers *et al.*, 1996), una delezione di una singola base (del A410; Schepers *et al.*, 1996).

La diagnosi definitiva di gangliosidosi G_{M2} richiede il dosaggio dell'E. È possibile la diagnosi di eterozigote e la diagnosi prenatale su villi coriali e su amniociti.

Non esiste alcun trattamento specifico.

Bibliografia

- Arpaia E., Dumbrille-Ross A., Maler T., *Nature*, 1988, **333**, 85.
 Bolhuis P. A., Bikker H., *Hum. Genet.*, 1992, **90**, 328.
 Brown C. A., McInnes B., de-Kremer R. D., Mahuran D. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1180**, 91.
 d'Azzo A., Andria G., Strisciuglio P., Galjaard H., *Galactosialido-*

- vis., in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, 7 ed., McGraw-Hill, New York, pp. 2825-2837.
- Galjart N. J., Gillemans N., Harris A. et al., *Cell*, 1988, **54**, 755.
- Gomez-Lira M., Perusi C., Brutti N., Farnetani A., Margollicci A., Rizzuto N., Pignatti P. F., Salviati A., *Hum. Mutat.*, 1995a, **6**, 260.
- Gomez-Lira M., Sangalli A., Mottes M., Perusi C., Pignatti P. F., Rizzuto N., Salviati A., *Hum. Genet.*, 1995b, **96**, 417.
- Gravel R. A., Clarke J. T. R., Kaback M. M., Mahuran D., Sandhoff K., Suzuki K., *The G_{M1} gangliosidosis*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, 7 ed., McGraw-Hill, New York, pp. 2839-2879.
- Johnson W. G., *Neurology*, 1981, **31**, 1453.
- McInnes B., Brown C. A., Mahuran D. G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1138**, 315.
- Myerowitz R., Costigan F. C., *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 18.587.
- Myerowitz R., Hogikyan N. D., *Science*, 1986, **232**, 1646.
- Navon R., Proia R. L., *Science*, 1989, **243**, 1471.
- O'Brien J. S., Kretz K. A., Dewji N. et al., *Science*, 1988, **241**, 1098.
- Ohno K., Suzuki K., *J. Neurochem.*, 1988, **50**, 316.
- Proia R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 1883.
- Schepers U., Gilombitza G., Lemm T., Hoffmann A., Chabas A., Ozand P., Sandhoff K., *Am. J. Hum. Genet.*, 1996, **59**, 1048.
- Schroder M., Schnabel D., Suzuki K., Sandhoff K., *FEBS Lett.*, 1991, **290**, 1.
- Schroder M., Schnabel D., Hurwitz R., Young E., Suzuki K., Sandhoff K., *Hum. Genet.*, 1993, **92**, 437.
- Suzuki K., *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1994, **53**, 344.
- Suzuki Y., Sakuraba H., Oshima A., *Beta-galactosidase deficiency (beta-Galactosidosis). G_{M1} gangliosidosis and Morquio B disease*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, 7 ed., McGraw-Hill, New York, pp. 2785-2823.
- Takano T., Yamanouchi Y., *Hum. Genet.*, 1993, **92**, 403.
- Wenger D. A., Inui K., *Studies on the sphingolipid activator protein for the enzymatic hydrolysis of G_{M1} ganglioside*, in Barranger J. A., Brady R. O. eds., *Molecular basis of lysosomal storage disorders*, 1984, Academic Press, New York, p. 61.
- Zhi-Xin Z., Wakamatsu N., Mules E. H., Thomas G. H., Gravel R. A., *Hum. Mol. Genet.*, 1994, **3**, 139.

ALESSANDRO SALVIATI

GASTRITI: V. GASTRITI, VI, coll. 2189-2202; STOMACO, reflusso gastroesofageo (XIV, 1327-1331); STOMACO*, gastrite cronica e *Helicobacter pylori* (coll. *6875-6877); STOMACO**, reflusso duodeno-gastrico.

GAUCHER, MALATTIA DI [v. vol. VI, coll. 2270-2274]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2375). - **Aspetti clinici** (col. 2375). - **Aspetti genetici** (col. 2376). - **Aspetti diagnostici** (col. 2376). - **Trattamento** (col. 2377).

Introduzione

È la prima malattia lisosomale per la quale la terapia enzimatica sostitutiva è diventata realtà dal 1991. Il successo dell'apporto endovenoso dell'enzima mancante ha originato una serie di problemi biologici, etici e sociali che hanno rinnovato l'interesse per questa malattia. Nel corso degli ultimi anni sono stati compiuti grossi progressi nella conoscenza degli aspetti clinici, genetici e diagnostici con rilevanti implicazioni nell'approccio al paziente e nella consulenza genetica.

Aspetti clinici

Mentre la classica descrizione del tipo II neuropatico acuto non ha subito variazioni, l'eterogeneità clinica del tipo I e del tipo III si è ampliata includendo anche una variabilità intrafamiliare.

Lo spettro clinico del tipo I è compreso tra una condizione pressoché asintomatica e una condizione di grave

coinvolgimento multisistemico ad esordio dall'infanzia all'età adulta. È importante la distinzione tra «segni» (anemia, trombopenia, epatosplenomegalia ed alterazioni ossee senza conseguenze soggettive) e «sintomi» (astenia, diatesi emorragica, dolore osseo, fratture) della malattia. Eventuali sintomi neurologici non fanno parte per definizione del tipo I ma sono complicanze dell'interessamento sistemico. Emboli grassosi cerebrali, compressione midollare, ematomie e neuropatia sono secondari all'interessamento osseo e/o alla coagulopatia. L'associazione con la malattia di Parkinson sembra una coincidenza piuttosto che una manifestazione tardiva.

L'eterogeneità della sintomatologia neurologica del tipo III ha portato alla distinzione di questo in due gruppi. Il mioclono ad esordio nell'infanzia o in età giovanile contraddistingue il tipo IIIa che si completa con convulsioni generalizzate resistenti alla terapia, demenza, atassia, spasticità e disturbi dei movimenti oculari. Il tipo IIIb è invece caratterizzato da disturbi dei movimenti oculari, modesto difetto mentale, raramente convulsioni comunque sensibili alla terapia, retroflessione del capo e coinvolgimento sistemico grave che porta all'*exitus* nell'infanzia o poco oltre per complicanze epatiche o polmonari o ossee.

Aspetti genetici

Il gene strutturale per la β -glicosidasi è stato mappato sul cromosoma I in posizione 1q21-31 in prossimità di uno pseudogene non funzionale ma con cui presenta elevata omologia.

Sono state individuate circa 50 mutazioni responsabili del difetto della β -glicosidasi, per la maggior parte mutazioni puntiformi. Le mutazioni più frequenti sono la 1226G o N370S e la 1448C o L444P. La distribuzione delle mutazioni è differente a seconda dell'origine etnica dei pazienti (Horowitz e Zimran, 1994). La mutazione 1226G è presente nel 75% degli Ebrei Ashkenazi in cui, insieme con altre tre mutazioni, 1448C, 84GG e IVS2+1, copre il 95-97% delle mutazioni. Nella popolazione europea è noto solo il 65-70% delle mutazioni, di cui il 35% è rappresentato dalla 1448C, il 25% dalla 1226G e il restante da mutazioni rare. In una casistica di 87 pazienti italiani le mutazioni 1448C e 1226G sono pressoché egualmente rappresentate (35,06% e 31,61% rispettivamente), le mutazioni rare sono il 6,3%, quelle nuove il 4,57% e le sconosciute il 22,4% (Seri et al., 1993; Gatti e Filocamo, 1997).

La correlazione genotipo-fenotipo non è ancora definita. L'eterogeneità clinica corrispondente ad uno stesso genotipo, la variabilità intrafamiliare delle manifestazioni e la discordanza tra gemelli identici suggeriscono l'intervento di altri fattori genetici o extragenetici.

Al momento attuale sono possibili conclusioni generiche. La mutazione 1226G preclude il coinvolgimento neurologico ed è pertanto esclusiva del tipo I. L'omozigosi si correla con fenotipo meno grave di quello associato all'eterozigosi 1226G/1448C o 1226G/altra mutazione. L'omozigosi per 1448C è quasi costante nel tipo III ad eccezione della popolazione giapponese, in cui è associata ad un fenotipo non neuropatico. Nel tipo II neuropatico acuto è frequente l'allele 1448C associato ad alleli rari o sconosciuti oppure entrambi gli alleli sono sconosciuti.

Aspetti diagnostici

La malattia deve essere considerata in ogni soggetto con splenomegalia.

Il dosaggio della β -glicosidasi sui leucociti separati dal sangue venoso è il metodo diagnostico più semplice ed affidabile. Sono sconsigliate procedure quali il puntato midollare e la biopsia splenica che, oltre ad essere invasive e non

del tutto esenti da rischio, non sono completamente affidabili. Una normale attività della β -glicosidasi, tuttavia, in presenza di dati clinici, biologici e suggestivi non esclude la malattia. Sono stati recentemente segnalati casi di malattia di Gaucher con normale attività della β -glicosidasi dovuti al difetto dell'attivatore proteico necessario per l'attività idrolitica dell'enzima.

La diagnosi biochimica deve essere accompagnata da una serie di indagini che hanno il valore di «indicatori» del grado di compromissione della malattia ai fini del *follow-up* e della valutazione della risposta terapeutica.

Le indagini elettrofisiologiche, in particolare i potenziali evocati del tronco, sono un *marker* dell'interessamento neurologico e possono essere alterati nella fase presintomatica.

Le bioimmagini monitorizzano in modo obiettivo le dimensioni dei visceri addominali e il coinvolgimento osseo che, in base alla radiologia tradizionale, alla densitometria ossea e alla RMN, è stato classificato in cinque stadi (Rosenthal e Barton, 1992).

Parametri biologici con significato di «indicatori» sono: l'anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, l'aumento nel siero di fosfatasi acida, chitotriosidasi, ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), ferritina, transaminasi ossalacetica, immunoglobuline, glicosilceramide e l'alterazione dei fattori della coagulazione.

L'analisi del genotipo è parte integrante della diagnosi perché può offrire informazioni utili per la prognosi, il programma terapeutico e la consulenza genetica.

L'affidabilità della diagnosi enzimatica di eterozigosi non è completa, per la zona di sovrapposizione tra popolazione dei portatori sani e popolazione di controllo.

La diagnosi prenatale è possibile sul trofoblasto nel primo trimestre e sugli amniociti coltivati nel secondo trimestre. La conoscenza delle mutazioni del caso indice migliora l'affidabilità della diagnosi enzimatica di eterozigosi e di quella prenatale.

Trattamento

Fino all'inizio degli anni '90 le possibilità terapeutiche erano limitate ad interventi sintomatici e alla splenectomia, le cui indicazioni non erano di approvazione unanime. Il trapianto di midollo osseo era stato sperimentato positivamente, ma richiedeva un donatore compatibile e comportava rischi legati alla malattia di rigetto.

La terapia enzimatica sostitutiva è iniziata nel 1991 quando la FDA (*Food and Drug Administration*) degli Stati Uniti ha approvato l'impiego terapeutico della *Ceredase*® prodotta dalla *Genzyme Corporation* (Massachusetts). Un periodo di ricerca durato circa 20 anni era culminato nella produzione commerciale di una forma di β -glicosidasi estratta dalla placenta umana e modificata chimicamente (deglicosilazione sequenziale delle catene oligosaccaridiche) per essere veicolata nelle sedi di accumulo. Questo trasporto è stato dimostrato per organi ricchi in cellule del sistema reticolo endoteliale (milza, fegato, midollo osseo) ma è poco verosimile a livello del tessuto nervoso (Barton *et al.*, 1991).

La somministrazione endovenosa dell'enzima migliora fino alla normalizzazione i parametri ematologici, riduce la epatosplenomegalia, corregge lentamente le manifestazioni ossee, ma non modifica il decorso neurologico del tipo II (Zimran *et al.*, 1993). È in corso di valutazione l'efficacia nelle complicanze neurologiche del tipo III.

Il trattamento è privo di effetti collaterali ad eccezione di rare manifestazioni allergiche. Il 13% su un campione di 700 soggetti in trattamento ha presentato IgG anti *Ceredase*® che sembrano favorire la comparsa dei sintomi allergici

ma non riducono l'efficacia della terapia sostitutiva (Pastores *et al.*, 1993).

La produzione del *Ceredase*® dalla placenta umana è molto costosa ed anche quella dall'enzima ricombinante (*Cerenzyme*) approvata nel 1994 dalla FDA non è più economica. Dalla fine del 1995 il farmaco *Ceredase*® è incluso nei farmaci per uso o dispensazione ospedaliera (fascia H) del prontuario farmaceutico SSN. Il costo annuale del trattamento con *Ceredase*® varia in funzione del peso del paziente e della gravità dei sintomi ed è pari a 100-150 milioni/anno per un soggetto adulto affetto dal tipo I.

In considerazione del gravoso impegno economico che il Servizio Sanitario pubblico deve sostenere per il trattamento di ogni paziente, al momento attuale l'indicazione è limitata ai pazienti sintomatici. Poiché sono ancora controverse la dose e la frequenza delle somministrazioni e poiché non è prevedibile la risposta individuale alla *Ceredase*®, è preferibile la dose più bassa compatibile nel singolo paziente con una efficacia clinica. È tuttavia auspicabile la possibilità di estendere il trattamento a pazienti asintomatici, ma a rischio per sviluppare sintomi, al fine di valutarne l'effetto preventivo.

La terapia enzimatica sostitutiva non ha solo effetti clinici, ma anche un rilevante impatto psicosociale sul paziente e sui familiari. All'iniziale entusiasmo che segue la scomparsa dei sintomi, subentra spesso una fase di scontento legato alla dipendenza dalle infusioni endovenose periodiche che interferiscono con l'attività scolastica o lavorativa. Il sostegno della *Associazione Italiana Malattia di Gaucher* (Piazza della Costituzione 7 - 50129 Firenze - tel. 055/483744), che raccoglie pazienti con problemi ed esperienze analoghi, è spesso molto utile.

Le aspettative dei pazienti Gaucher sono ora rivolte alla terapia genica, che sta facendo importanti progressi. A seguito dei risultati di ricerche sperimentali (Oashi *et al.*, 1992), il «Recombinant DNA Advisory Committee» ha autorizzato nel 1993 il primo esperimento nell'uomo. È in corso il monitoraggio clinico, molecolare ed enzimatico di pazienti cui sono state reinfuse le cellule CD34T sottoposte a correzione genica *in vitro*.

La terapia enzimatica sostitutiva non deve far dimenticare la terapia sintomatica ed in particolare il trattamento ortopedico della patologia ossea.

V. anche: LISOSOMALI MALATTIE, VIII, 2255; *4700; SFINGOLIPIDOSI, XIV, 128.

Bibliografia

- Barton N. W., Brady R. O., Dambrosia J. M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 1464.
 Beutler E., Grabowski G. A., *Gaucher Disease*, in Scriver C. H., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases on Inherited Disease*, 1995, 7 ed., vol. II, McGraw-Hill, New York.
 Horowitz M., Zimran A., *Hum. Mut.*, 1994, **3**, 1.
 Gatti R., Filocamo M., *Dati Personali*, 1995.
 Pastores G. M., Sibille A. R., Grabowski G. A., *Blood*, 1993, **82**, 408.
 Ohashi T., Boggs S., Robbins P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 11332.
 Rosenthal D. I., Barton N. W., *Radiology*, 1992, **185** (3), 841.
 Seri M., Filocamo M., Corsolini F., Gatti R., *Pathologica*, 1993, **85** (suppl.), 45.
 Zimran A., Kannai R., Cohen Y., Zevin S. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 33a.

ROSANNA GATTI E MIRELLA FILOCAMO

GEE E HERTER, MALATTIA DI: V. GEE E HERTER, MALATTIA DI (VI, 2275-2284); CELIACHIA** (coll.** 1007-1014).

GEMCITAMINA: V. TUMORI**, nuovi farmaci antitumorali.

GENETICA

GENETICA [v. vol. VI, coll. 2315-2394; Agg. I, coll. *3310-3338]

QUADRO SISTEMATICO

(Si consulti anche l'*Indice Sistematico della Genetica* del volume *INDICI* [pp. 113-116]; per la *Genetica medica e umana* si consultino le voci *GENETICA UMANA* [VI, 2395-2632] con il relativo quadro sistematico, *GENETICA MEDICA** [coll. *3338-3361]; *GENETICA MEDICA E UMANA*** [coll. **2433-2471] con il relativo quadro sistematico)

ARGOMENTI

Parte generale

RIMANDI

GENETICA (VI, 2315-2394) e relativo quadro sistematico; **GENETICA*** (*3310-3338); **GENETICA**** (**2379-2433) e questo quadro sistematico; **GENETICA, cromosomi come latori dei geni** (VI, 2340-2361); **GENETICA*, cromosomi come latori dei geni** (*3311-3315); **GENETICA, eredità extracromosomica** (VI, 2370-2375); **GENETICA*, eredità extracromosomica** (*3316-3317); **GENETICA, mutazioni** (VI, 2361-2370); **GENETICA*, mutazioni** (*3315-3316); **GENETICA**, regolazione dell'espressione genica nei microrganismi procarioti** (**2380-2387); **GENETICA**, regolazione dell'espressione genica negli eucarioti superiori** (**2387-2395); **GENETICA**, fattori di trascrizione** (**2395-2405); **GENETICA**, DNA-ricombinante** (**2405-2413); **GENETICA**, DNA-fingerprinting** (**2413-2433); **GENE** (VI, 2313-2319); **GENE*** (*3304-3310); **GENI DISCONTINUI**** (**2471-2477); **GENOMA UMANO**** (**2477-2495); **GENOTECHE**** (**2495-2504)

CHIMERISMO** (**1097-1099); **CLONAZIONE POSIZIONALE**** (**1276-1280); **CLONE E CLONAZIONE*** (*1698-1713); **CLONE E CLONAZIONE**** (**1281-1284); **CROMOSOMA** (VI, 1578-1598); **CROMOSOMA*** (*1947-1960); **IBRIDAZIONE** (VII, 1101-1106); **V.** anche **GENETICA*** (*3326-3329); **SONDE MOLECOLARI*** (*6742-6747); **SONDE MOLECOLARI****; **MOAICISMO** (VI, 2001-2004); **V.** anche **GENETICA, il mosaicism** (VI, 2389-2390); **MOAICISMO**** (**3826-3829); **NUCLEOSOMA** (X, 1292-1297); **TRASPOSONI** (XV, 342-344); **RETROTRASPOSONI*** (*6408-6409); **RIBOSOMI** (XIII, 1333-1345); **SPLICING ALTERNATIVO****; **TELOMERI E**

ARGOMENTI

Codice genetico

Genetica di popolazioni

Genetica dei microrganismi

Ingegneria genetica

Genetica dello sviluppo e del differenziamento

RIMANDI

CODICE GENETICO** (**1213-1306); **GENETICA** (VI, 2377-2380); **NUCLEICI ACIDI** (X, 1250-1282); **NUCLEICI ACIDI*** (*5463-5481); **NUCLEO-PROTEINE** (X, 1283-1288); **SONDE MOLECOLARI*** (*6738-6800); **SONDE MOLECOLARI****

GENETICA (VI, 2390-2392); **GENETICA*** (*3322-3323); **EUGENICA** (VI, 434-439); **EVOLUZIONE** (VI, 453-477); **EVOLUZIONE**** (**2101-2112); **EVOLUZIONE MOLECOLARE**** (**2112-2116); **OMINAZIONE** (X, 1666-1693); **OMINAZIONE****; **RAZZA** (XIII, 164-179)

BATTERIOFAGO (II, 1977-1986); **BATTERIOFAGO*** (*1010-1013); **BATTERIOLOGIA** (II, 2110-2128); **BATTERIOLOGIA*** (*1013-1016); **MICOLOGIA** (IX, 1145-1148); **PROTOZOI** (XII, 1570); **VIROLOGIA** (XV, 2085-2088);

INGEGNERIA GENETICA (VII, 1966-1978); **INGEGNERIA GENETICA*** (*3810-3824); **CLONE E CLONAZIONE*** (*1698-1713); **CLONE E CLONAZIONE**** (**1281-1284); **PCR*** (*5740-5716); **PCR****; **SONDE MOLECOLARI*** (*6738-6200); **SONDE MOLECOLARI****; **TERAPIA GENICA*** (*6969-6993); **TERAPIA GENICA****; **TRANS-GENICI ANIMALI*** (*7193-7199)

DIFFERENZIAMENTO (V, 138-145); **DIFFERENZIAMENTO*** (*2184-2188); **EMBRIOLOGIA, embriologia sperimentale** (V, 1218-1233); **EMBRIOLOGIA, embriologia molecolare** (V, 1233-1241); **EMBRIOLOGIA*, biologia dello sviluppo** (*2528-2530); **EMBRIOLOGIA**, biologia dello sviluppo** (**1819-1822); **GENETICA, il problema del differenziamento** (VI, 2388-2389); **INDUZIONE EMBRIONALE**** (**2750-2771); **OMFOTICI GENI****

SOMMARIO GENERALE

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI MICRORGANISMI PROCARIOTI	col. 2381
REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEGLI EUCARIOTI SUPERIORI	col. 2387
FATTORI DI TRASCRIZIONE	col. 2395
DNA RICOMBINANTE	col. 2405
DNA FINGERPRINTING	col. 2413

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI MICRORGANISMI PROCARIOTI

SOMMARIO

Introduzione (col. 2381). - **Elementi del controllo dell'espressione genica** (col. 2381). - **Meccanismi molecolari del controllo dell'espressione genica** (col. 2382): *Controllo dell'inizio della trascrizione*. - *Regolazione del fattore σ* . - *Controllo positivo*. - *Controllo negativo*. - *Regolazione di operoni complessi*. - *Regolazione per inversione programmata di un tratto di DNA*. - *Regolazione mediante la produzione di un RNA antisense*.

Introduzione

L'intera attività fisiologica della cellula è la manifestazione finale dell'azione dei suoi geni, che sono distribuiti lungo il cromosoma come successioni di regioni di informazione codificata per la sintesi delle proteine. Il percorso che va da questa informazione al prodotto proteico esige, come primo passo, il trasferimento del messaggio genetico ad un intermedio molecolare, l'RNA messaggero (mRNA). Questo processo (*trascrizione*), mediato dall'enzima RNA-polimerasi (RNA-P) è seguito dalla traduzione dell'mRNA, operata dai macchinari cellulari, in proteina. In una cellula procariotica metabolicamente attiva ci sono circa 1400 molecole di mRNA di 400 tipi diversi, ognuna delle quali dirige la sintesi di una o più proteine specifiche.

All'universalità dello schema di lettura dell'informazione genetica, si contrappone la diversità dei sistemi che controllano se un gene deve essere espresso o no, a seconda della necessità. Nei microrganismi questi sistemi prevedono un ampio spettro di meccanismi che agiscono a tutti i livelli del percorso che va dalla lettura alla traduzione dell'informazione genetica. Il risultato complessivo di questi controlli è che dei 3000-4000 geni dell'*Escherichia coli* (organismo procariotico modello per eccellenza) alcuni sono sempre espressi, altri lo sono a seconda delle necessità metaboliche (ad es. in presenza o meno di substrati da metabolizzare) o in risposta a variazioni fisicochimiche dell'ambiente, mentre altri geni ancora, come quelli che governano alcune fasi della replicazione del DNA e quelli della divisione cellulare, sono espressi in maniera discontinua, in accordo con le varie fasi del ciclo cellulare.

Elementi del controllo dell'espressione genica

Un ruolo centrale nella espressione e attività dei geni è svolto dalla RNA-P che non solo è responsabile della sintesi dell'mRNA ma che riconosce anche i segnali per ini-

ziare e terminare la trascrizione e i fattori proteici accessori (positivi e negativi) che determinano quando il processo deve iniziare o essere represso.

In queste molteplici attività sono coinvolte le varie parti funzionali della RNA-P, una molecola ad alto p.m. (circa 480.000 dalton per quella dell'*E. coli*), costituita da un nucleo centrale (E) responsabile della attività catalitica e dal fattore proteico σ che riconosce il *promotore*, una breve sequenza di DNA che determina l'inizio dell'informazione da trascrivere. Al complesso (E σ), chiamato *oloenzima*, si associano poi altri peptidi che hanno un ruolo nella terminazione della trascrizione.

Il promotore (fig. 1), inizialmente definito geneticamente da una particolare classe di mutazioni che mostravano effetti sul livello di espressione genica, è il bersaglio primario della RNA-P e dei fattori sia positivi che negativi che controllano l'inizio della trascrizione. Questa regione, di circa 60 nucleotidi, è localizzata a monte del gene, o gruppo di geni, da trascrivere. Il confronto delle sequenze nucleotidiche di oltre 100 promotori di *E. coli* ha mostrato che pur non essendoci due promotori identici fra loro, hanno tutti peculiarità strutturali comuni. Presentano infatti due tratti di sequenza di 6 paia di basi, abbastanza conservati e fondamentali per il funzionamento del promotore che sono localizzati rispettivamente in posizione -10 e -35 dal punto di inizio della trascrizione (definito come +1).

Meccanismi molecolari del controllo dell'espressione genica

Controllo dell'inizio della trascrizione

La frequenza con cui inizia la trascrizione da un promotore è di per sé il primo livello del controllo dell'espressione di un gene. In *E. coli* queste frequenze possono variare di 4 ordini di grandezza tra geni trascritti meno di una volta per generazione a quelli trascritti una volta per secondo. Parte importante di tale intrinseca diversità è dovuta al livello di conservazione della sequenza -10 e -35 del promotore stesso.

Regolazione da fattore σ

La specificità di riconoscimento del promotore conferita dal fattore σ alla RNA-P, è una strategia efficiente per attivare l'espressione di particolari gruppi di geni e la coregolazione di geni non adiacenti sul cromosoma. Il meccanismo si basa sul fatto che esistono vari fattori σ e l'associazione di uno o l'altro con il nucleo (E) della RNA-P diversifica una famiglia di oloenzimi, ciascuna con propria specificità per gruppi di promotori. Il fattore σ^{70} è quello

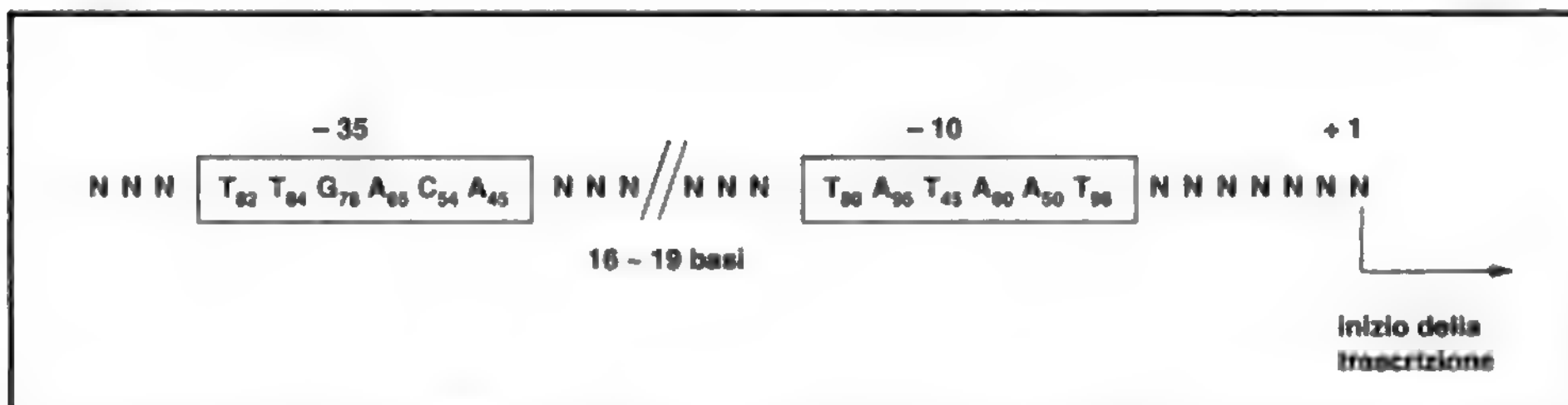


Fig. 1. Struttura del promotore procariotico. La sequenza (+1) è il punto in cui inizia la trascrizione. A 5-9 nucleotidi a monte troviamo l'esamero -10 e oltre ancora di 16-19 nucleotidi l'esamero -35. Le lettere indicano i quattro tipi di nucleotidi del codice genetico, mentre il numero sotto le lettere rappresenta il livello di conservazione della sequenza (T₉₆ per l'esamero -10 significa che in 96% dei casi esaminati si trova questo nucleotide in questa posizione). Variazioni rispetto a questa struttura detta «consenso» cambiano la «forza» del promotore.

che riconosce la maggior parte dei promotori e assicura oltre il 90% della attività trascrizionale della cellula. Le altre forme meno abbondanti e per questo dette minori, assicurano il controllo dei geni coinvolti nel metabolismo dell'azoto, nella sintesi delle proteine flagellari, nella espressione di geni essenziali in particolari condizioni di crescita (condizioni di stress, carenze nutrizionali al carbonio e all'azoto), nella sporulazione, nel *regulon heat-shock* coinvolto nella risposta della cellula batterica quando viene sottoposta a stress termici.

Controllo positivo

Questo tipo di controllo può essere attuato incrementando la «forza» basale del promotore, attraverso uno o più meccanismi quali l'interazione con una (o più) proteine attivatrici, l'uso di un fattore σ specifico, il cambiamento conformazionale del DNA, l'interazione di piccole molecole con il promotore o con la RNA-P. Tutti questi fattori non sono mutualmente esclusivi, ma possono agire in maniera concertata. Ad esempio una buona espressione dei geni coinvolti nel catabolismo del lattosio esige non solo una particolare conformazione del DNA ma anche il legame della proteina CAP sul loro promotore, in prossimità del sito di legame della RNA-P. In assenza di CAP, la RNA-P si lega male riducendo l'espressione a circa il 2% del livello normale.

Controllo negativo

L'esempio classico di controllo negativo è fornito in *E. coli* dall'organizzazione e dall'espressione dei geni della via catabolica del lattosio. Questo sistema, che ha permesso di gettare le basi conoscitive e di sviluppare le metodologie per indagare sui meccanismi che regolano l'espressione genica, è stato studiato da Monod e Jacob all'Istituto Pasteur

di Parigi alla fine degli anni cinquanta in una serie di ricerche che sono state una vera pietra miliare nello sviluppo della Biologia molecolare.

Il lattosio per essere catabolizzato dal batterio deve poter entrare nella cellula, ed essere idrolizzato nei suoi componenti (il glucosio ed il galattosio). Un gruppo di geni, *lacZ lacY lacA*, sono responsabili di questi processi e la loro regolazione è tale che la presenza di lattosio induce la sintesi dei loro prodotti che aumentano drasticamente rispetto al livello basale che si osserva in assenza dello zucchero. Ad es., in assenza di lattosio si hanno circa 60 molecole di β -galattosidasi (enzima responsabile dell'idrolisi del lattosio, prodotto dal gene *lacZ*) per cellula, mentre in presenza di lattosio il loro numero arriva ad alcune migliaia. L'organizzazione di questi geni è fondamentale per la loro stessa regolazione: *lacZ lacY* e *lacA* sono adiacenti l'uno all'altro con un unico promotore (p_{lac}).

L'espressione dei geni *lac* è sottoposta ad un controllo negativo esercitato da una proteina chiamata *repressore*, codificata dal gene regolatore *lacI*, separato dal gruppo dei geni *lac* e dotato di un proprio promotore (fig. 2, a). Il repressore riconosce un sito (*operatore*) contiguo al promotore a monte di *lacZ* dal quale viene prodotto un mRNA comune (mRNA policistronico). L'interazione repressore-operatore ostacola la RNA-P impedendo la trascrizione da p_{lac} e spegne quindi l'espressione genica. L'induzione è a sua volta il risultato del legame fra un derivato intracellulare del lattosio con il repressore. Il repressore subisce una modificazione allosterica che permette la riaccensione dei geni *lac* (fig. 2, b).

Il sistema, costituito da un elemento genetico (*operatore*) che coordina l'attività trascrizionale della RNA-P, è stato definito "*operon*" nel modello regolativo proposto da Jacob e Monod.

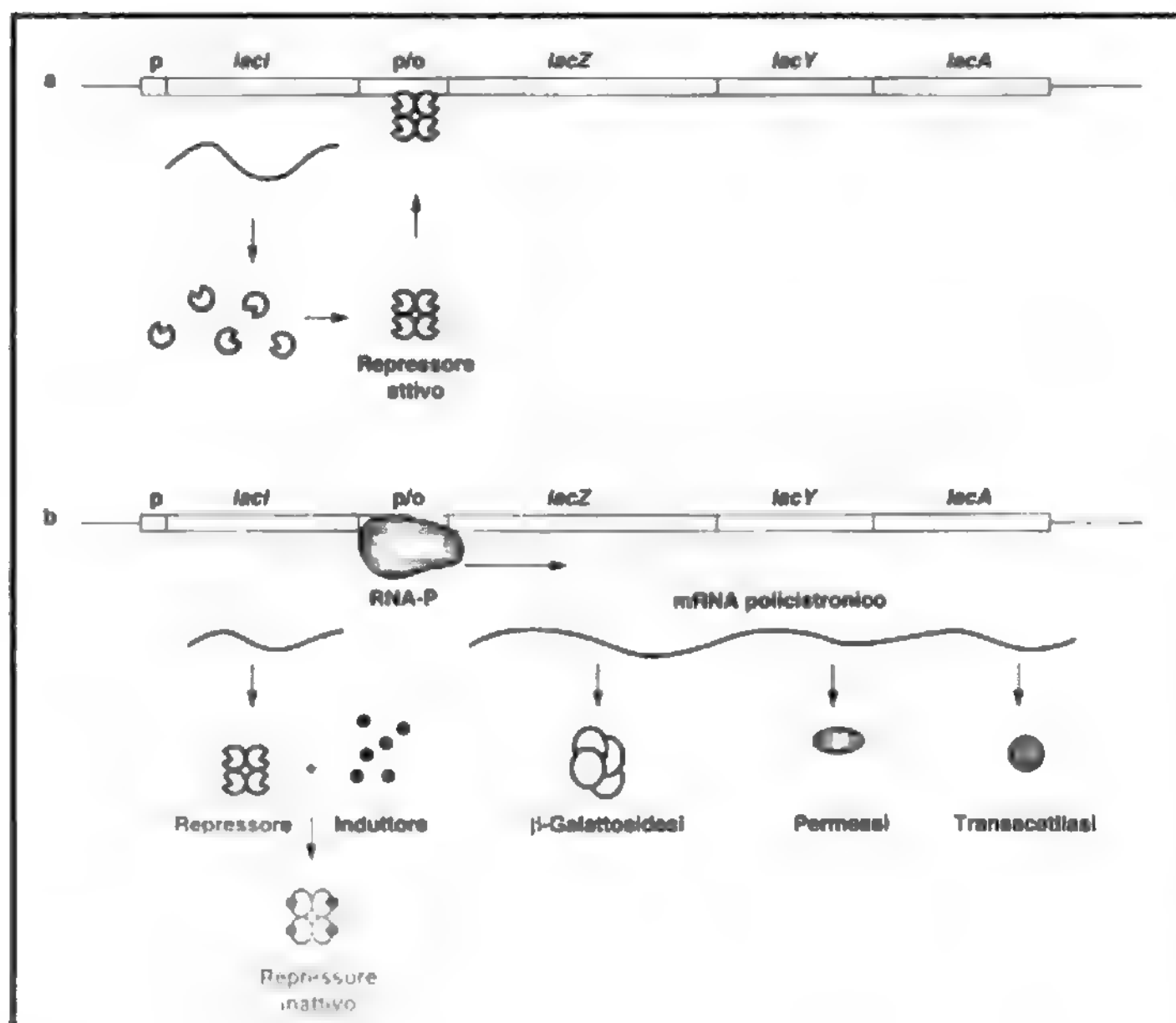
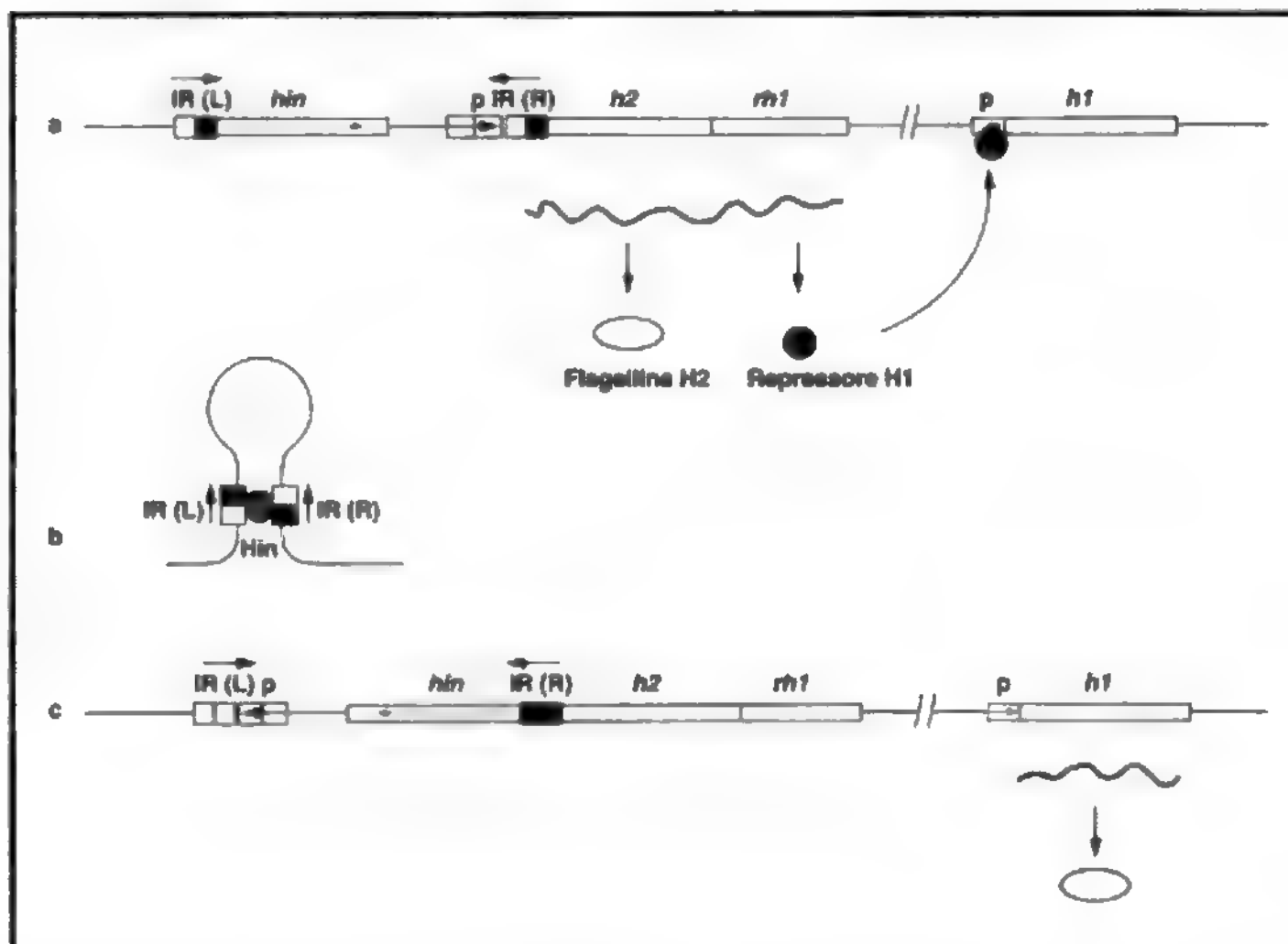


Fig. 2. Organizzazione e regolazione dei geni *lac*. In alto, da sinistra, il gene *lacI* (che codifica per il repressore) con il proprio promotore e terminatore e con l'estremità adiacente alla regione promotore-operatore p_{lac} , seguono i geni *lacZ*, *lacY*, *lacA* e il terminatore. a) Il repressore codificato dal gene *lacI*, si lega all'operatore di p_{lac} , impedendo la trascrizione dell'operone. La presenza del lattosio (b) modifica la struttura del repressore che si stacca dall'operatore. L'espressione dell'operone viene così riaccesa.

Fig. 3. Meccanismo della variazione di fase in *Salmonella typhimurium*. L'inversione di una regione del DNA adiacente ai geni *h2* e *rh1* accoppia o separa il promotore (p) da questi geni. In *a* il gene *h2* codifica per la flagellina H2 mentre il prodotto del gene *rh1* reprime l'espressione del gene *h1* che codifica per la flagellina H1. In *b* la proteina HIN prodotta dal gene *hin* media la ricombinazione a livello delle sequenze ripetute ed invertite IR(L) e IR(R) e conduce al nuovo assetto genetico (*c*). In questo assetto i geni *h2* e *rh1* sono invertiti rispetto al promotore (p) e si esprime quindi *h1* dal proprio promotore.



È importante sottolineare che il sistema di controllo del tipo operonico (riscontrato in molti gruppi di geni) è estremamente efficace nella economia energetica della cellula a cui i processi di induzione-repressione forniscono la capacità immediata a biosintetizzare un enzima solo se il suo substrato è disponibile. Naturalmente, sono state descritte variazioni più o meno estese rispetto alla struttura dell'operone *lac*. Alcune di queste sono di natura strutturale, come la presenza di più promotori, per es. nel caso dell'operone *gal*.

Regolazione di operoni complessi

L'estensione più rappresentativa del modello dell'operone *lac* è quella dei «*regulon*»: sistemi costituiti da più operoni coregolati da un stesso repressore. Un esempio interessante è fornito dal sistema «risposta SOS» che viene attivato dalla cellula per riparare un danno recato alla molecola del DNA da radiazione (raggi U.V. e raggi X) o composti chimici. La risposta SOS coinvolge almeno 17 geni organizzati in operoni indipendenti (geni *din* per «inducibile»), localizzati in siti sparsi sul cromosoma, ma controllati tutti da uno stesso repressore: la proteina LexA. Un danno al DNA induce una proteasi specifica (RecA) che inattiva le molecole di LexA liberando i promotori dei geni sottoposti al suo controllo. L'espressione del *regulon* SOS viene così avviata e procede fino a quando il danno non sia stato riparato, poi il sistema torna ad essere represso.

Il duplice meccanismo di controllo positivo e negativo dell'operone *lac* è in realtà illustrativo solo di uno dei circuiti regolativi dell'espressione genica nei microrganismi. Infatti, se a tale regolazione è possibile ricondurre molti gruppi di geni, per altri il sistema di controllo può presentare variazioni più o meno estese o ricorrere a «logiche regolative» di diversa natura.

La regolazione dell'espressione genica ed i meccanismi che la mediano è uno dei temi centrali della Biologia moderna. Solo alcuni esempi più rappresentativi delle strategie sviluppate nel corso dell'evoluzione per regolare

l'espressione dei geni sono qui di seguito descritti. Altri meccanismi potranno dunque essere scoperti ed è importante sottolineare che per uno stesso gene si possono riscontrare più logiche regolative o, addirittura, meccanismi che appaiono come «mosaici» in cui coesistono diverse forme regolative.

Regolazione per inversione programmata di un tratto di DNA

Nei microrganismi sono noti molti esempi di regolazione dell'espressione genica che richiedono un evento ricombinativo che, invertendo una sequenza del DNA, cambia l'organizzazione di uno o più geni rispetto ai loro elementi regolatori. In un assetto viene espresso un gruppo di geni, in quello opposto, uno alternativo. Poiché il passaggio da un assetto all'altro è reversibile (con una frequenza compresa tra 1×10^{-5} e 1×10^{-6}) si hanno, nella progenie derivata da un singolo batterio, sottopopolazioni caratterizzate da cambiamenti nella espressione di alcuni gruppi di geni.

Un esempio classico è la regolazione dei geni *h1* e *h2* che codificano per le proteine flagellari H1 e H2 in *Salmonella typhimurium* (fig. 3). I due geni sono localizzati in due diverse regioni del cromosoma, ed in particolare *h2* appartiene ad un operone di cui fa parte anche *rh1*, che codifica per il repressore della trascrizione di *h1*. Quando la cellula esprime *h2*, sintetizzerà anche il repressore RH1, le proteine flagellari H1 non saranno quindi fatte. In seguito ad un evento di ricombinazione il tratto di DNA contenente *h2* ed *rh1* viene invertito ed i due geni non trovandosi più sotto il controllo del loro promotore, non potranno essere trascritti. Le proteine flagellari H2 non saranno prodotte come pure il repressore RH1 mentre l'espressione del gene *h1* sarà libera di procedere per la sintesi delle proteine flagellari del tipo H1.

In alcuni batteri patogeni, meccanismi analoghi permettono di esprimere molte varianti antigeniche che consentono al microrganismo di eludere alla risposta immunitaria nell'ospite infettato.

Regolazione mediante la produzione di RNA antisenso

Questo meccanismo si basa su un blocco esercitato sulla molecola di mRNA dall'appaiamento specifico con un mRNA complementare. Si forma pertanto una struttura di RNA a doppio filamento che impedisce la traduzione del messaggero che viene eventualmente degradato. Alcuni esempi di uso di questo meccanismo sono stati descritti nel controllo del mantenimento di alcune classi di plasmidi, nel livello di sintesi di alcune proteine batteriche, nella inibizione della mobilità di alcuni trasposoni.

L'uso di RNA antisenso per bloccare alcune infezioni virali è una possibile potenzialità applicativa in medicina di questo raffinato sistema di controllo dell'espressione genica.

V. ANTISENTO OLIGONUCLEOTIDI** (coll. **498-506).

Bibliografia

- Aitano P., Bruni C. B., Carlomagno M. S., *Genetica*, 1994, **94**, 152.
 Beckwith J., *The Lactose Operon*, in Neidhardt F. C. ed., *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, vol. 2, 1987, American Society for Microbiology, Washington D. C.
 Beckwith J., *The Operon: An Historical Account*, in Neidhardt F. C. ed. (op. cit., 1987)
 Botsford J. L., Harman J. G., *Microbiol. Rev.*, 1992, **56**, 100.
 David M., Daveran M. L., Batut J. et al., *Cell*, 1988, **54**, 671.
 Glasgow A. C., Hughes K. T., Simon M. I., *Bacterial DNA Inversion Systems*, in Berg D. E., Howe M. M. eds., *Mobile DNA*, 1989, American Society for Microbiology, Washington D. C.
 Gottesman S., *Annu. Rev. Genet.*, 1984, **18**, 415.
 Helmann J. D., Chamberlain M. J., *Ann. Rev. Biochem.*, 1988, **57**, 839.
 Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 318.
 Jacob F., *C. R. Seances Acad. Sci. III*, 1993, **316**, 547.
 Klier A., Msadek T., Rapoport G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1992, **46**, 429.
 Liao S. M., Wu T., Chiang C. H. et al., *Genes & Development*, 1987, **1**, 197.
 McCarthy J. E., Gualerzi C., *Trends Genet.*, 1990, **6**, 78.
 Mishra R. K., Chatterji D., *Mol. Microbiol.*, 1993, **8**, 507.
 Mulligan M. E., Hawley D. K., Enriken R., McClure W. R., *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 789.
 Neidhardt F. C. ed., *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, vol. 2, 1987, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 Neidhardt F. C., *Multigene Systems and regulons*, in Neidhardt F. C. ed., (op. cit., 1987).
 Nellen W., Lichtenstein C., *Trends Biochem. Sci.*, 1993, **18**, 419.
 Platt T., *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, **55**, 339.
 Ptashne M., *A Genetic Switch: Gene Control and Phage Lambda*, 1986, Cell Press and Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA and Palo Alto, CA.
 Raibaud O., Schwartz M., *Annu. Rev. Genet.*, 1984, **18**, 173.
 Reznikoff W. S., Burgess R. R., Dahlberg J. E. et al., *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*, 1987, Elsevier, New York.
 Reznikoff W. S., Siegel D. A., Cowing D. W., Gross C. A., *Annu. Rev. Genet.*, 1985, **19**, 355.
 Silverman M., Simon M., *Phase Variation and Related Systems*, in Shapiro J. A., *Mobile Genetic Elements*, 1983, Academic Press, London.
 Simons R. W., Kleckner N., *Annu. Rev. Genet.*, 1988, **22**, 567.
 von Hippel P. H., Bear D. G., Morgan W. D., McSwiggen J. A., *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 389.
 Wagner E. G., Simmons R. W., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, **48**, 713.
 Walker G. C., *The SOS Response of Escherichia coli*, in Neidhardt F. C. ed., (op. cit., 1987).
 Yager T. D., von Hippel P. H., *Transcript Elongation and Termination in Escherichia coli*, in Neidhardt F. C. ed. (op. cit., 1987).

LUCIANO PAOLOZZI

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEGLI EUCARIOTI SUPERIORI

SOMMARIO

Introduzione (col. 2388) - **Sviluppo e regolazione genica** (col. 2388) - **Organizzazione del materiale genetico e livelli di regolazione** (col. 2388) - **Regolazione trascrizionale dell'espressione genica** (col. 2389): *Promotori* - *Enhancers* - *Elementi trans-regolatori* - **Regolazione posttrascrizionale dell'espressione genica** (col. 2394): *Maturazione dell'mRNA* - *Traduzione*.

Introduzione

Negli eucarioti superiori si sono evoluti meccanismi di regolazione dell'espressione genica molto complessi e sofisticati i cui contorni funzionali e strutturali iniziano ad essere parzialmente delineati soltanto adesso. Tale complessità è essenzialmente dovuta a due caratteristiche fondamentali: lo sviluppo e l'organizzazione strutturale del materiale genetico.

Sviluppo e regolazione genica

Lo sviluppo nei metazoi è quel complesso di eventi che, a partire dall'uovo fecondato, porta alla formazione di un organismo attraverso la proliferazione cellulare e il differenziamento. Un organismo pluricellulare è composto da diversi tipi di cellule altamente differenziate e specializzate per la produzione di proteine specifiche. Nelle cellule differenziate, pur essendo mantenuta tutta l'informazione genetica, esiste quindi una espressione differenziale, sia dal punto di vista spaziale che temporale, di gruppi limitati di geni. Durante lo sviluppo, inoltre, segnali esterni, come quelli dovuti ad induttori o ad ormoni, possono cambiare e dirigere l'espressione genica in maniera coordinata. Questo tipo di regolazione può indurre una cellula ad esprimere molte proteine specifiche in un dato tempo o attivare coordinatamente gli stessi geni in diversi tipi cellulari.

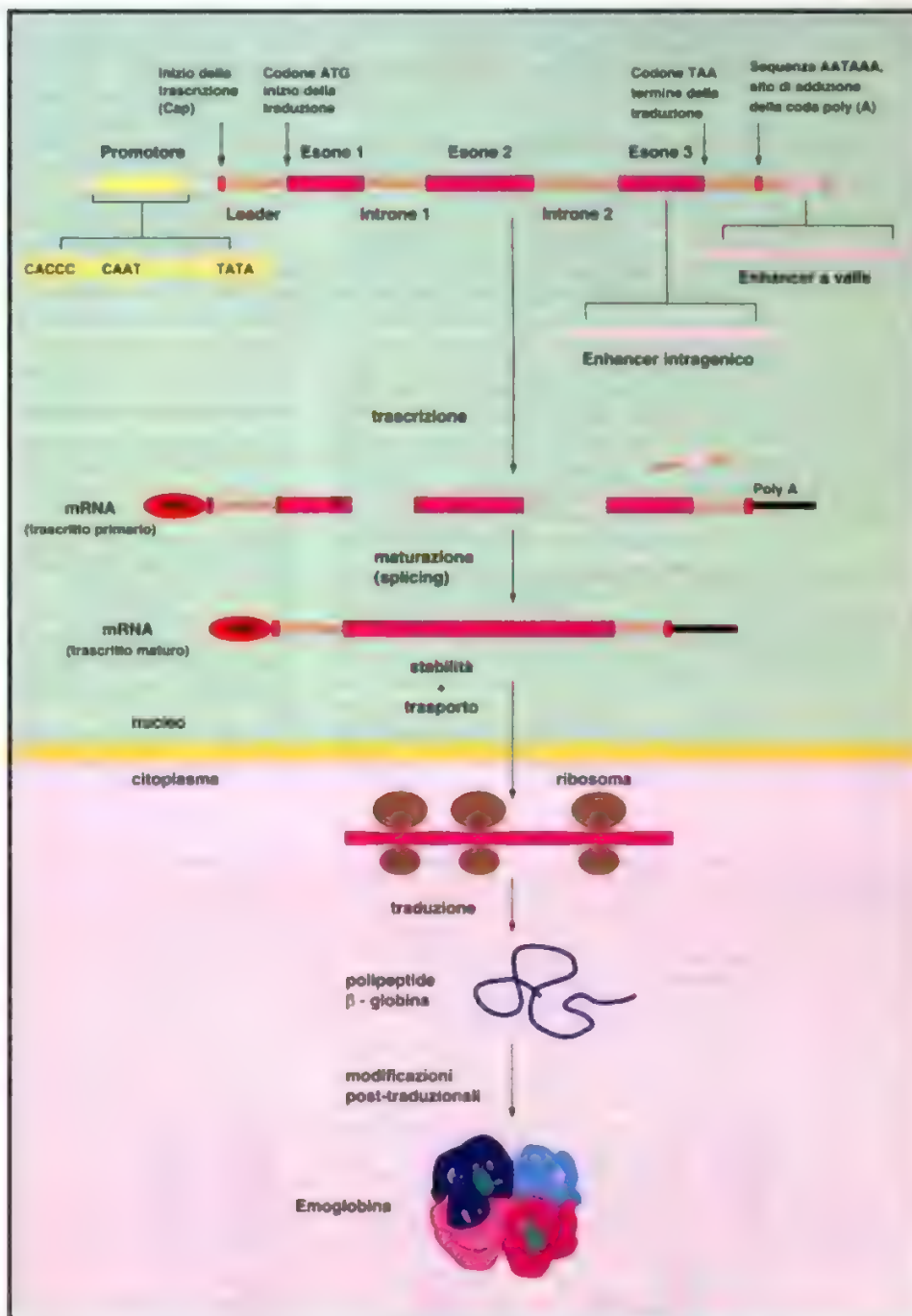
Organizzazione del materiale genetico e livelli di regolazione

Negli eucarioti il DNA si trova complessato con le proteine istoniche per formare speciali subunità strutturali chiamate nucleosomi (v.; v. anche CROMOSOMA*). L'insieme dei nucleosomi forma la fibra di cromatina che rappresenta l'unità base del materiale genetico eucariotico. È facilmente intuibile come la presenza di una fibra cromatinica ponga seri problemi agli apparati della trascrizione per quanto riguarda l'accessibilità ai geni di cui è richiesta l'espressione. Nelle cellule eucariotiche, inoltre, i processi di trascrizione sono separati temporalmente e spazialmente da quelli di traduzione. In queste cellule il materiale genetico è infatti compartimentalizzato nel nucleo dove hanno luogo essenzialmente la trascrizione e la maturazione dei trascritti, mentre la traduzione degli RNA messaggeri avviene nel citoplasma. Pertanto, nelle cellule eucariotiche, il trasferimento dell'informazione genetica ai macchinari di traduzione dipende da una sequenza di eventi per ciascuno dei quali si sono evoluti meccanismi di regolazione.

Come mostrato nella fig. 4, la maturazione dei trascritti dei geni eucariotici è un evento particolarmente complesso in quanto tali geni hanno una struttura modulare. Essi sono infatti generalmente composti da sequenze codificanti alternate a sequenze non codificanti denominate rispettivamente «esoni» ed «introni» (v. GENI DISCONTINUI**). Un gene eucariotico viene, di solito, interamente trascritto e le sequenze non codificanti vengono rimosse successivamente per mezzo di un meccanismo denominato *splicing* (v.**) che porta alla formazione del trascritto maturo. Successivamente i trascritti maturi vengono stabilizzati e veicolati attraverso la membrana nucleare sui ribosomi citoplasmatici, dove avviene la traduzione. I polipeptidi neosintetizzati per essere pienamente funzionali devono assumere una corretta conformazione.

La regolazione dell'espressione genica può quindi avvenire a livello trascrizionale e posttrascrizionale. Il livello posttrascrizionale include la maturazione dei trascritti, il trasporto del messaggero nel citoplasma e la traduzione.

Fig. 4. Rappresentazione schematica della successione di eventi che portano alla produzione della β -globina e dell'emoglobina. La figura mostra anche l'organizzazione strutturale del gene della β -globina con la localizzazione degli elementi regolatori in particolare l'*enhancer* (potenziatore) situato nella regione 3' che regola temporaneamente l'espressione del gene e l'*enhancer* localizzato nel terzo introne del gene che permette la trascrizione solo nelle cellule eritroidi.



Regolazione trascrizionale dell'espressione genica

Tra i due livelli di regolazione sopra menzionati, il più rilevante è sicuramente quello trascrizionale. In generale l'espressione genica differenziale dipende dalla trascrizione di geni diversi nei diversi tipi cellulari.

Il primo passo fondamentale per l'attivazione di un gene, normalmente impacchettato nei nucleosomi (v.), è quello di renderlo accessibile ai fattori di trascrizione e quindi competente ad essere trascritto. È generalmente accettato che la competenza di un gene ad essere trascritto sia dovuta essenzialmente al legame di fattori specifici di trascrizione con sequenze di DNA specifiche che portano all'esclusione

dei nucleosomi e alla formazione di complessi di pre-inizio della trascrizione.

Per avere una trascrizione specifica sono richiesti essenzialmente due tipi di elementi regolatori. Un tipo consiste di sequenze particolari di DNA che regolano geni adiacenti (elementi *cis*-regolatori). L'altro tipo consiste di prodotti genici che interagiscono con altri geni situati sullo stesso cromosoma o su cromosomi diversi (elementi *trans*-regolatori).

Nei geni degli eucarioti gli elementi *cis*-regolatori si distinguono ulteriormente in due tipi: i promotori e gli *enhancers* (potenziatori). I promotori specificano il punto di ini-

zio della trascrizione mentre gli *enhancers* dirigono l'espressione spaziale e temporale del gene selezionato.

V. anche sotto: *fattori di trascrizione* (coll. **2395-2405).

Promotori

I promotori sono localizzati immediatamente a monte del sito di inizio della trascrizione e hanno una funzione di ancoraggio per l'apparato generale di trascrizione (fig. 4).

I promotori inoltre, contengono diversi elementi, alcuni dei quali sono generalmente riconosciuti da elementi trans-regolatori ubiquitari ed altri da elementi trans-regolatori tessuto-specifici. Nel promotore della maggioranza dei geni c'è la *TATA box* situata a circa 25-30 paia di basi dal punto di inizio della trascrizione e corrisponde ad una sequenza di 8 paia di basi formata da appaiamenti T = A. Mutazioni nella *TATA box* riducono drasticamente la trascrizione. Un'altra sequenza comune ai promotori di molti geni è la *CAAT box* che si trova a -70 e -80 dal sito di inizio. L'analisi mutazionale ha suggerito che tale sequenza svolga un ruolo fondamentale per quanto riguarda la capacità del promotore nel facilitare la trascrizione. Alcuni promotori contengono altre regioni modulari che possono trovarsi a distanze diverse, con orientamenti diversi e possono essere ripetute.

Per quanto riguarda la funzione dei vari elementi del promotore, sembra che essi siano attivi quando, per un avvolgimento della molecola di DNA, vengono a trovarsi strettamente vicini tra loro.

Enhancers

Gli *enhancers* (potenziatori) sono sequenze di DNA che vengono riconosciute e legate da fattori proteici attivatori.

Essi stimolano il tasso e l'efficienza della trascrizione di un dato promotore mediante un contatto diretto con i componenti dell'apparato generale della trascrizione. Gli *enhancers* possono attivare solo i promotori situati sullo stesso cromosoma anche se a distanze notevoli da essi. Inoltre possono essere localizzati sia a monte che a valle del gene o negli introni. Gli *enhancers* possono regolare sia il tempo che la specificità cellulare dell'espressione di un dato gene.

Per esempio, come mostrato in fig. 4, nel gene della β -globina esiste un *enhancer* situato nella regione 3' che è responsabile del controllo temporale della trascrizione genica durante lo sviluppo. Esiste inoltre un altro *enhancer* situato nel terzo introne che invece è responsabile dell'espressione tessuto-specifica del gene, permettendo la sua trascrizione solo nelle cellule eritroidi.

Elementi trans-regolatori

Tra gli elementi trans-regolatori, chiamati collettivamente *fattori di trascrizione* (v. sotto col. **2395), ci sono quelli che si legano ai promotori e quelli che si legano agli *enhancers*. Essi possiedono generalmente due domini, uno per il legame al DNA dei promotori o degli *enhancers* e l'altro per l'interazione proteina-proteina. Malgrado i numerosi problemi ancora irrisolti, appare tuttavia abbastanza chiaro che l'interazione di legame, tra questi fattori e tra loro e il DNA, sia essenziale per determinare un rapporto funzionale tra l'apparato generale della trascrizione situato sul promotore e l'apparato regolatore costituito dai vari *enhancers*.

La fig. 5 mostra schematicamente come l'interazione tra il promotore del gene della β -globina e l'*enhancer* situato

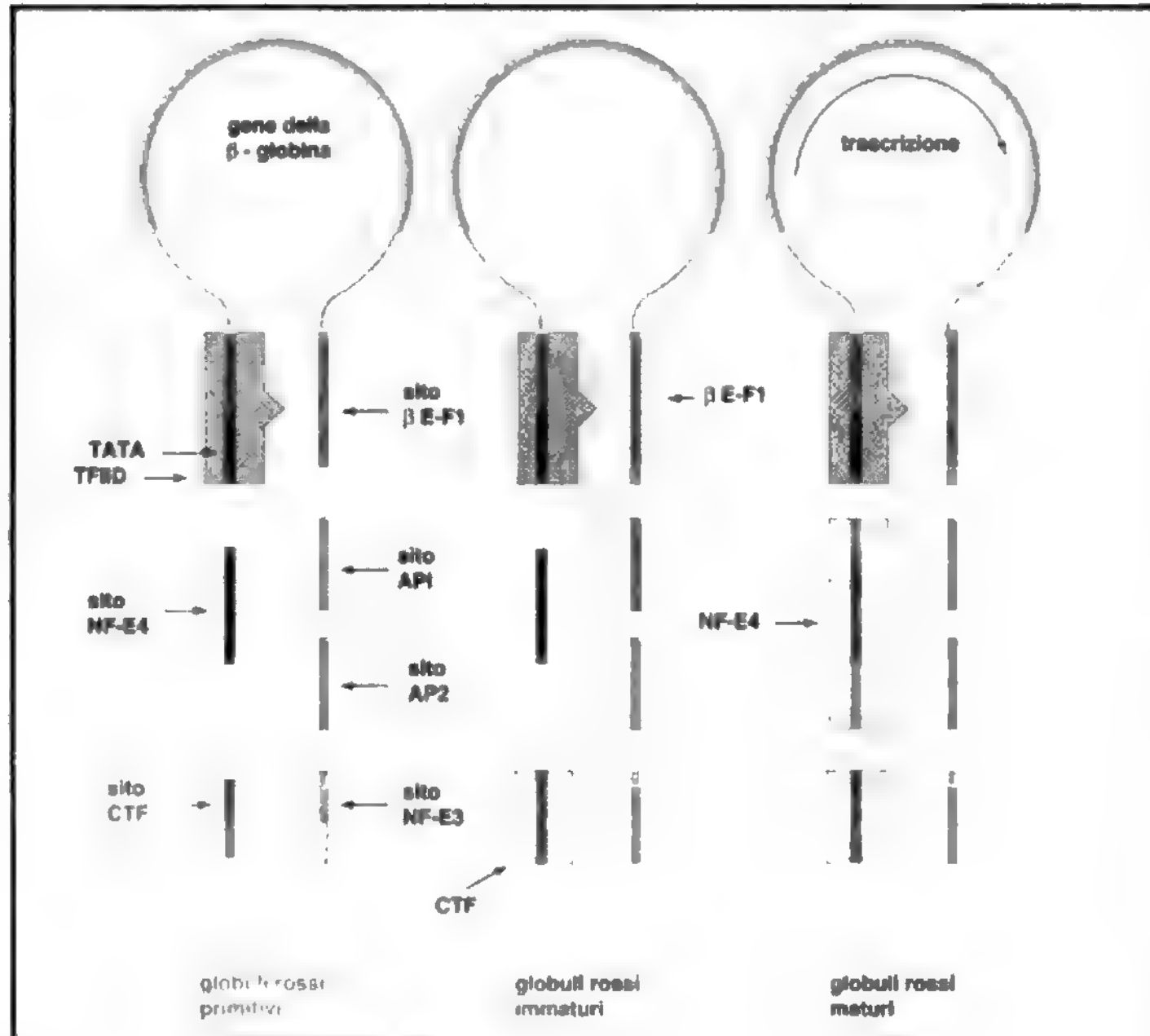
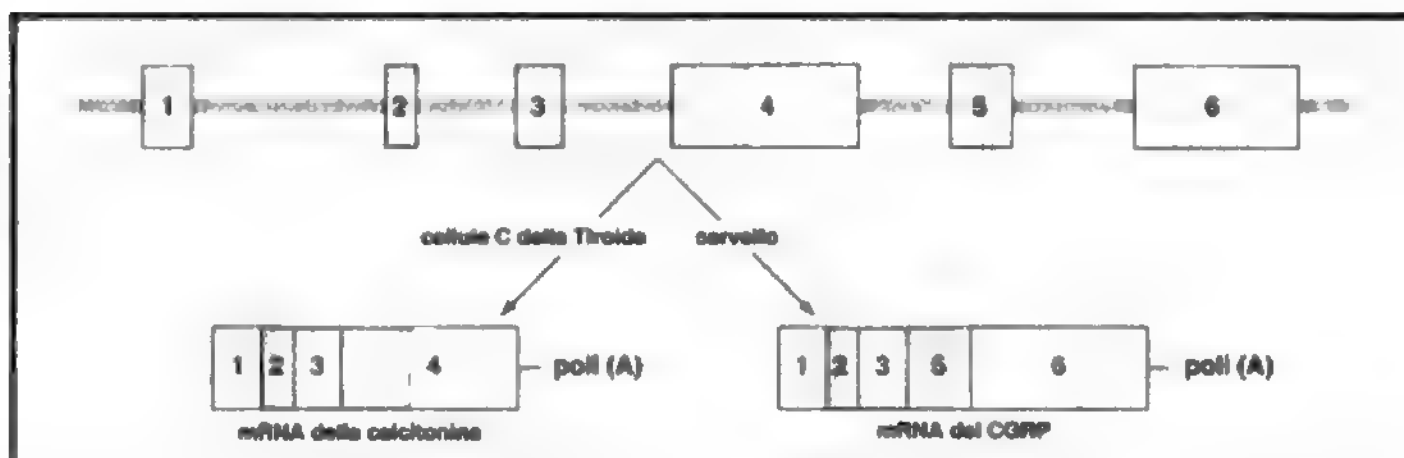


Fig. 5. Modello di regolazione della trascrizione del gene della β -globina durante lo sviluppo del pulcino dovuta all'interazione promotore-*enhancer*. Durante la maturazione dei globuli rossi fattori regolatori neosintetizzati si legano sia al promotore che all'*enhancer* instaurando una interazione proteina-proteina tra questi due elementi. Nei globuli rossi maturi viene sintetizzato un ultimo fattore (NF-E4) che, legandosi al promotore, stabilizza l'interazione con l'*enhancer* per una efficiente sintesi della globina.

Fig. 6. *Splicing* alternativo (v.***) del gene della calcitonina e del neuropeptide (CGRP). Nelle cellule della tiroide e del cervello vengono utilizzati esoni differenti per produrre i due diversi RNA messaggeri.



nella regione 3' sia responsabile della regolazione temporale della trascrizione del gene durante la maturazione del globulo rosso nel pulcino.

I principali fattori trascrizionali che si legano ai promotori dei geni codificanti per le proteine sono quelli dell'apparato generale di trascrizione che consente un livello basale di trascrizione. Tale apparato consiste in un complesso multiproteico comprendente i *fattori basali* di trascrizione denominati TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH e la RNA polimerasi II (v. sotto, col. **2397).

I fattori trascrizionali che si legano ai promotori ed agli *enhancers* possono essere raggruppati in famiglie differenti sulla base di alcune similarità strutturali. Una di queste è la famiglia dei recettori degli ormoni steroidei (v. ORMONI, X, 1925-1927, figg. 3 e 4; ORMONI**; v. anche RECETTORI [v.; v.*]). È noto che gli ormoni steroidei sono capaci di innalzare il livello della trascrizione di numerosi geni in maniera coordinata. Ciò è dovuto al legame dell'ormone con una proteina recettore ormone-specifica la quale assume una conformazione che gli permette di entrare nel nucleo e di legare particolari sequenze di DNA comuni a molti geni. Tali sequenze sono denominate «elementi di risposta all'ormone» e possono trovarsi sia negli *enhancers* che nei promotori.

Altre famiglie importanti sono costituite da gruppi di proteine contenenti diversi domini di legame al DNA o motivi strutturali. Tra queste ci sono tre famiglie principali: le proteine che contengono il motivo *zinc finger* (v. SONDE MOLECOLARI*, *6749 [fig. 14]; EMBRIOLOGIA*, *2525 [fig. 1]; v. anche sotto, col. **2411), quelle che contengono il motivo *helix-turn-helix* e quelle che contengono il motivo *leucine zipper*.

I fattori trascrizionali *zinc finger* sono sequenze aminoacidiche contenenti due cisteine e due istidine ripetute ad intervalli regolari capaci di legare covalentemente atomi di zinco producendo la formazione di anse chiamate *zinc finger* (dito di zinco). Questo dominio è stato trovato anche in molti proto-oncogeni e in geni che regolano lo sviluppo in *Drosophila*.

Il dominio *helix-turn-helix* è un altro dominio di legame al DNA caratterizzato da due alfa eliche adiacenti separate da una serie di torsioni che producono una configurazione capace di legare il DNA.

Una classe importante di proteine che possiedono questo motivo sono le proteine contenenti il cosiddetto *omeobox*. Questa sequenza è stata scoperta per la prima volta in una classe di geni di *Drosophila* (geni omeotici), che è di fondamentale importanza per il controllo dello sviluppo di questo organismo (v. OMEOTICI GENI**); v. anche EMBRIOLOGIA [v*; v.**]).

Il dominio *leucine zipper* corrisponde ad una sequenza di 35 aminoacidi nella quale ci sono 4 leucine separate ciascuna da 7 aminoacidi. Questa regione forma una elica

nella quale, ad ogni giro, le leucine si trovano esposte esternamente dalla stessa parte. Due molecole di questo tipo sono in grado di dimerizzare attraverso l'interazione delle leucine che formano una specie di cerniera. Questo dominio infatti è tipico delle proteine che legano il DNA sotto forma di dimero. La regione di legame al DNA è comunque una *helix-turn-helix*.

Regolazione postrascrizionale dell'espressione genica

Maturazione dell'mRNA

Un numero sempre crescente di evidenze sperimentali, ottenute in vari organismi, indicano che il controllo differenziale della maturazione dei trascritti di RNA precursori, mediante *splicing* alternativo (v.**), rappresenta un meccanismo di regolazione dell'espressione genica di grande rilevanza. La rimozione differenziale degli introni da un RNA precursore durante la maturazione può infatti generare proteine differenti in tempi diversi e in cellule diverse. In fig. 6 è riportato uno degli esempi, ormai numerosi, relativi ad una maturazione differenziale di un RNA precursore. Nel caso mostrato, il pre-RNA viene maturato nel messaggero dell'ormone calcitonina in alcune cellule della tiroide, e nel messaggero per un neuropeptide nelle cellule nervose.

Lo *splicing* alternativo, oltre a produrre proteine diverse a partire dallo stesso gene, può dirigere processi di sviluppo come nel caso della determinazione del sesso in *Drosophila*.

Traduzione

Ci sono livelli di regolazione postrascrizionale per i quali, malgrado le informazioni siano ancora insufficienti per una generalizzazione, esistono alcuni esempi. Per esempio, lo studio della regolazione della biosintesi delle tubuline alfa e beta ha fornito forti indicazioni che il controllo della stabilità degli mRNA citoplasmatici può essere un fattore importante di regolazione a livello della traduzione. Le tubuline alfa e beta sono le subunità che costituiscono i microtubuli eucariotici (v. MICROTUBULI*). Quando le tubuline libere si trovano a basse concentrazioni la loro sintesi viene stimolata mentre, al contrario, viene inibita quando tali molecole si trovano ad alte concentrazioni. La concentrazione di tubuline alfa e beta libere sembra svolgere un ruolo importante anche nel meccanismo di regolazione che viene innescato subito dopo l'inizio della traduzione. Secondo il modello più accettato, i primi quattro aminoacidi della catena polipeptidica nascente vengono riconosciuti e legati da fattori di regolazione. Questi fattori, entrando in contatto con le molecole libere delle tubuline, attiverebbero una RNasi che, attraverso la degradazione dell'mRNA, bloccherebbe la biosintesi delle tubuline.

Lo stesso meccanismo sembra essere coinvolto anche nella regolazione dell'espressione dei geni degli istoni e di alcuni fattori trascrizionali per i linfociti e le citochine. In generale, questo tipo di regolazione sembra influenzare la

stabilità degli mRNA mediante un'interazione tra l'elemento regolatore e il polipeptide nascente che provocherebbe l'attivazione di una RNasi con la conseguente degradazione del messaggero.

Infine, anche se non è direttamente connessa con il controllo dell'espressione genica, è importante notare che le catene polipeptidiche sono sottoposte a modificazioni postraduzionali. Queste modificazioni consistono in trasformazioni biochimiche di tipo diverso la cui descrizione esula dallo scopo di questa breve rassegna sulla regolazione genica negli eucarioti. Le modificazioni postraduzionali possono tuttavia essere fondamentali per la funzionalità del prodotto proteico finale e per la regolazione della sua attività.

Bibliografia

- Beato M., *Cell*, 1989, **56**, 335.
 Buratowski S., Hahn S., Guarente L., Sharp P. A., *Cell*, 1989, **56**, 549.
 Crenshaw III E. B., Russo A. F., Swanson L. W., Rosenfeld M. G., *Cell*, 1987, **49**, 389.
 deBoer E., Antoniou M., Mignotte V., Grosveld F., *EMBO J.*, 1988, **7**, 4203.
 Gallarda J. L., Foley K. P., Yang Z., Engel J. D., *Genes Dev.*, 1989, **3**, 1845.
 Gehring W. J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1985, **50**, 243.
 Gilbert S. F., *Developmental Biology*, 1991, Sinauer Associates, Inc.
 Green S., Chambon P., *Trends Genet.*, 1988, **4**, 309.
 Kaiser K., Meisterernst M., *Trends Biochem. Sci.*, 1996, **9**, 342.
 Lawn R. M., Efstradias A., O'Connell C., Maniatis T., *Cell*, 1980, **21**, 647.
 Lewin B., *Genes VI*, 1997, Oxford University Press, Oxford.
 Roeder R. G., *Trends Biochem. Sci.*, 1996, **9**, 327.
 Strachan T., Read A. P., *Genetica umana molecolare*, 1997, UTET, Torino.
 Tjian R., Sauer F., *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 1997, **7**, 177.
 Trudel M., Constantini F., *Genes Dev.*, 1987, **1**, 954.

SERGIO PIMPINELLI

FATTORI DI TRASCRIZIONE

SOMMARIO

Regolazione trascrizionale (col. 2395). - **Fattori basali di trascrizione** (col. 2397). - **Fattori specifici di trascrizione** (col. 2398): *Struttura modulare*. - *Risposta ai segnali*. - *Formazione di dimeri*. - *Fattori regolatori principali*. - **Repressori trascrizionali** (col. 2404). - **Conclusioni** (col. 2404).

Regolazione trascrizionale

Ogni cellula del corpo umano deve costantemente fare in modo che solo una parte dell'informazione contenuta nel suo DNA venga selettivamente utilizzata. Infatti appena il 10% della sequenza di DNA si ritrova sotto forma di RNA-messaggero che, dopo aver superato una serie di

ulteriori controlli, cede il suo contenuto d'informazione per la sintesi di specifiche proteine. Una parte di questa percentuale comprende quei geni necessari per il funzionamento di base ed è comune alla maggior parte delle cellule, mentre il resto è costituito da sequenze diverse a seconda del tipo di cellula: in una cellula del sangue vengono utilizzati dei geni diversi (e quindi prodotte proteine diverse) rispetto ad una cellula muscolare o a una cellula epatica. In ultima analisi le caratteristiche e il comportamento di una cellula dipendono da quali geni, tra tutti quelli presenti nel DNA, vengano utilizzati per la produzione di RNA-messaggero. Quindi per mantenere il delicato equilibrio necessario alla sopravvivenza di un organismo è necessario un controllo del tipo e della quantità di geni che devono essere trascritti in ogni momento. Alterazioni di tale controllo possono determinare patologie più o meno gravi come nel caso estremo di una cellula cancerosa che deve il suo comportamento anomalo anche ad alterazioni del controllo trascrizionale.

La trascrizione selettiva di alcuni geni è il risultato di interazioni complesse che dipendono dalla localizzazione e dalla storia di ogni singola cellula. Parecchi aspetti della regolazione trascrizionale sono ancora poco chiari, ma un progresso notevole è stato ottenuto nella comprensione dei meccanismi molecolari che governano l'evento della trascrizione.

La decisione se e quando un particolare gene deve essere trascritto dipende essenzialmente dall'interazione di fattori proteici con sequenze di DNA localizzate normalmente (ma non esclusivamente) nella regione a monte dell'inizio del gene. La porzione del DNA che contiene le informazioni necessarie per la trascrizione del gene può essere di lunghezza variabile e viene definita *promotore* (v. sopra, col. **2391). La regione immediatamente vicina all'inizio di trascrizione è il promotore «basale» mentre la parte più a monte è il promotore «distale» (fig. 7). Al promotore propriamente detto, si devono poi aggiungere gli *enhancer* (potenziatori), elementi importanti per la regolazione quantitativa della trascrizione, che possono essere localizzati anche ad una distanza considerevole dal gene che controllano.

La funzione di un promotore è quella di interagire specificamente con molecole proteiche mediante elementi di sequenza (*box*) lunghi intorno ad una decina di coppie di basi presenti in varie combinazioni nei diversi promotori. La formazione dei complessi DNA-proteine determina le modalità di trascrizione di un gene, quindi il DNA oltre alle istruzioni specifiche per la sintesi di proteine, contiene anche le informazioni necessarie per una corretta trascrizione del gene. La regolazione trascrizionale specifica di un gene dipende dalla particolare combinazione di elementi presenti nel suo promotore (fig. 8).

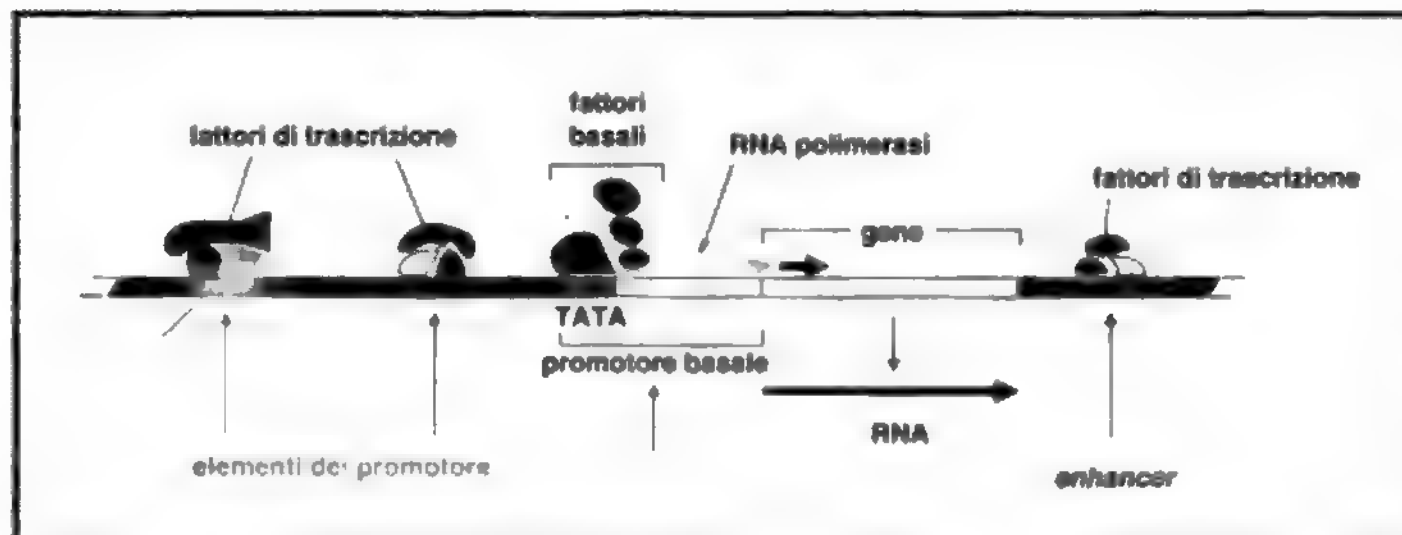


Fig. 7. Schema riassuntivo della regione di controllo di un tipico gene eucariotico. Ogni gene possiede nel proprio promotore una combinazione di elementi di sequenza necessari per la regolazione della trascrizione. Alcuni di questi elementi sono nelle vicinanze dell'inizio di trascrizione (promotore basale), altri possono essere localizzati anche a valle dell'inizio del gene (enhancer). Questi elementi vengono riconosciuti dai fattori di trascrizione (Da Alberts et al., 1994, ridisegnata).

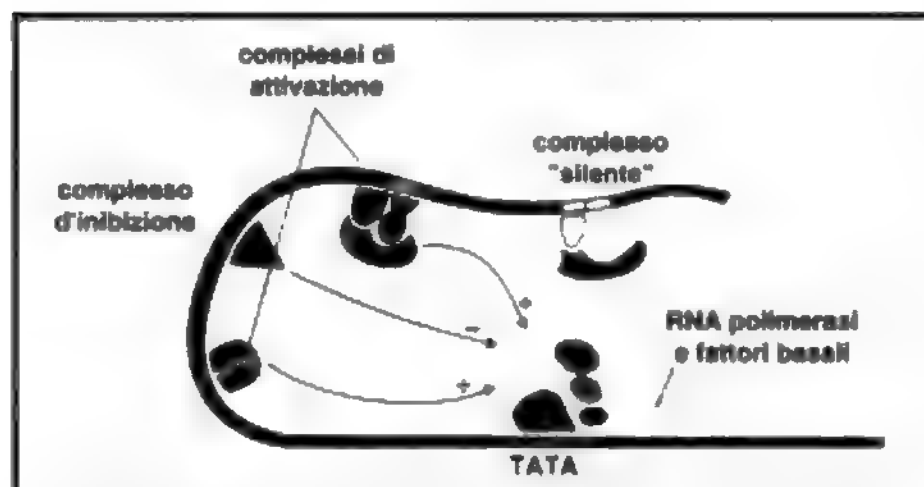


Fig. 8. Formazione del complesso d'inizio della trascrizione. Affinché l'RNA polimerasi inizi la trascrizione di un gene è necessaria la formazione di un complesso di fattori basali con il promotore. La formazione del complesso d'inizio avviene in diversi passaggi e l'RNA polimerasi si lega solo dopo che il promotore è stato riconosciuto dai fattori TFIID, A, B. (Da Alberts et al., 1994, ridisegnata).

Fattori basali di trascrizione

La categoria di molecole che è deputata all'esecuzione delle istruzioni contenute nei promotori è quella dei fattori di trascrizione. Il loro ruolo è quello di fare in modo che l'enzima RNA polimerasi interagisca in maniera corretta con i promotori e venga attivato nella sua funzione di trascrizione del DNA in RNA.

Il riconoscimento di un qualsiasi promotore da parte della RNA polimerasi eucariotica è un evento complesso che coinvolge diverse molecole definite *fattori basali*. Infatti a differenza dei procarioti (batteri; v. sopra, col. **2381), l'enzima non è in grado da solo d'interagire con il promotore di un gene, ma ha bisogno della formazione di un complesso DNA-proteine, detto *complesso d'inizio*. Il fattore TFIID (*transcription factor IID*) è quello che si lega per primo in corrispondenza della sequenza *TATA box* presente nella maggior parte dei promotori a circa 30 coppie di basi dall'inizio della trascrizione. Il complesso TFIID-promotore viene riconosciuto da TFIIA, TFIIB e quindi dalla RNA polimerasi. In seguito altri fattori (TFIIF, TFIIE, TFIIH) completano il complesso d'inizio e la RNA polimerasi inizia la trascrizione del gene (fig. 9); v. anche sopra, col. **2393.

I vari passaggi della formazione del complesso d'inizio sono stati chiariti grazie ad esperimenti compiuti nel laboratorio di Robert Roeder, nei quali l'interazione tra i fattori purificati e il DNA veniva seguita *in vitro*. Precedentemente l'attenzione si era focalizzata su una subunità di TFIID, la TBP (*TATA binding protein*), la cui funzione è quella di interagire direttamente con la sequenza TATA. E infatti TBP da sola sembra in grado di riconoscere il promotore e assicurare una trascrizione basale.

Tuttavia quello che è emerso recentemente dal lavoro di Robert Tjian e collaboratori (1995) è che per una trascrizione regolata sono necessari dei fattori aggiuntivi associati alla TBP chiamati TAF (*TBP associated factor*). La funzione di almeno alcuni dei circa otto TAF è quella di ricevere segnali di stimolazione o inibizione da parte dei fattori specifici di trascrizione (v. sotto) e di trasmetterli al complesso d'inizio.

Quindi i fattori basali sono necessari per il funzionamento di tutti i promotori, ma la specifica regolazione della trascrizione di un gene dipende da un altro gruppo di molecole più numeroso ed eterogeneo, quello dei *fattori specifici di trascrizione*.

Fattori specifici di trascrizione

Struttura modulare

La regolazione trascrizionale negli eucarioti è prevalentemente di tipo positivo. La trascrizione di un gene anziché essere repressa dove non è necessaria, viene attivata nei tessuti e nei momenti dello sviluppo nei quali è richiesta.

In seguito all'identificazione nei promotori e negli *enhancer* degli elementi di sequenza importanti per una corretta espressione di un gene, la ricerca si era concentrata su molecole proteiche che avessero due proprietà: capacità di interagire specificamente con il promotore e capacità di attivare la trascrizione in seguito al legame.

Il primo fattore che rispondeva ai requisiti venne purificato nel laboratorio di Robert Tjian nei primi anni '80. La proteina, chiamata Sp1 (*specificity protein 1*), si legava alla sequenza *GC box* (perché ricca in G e C) e se aggiunto ad un sistema di trascrizione *in vitro* era in grado di stimolare l'attività dell'RNA polimerasi specificamente sul gene che conteneva la *GC box*. L'isolamento di Sp1 permise lo sviluppo di una serie di tecniche sperimentali specifiche per l'identificazione dei fattori di trascrizione. E molti altri fat-

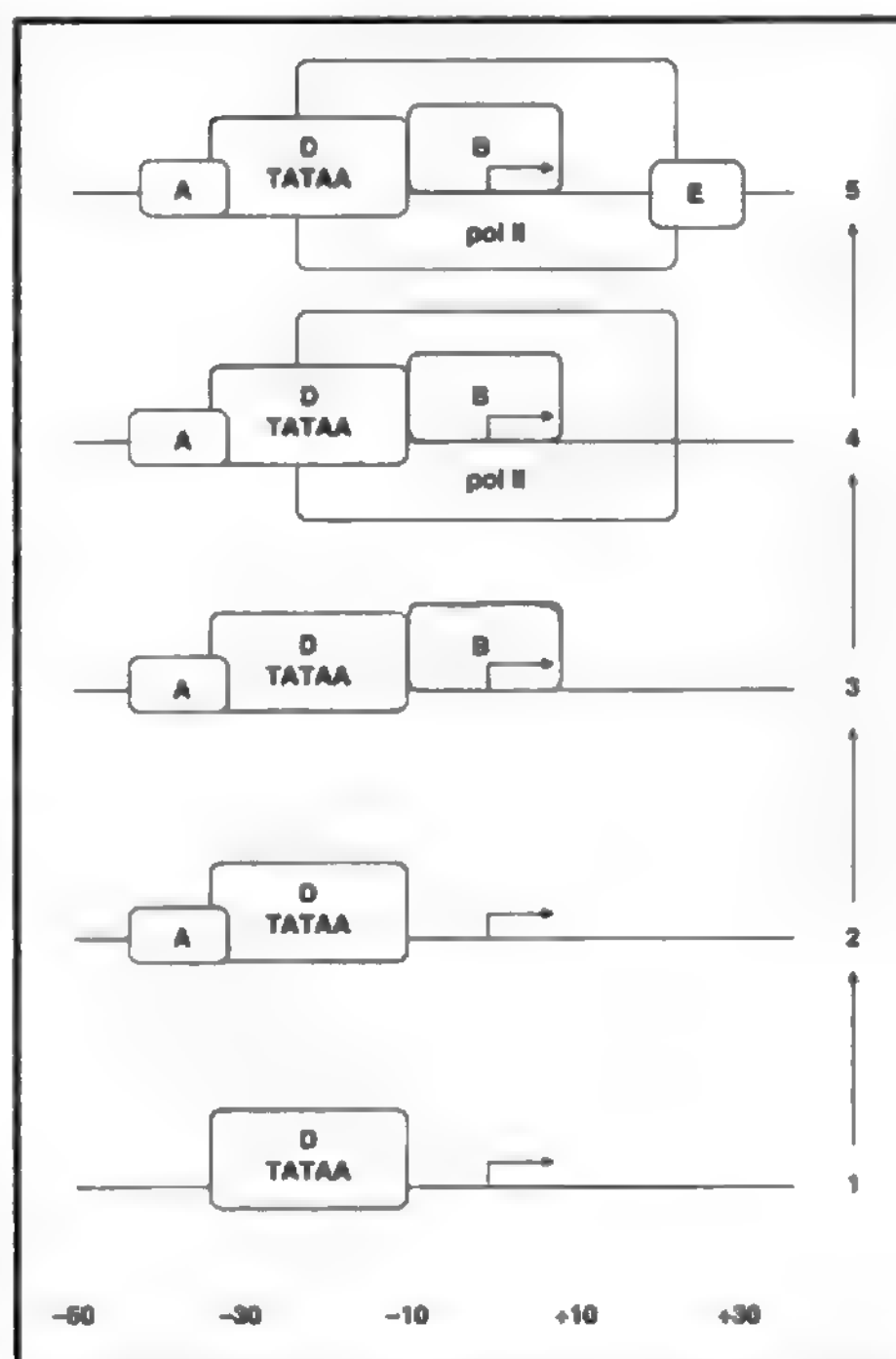


Fig. 9. Interazione tra fattori specifici legati al promotore e il complesso d'inizio. Il complesso d'inizio composto da RNA polimerasi più fattori basali riceve segnali dai fattori specifici legati al promotore. I segnali possono essere di attivazione o d'inibizione. In qualche caso il complesso di fattori è silente. L'attività trascrizionale del gene è il risultato delle varie interazioni. (Da Watson et al., 1994, ridisegnata).

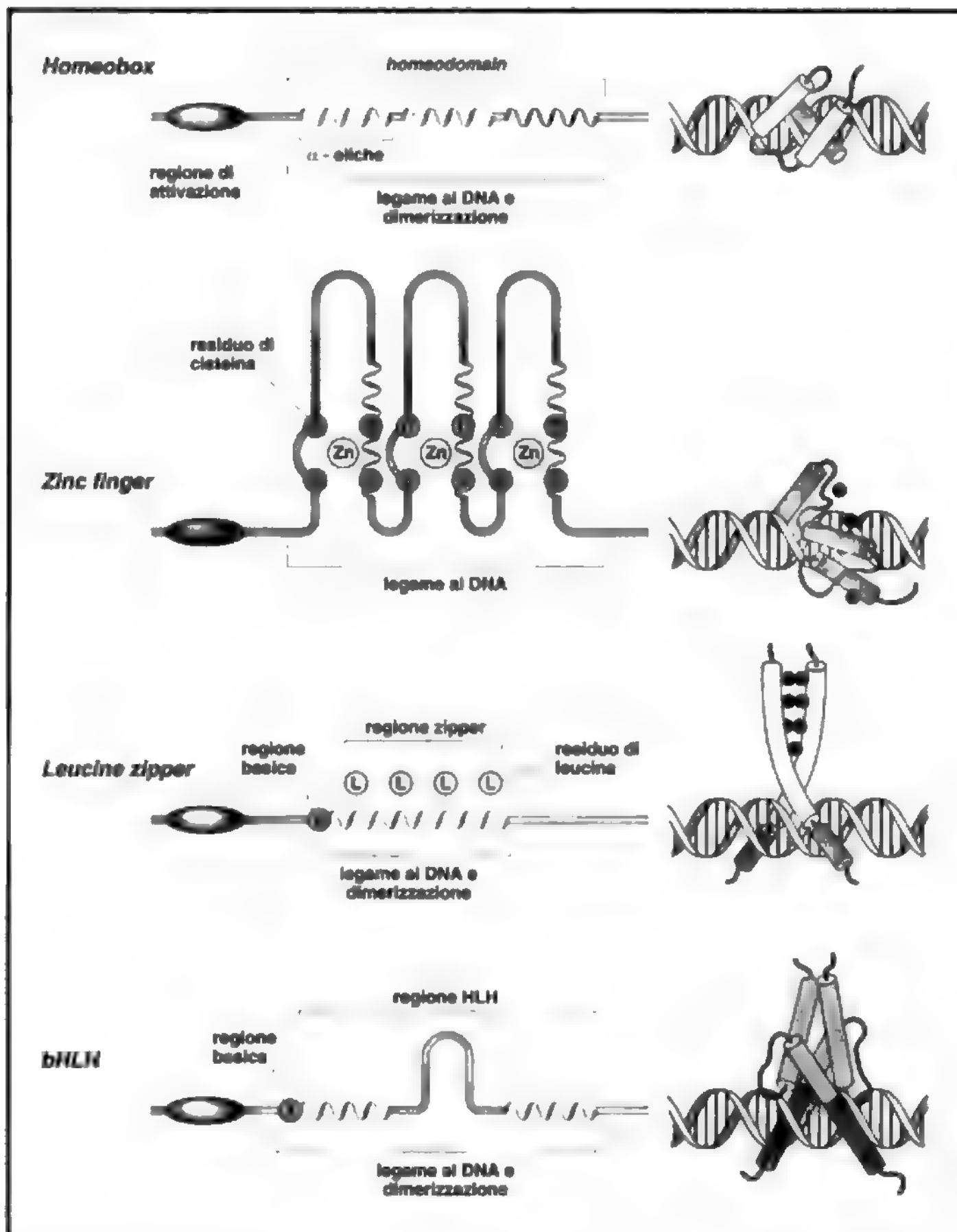


Fig. 10. Principali domini di dimerizzazione e legame al DNA dei fattori trascrizionali. Nella parte sinistra della figura è schematizzata la struttura del dominio mentre nella parte destra è illustrata l'interazione con il DNA. (Da Papavassiliou, 1995, modificata).

tori vennero presto scoperti, mettendo in evidenza aspetti generali e particolarità di questa classe di molecole.

Una delle caratteristiche più rilevanti che accomuna la maggior parte dei fattori di trascrizione è quella di avere una struttura *modulare*: regioni specifiche sono in grado di svolgere la loro funzione indipendentemente dal resto della molecola. Ad es. le due funzioni principali dei fattori di trascrizione, quella di legare il DNA e quella di attivare la trascrizione, possono essere assegnate a delle parti specifiche della molecola. In alcuni casi un modulo isolato, sintetizzato *in vitro*, è ancora in grado di svolgere la sua funzione, ad esempio di legare specifico con il DNA. Questa proprietà ha delle conseguenze molto importanti per la funzione: esistono dei fattori che pur mantenendo la capacità di legare il DNA mancano della funzione di attivazione e possono svolgere un'attività di repressori della trascrizione (v. sotto).

La conservazione della sequenza aminoacidica dei mo-

duli è uno dei criteri attraverso i quali i fattori di trascrizione possono essere raggruppati in famiglie. Ad es. analizzando le sequenze responsabili del legame al DNA sono state evidenziate alcune strutture proteiche ricorrenti (fig. 10).

a) *Zinc finger* (dito di zinco). Questa struttura è stata identificata per la prima volta nel fattore TFIIIA, che è in grado di legare sia il DNA che l'RNA. Le *Zinc finger* prendono il nome dalla presenza di un atomo di zinco nella loro struttura, coordinato a dei residui aminoacidici di due istidine e due cisteine oppure quattro cisteine. Il numero delle dita è variabile: due nei recettori degli ormoni steroidei (v. sotto), tre in Sp1, nove in TFIIIA. La sequenza di un dito di zinco è lunga circa 23 aminoacidi ed è in grado di formare tre tratti di alfa-elica che formano legami con specifiche sequenze di DNA.

b) *Leucine zipper* (cerniera di leucine). Viene abbreviata bZIP e consiste in un tratto di sequenza aminoacidica con

un residuo di leucina ogni sette. Più che un dominio per il legame al DNA, la *leucine zipper* serve per l'interazione proteina-proteina. Infatti parecchi fattori di trascrizione hanno la capacità di formare omo- e eterodimeri con membri della propria famiglia. In seguito alla formazione di un dimer, una regione basica della proteina, adiacente alla *leucine zipper*, è in grado di formare un legame specifico col DNA.

c) *Homeodomain* o *homeobox*. È stato originariamente identificato come una regione di omologia in alcuni geni che regolano lo sviluppo del moscerino *Drosophila* (v. OMEOTICI GENI**). Successivamente è stata dimostrata la sua capacità di legare il DNA in siti specifici ed è ormai chiaro che questa sequenza ha un ruolo importante nella regolazione della trascrizione negli eucarioti. L'*homeobox* è una struttura molto conservata nella scala evolutiva e l'espressione dei geni che la contengono è regolata nei diversi tessuti e nello sviluppo anche dagli stessi fattori *homeobox*. La struttura comprende una regione di circa 60 aminoacidi in grado di formare tre alfa-eliche che interagiscono col DNA. Questo dominio di legame al DNA presenta delle analogie con la struttura *helix turn helix* (HTH) comune nei batteri. Tuttavia da studi di cristallografia è emerso che, nonostante la somiglianza, l'interazione con il DNA è molto diversa. Inoltre mentre il dominio HTH ha bisogno del resto della molecola per legare il DNA, l'*homeodomain* è in grado di funzionare anche isolato dal contesto dove normalmente si trova, anche se con specificità alterata.

d) *Helix loop helix* (elica ansa elica). Abbreviato bHLH è un altro dominio proteico che serve essenzialmente per la formazione di dimeri. Anche in questo caso come per la *leucine zipper* una regione basica adiacente alle eliche è responsabile del legame al DNA. Questa struttura è caratteristica di una famiglia di fattori di trascrizione che regolano il differenziamento muscolare (v. sotto).

Abbiamo visto che oltre a legare il DNA in sequenze specifiche nei promotori, l'altra funzione fondamentale dei fattori di trascrizione è quella di attivare la trascrizione. Anche in questo caso l'attività può essere in genere assegnata ad una porzione specifica della molecola. Tuttavia le strutture in grado di svolgere la funzione si sono rivelate molto eterogenee e non è stato possibile identificare con chiarezza delle sequenze aminoacidiche ricorrenti. Così si parla di *dominio di attivazione acido*, *dominio ricco di prolina* o *ricco di glutammina*, per indicare delle sequenze che hanno funzione di attivazione della trascrizione ma non hanno alcuna somiglianza, eccetto l'abbondanza di particolari aminoacidi. Inoltre recentemente è stato evidenziato che in alcuni casi i residui aminoacidici rilevanti per l'attivazione non sono quelli caratteristici della sequenza (ad es. i residui acidi).

Il meccanismo molecolare attraverso il quale il legame di un fattore proteico al promotore determina l'attivazione della trascrizione non è ancora chiarito. La recente identificazione dei fattori basali ed in particolare dei TAF (v. sopra) ha determinato una svolta nella direzione delle ricerche. È stato dimostrato ad esempio che il fattore Spl interagisce direttamente con la TAF110 che è un componente del TFIID. A questo punto è facile ipotizzare che attraverso interazioni proteina-proteina si possa arrivare ad una modificazione (e attivazione) della RNA polimerasi.

Risposta ai segnali

Per svolgere il loro ruolo di regolatori della trascrizione alcuni fattori specifici devono essere in grado di rispondere ai segnali che costantemente vengono scambiati tra cellula e cellula. Un esempio della comunicazione tra cellule è dato dagli ormoni steroidei. In questa categoria sono com-

presi i corticosteroidi, necessari per il controllo omeostatico dell'organismo, e gli ormoni sessuali. Questi ultimi inducono lo sviluppo e il differenziamento del sistema riproduttivo nell'embrione e controllano la riproduzione, il comportamento riproduttivo e i caratteri sessuali secondari nell'adulto. Lo schema generale della comunicazione ormonale prevede la secrezione dell'ormone e la ricezione del segnale da parte della cellula bersaglio. Elemento necessario per la risposta è l'attivazione trascrizionale di particolari geni mediata da una famiglia di fattori di trascrizione specifici: i *recettori*. Questi fattori sono localizzati nel citoplasma della cellula e nella loro struttura, oltre al dominio di legame al DNA e a quello di attivazione, è stata identificata una regione responsabile del legame con l'ormone. Gli ormoni steroidei, grazie alla loro natura idrofobica, sono in grado di penetrare all'interno della cellula, e una volta nel citoplasma vanno ad interagire con il recettore. Il legame con l'ormone provoca un cambiamento strutturale che induce il complesso ormone-recettore a migrare nel nucleo. Entrato nel nucleo il recettore si lega ai promotori dei geni regolati e attiva la trascrizione (fig. 11).

Intorno alla metà degli anni '80 in seguito al clonaggio dei geni per i recettori dei glicocorticoidi, estrogeni e acido retinoico, nei laboratori di K. R. Yamamoto, R. M. Evans e P. Chambon venne analizzata in dettaglio il rapporto tra struttura molecolare e funzione. I risultati dimostrarono chiaramente la natura modulare di questa classe di fattori di trascrizione e servirono da modello negli studi successivi su altre classi di fattori. Infatti attraverso eleganti esperimenti di mutagenesi sul DNA codificante per i recettori, vennero creati dei *recettori chimera* che avevano il dominio di legame con l'ormone del recettore degli estrogeni e quello del legame al DNA del recettore dei glicocorticoidi.

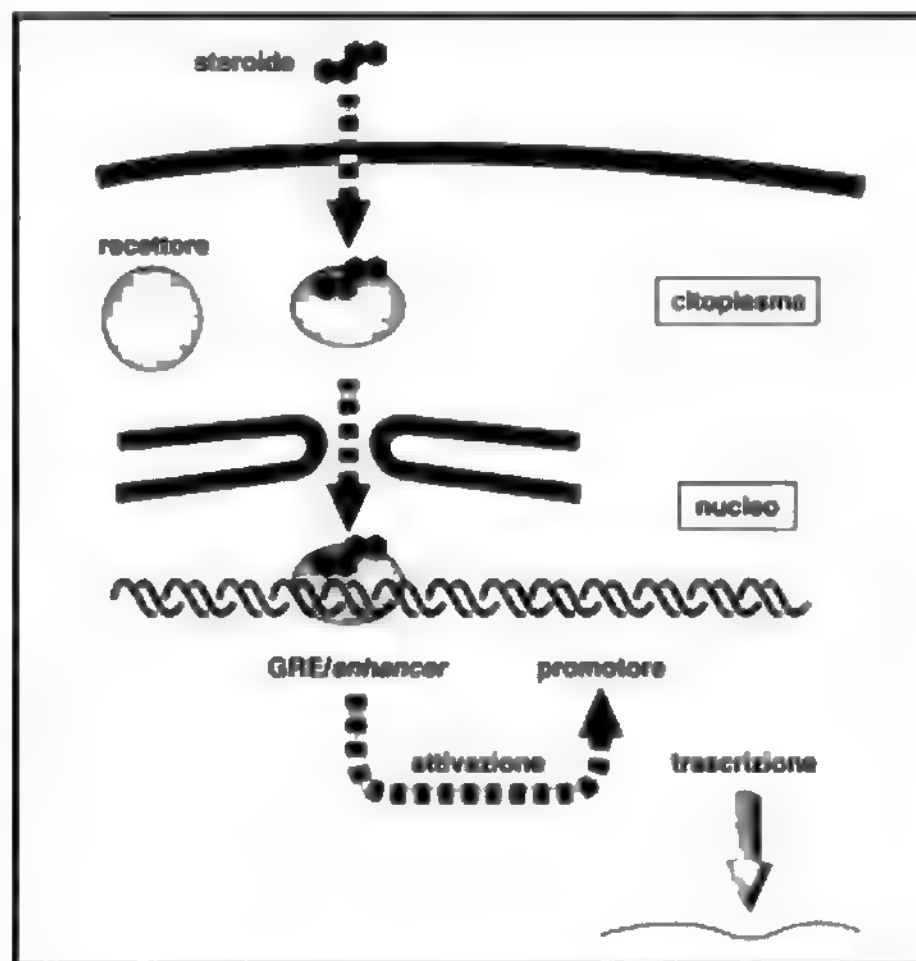


Fig. 11. Schema dell'attivazione trascrizionale di un gene regolato dagli ormoni steroidei. L'ormone entra nel citoplasma e interagisce con il recettore causando un cambiamento conformazionale. Il complesso ormone-recettore entra nel nucleo e a specifici elementi del promotore di un gene (GRE: *Glucocorticoid Responsive Element*). Il legame del complesso attiva la trascrizione del gene. (Da Lewin, 1994, ridisegnata).

Una volta reintrodotti nelle cellule i recettori chimera si comportavano come atteso: venivano indotti dagli estrogeni ma attivavano i geni normalmente regolati dai glucocorticoidi.

Formazione di dimeri

Come accennato nella descrizione dei domini di legame al DNA, un'altra caratteristica comune a diversi fattori di trascrizione è la capacità di formare *dimeri*. Tutti i membri delle famiglie bZIP e bHLH svolgono la loro funzione sotto forma di omo- e/o eterodimeri e grazie a questa caratteristica aumentano le possibilità di specificità e capacità di attivazione. L'associazione avviene sempre tra membri della stessa famiglia ma vi sono delle limitate possibilità d'interazione tra membri di famiglie affini. I fattori di trascrizione Jun e Fos ad es. appartengono allo stesso gruppo di fattori bZIP, e sono normalmente associati per formare il complesso AP1. Questo fattore determina l'attivazione trascrizionale di numerosi geni in risposta a stimoli di crescita cellulare. Mentre Fos può solamente formare eterodimeri con Jun, quest'ultimo è in grado di formare omodimeri e di associarsi al fattore ATF2 che appartiene ad un altro gruppo di proteine bZIP. L'eterodimero Jun-ATF2 ha un'affinità maggiore per il sito di legame CRE (*cAMP response element*) rispetto al sito di AP1 ed è in grado, quindi, di attivare un diverso gruppo di geni. Anche l'omodimero Jun-Jun ha capacità di legame diversa rispetto all'eterodimero. In questo caso la cellula semplicemente variando la produzione relativa delle due proteine è in grado di favorire la formazione di omodimeri o eterodimeri, regolando l'attivazione trascrizionale di diversi geni.

Fattori regolatori principali

L'attività trascrizionale di un gene dipende dalla particolare associazione di elementi nel promotore e negli *enhancer* e anche dal tipo e dalla quantità di fattori di trascrizione presenti nella cellula. In base al tipo di attivazione che determinano i vari fattori è possibile definire una gerarchia: alcuni regolano l'attività solamente di pochi geni, altri di gruppi più o meno numerosi come ad es. i recettori degli ormoni steroidei. Inoltre l'effetto prodotto dall'attivazione di un gene può essere limitato nel tempo o può propagarsi a cascata mediante l'attivazione della trascrizione di altri attivatori. Al vertice della piramide ci sono i *fattori regolatori principali* che sono i grado, da soli, di alterare in maniera irreversibile il destino di una cellula inducendo il differenziamento terminale.

L'esistenza di tali fattori è stata messa in luce dal lavoro di H. Weintraub e collaboratori sul differenziamento muscolare. Infatti nella seconda metà degli anni '80 dimostrarono che fibroblasti (cellule del tessuto connettivo) in coltura potevano essere indotti al differenziamento in mioblasti (cellule del tessuto muscolare) semplicemente attivando un particolare fattore di trascrizione, denominato MyoD. Successivamente altri fattori del differenziamento muscolare, appartenenti come MyoD alla famiglia delle bHLH, sono state identificati: Myf5, MRF4 e Myogenina. Nel processo di differenziamento vengono attivati prima MyoD e Myf5 poi MRF4 e Miogenina e infine, a cascata, tutti i geni responsabili del fenotipo muscolare come actina, miosina, troponina, etc. Inoltre il differenziamento diventa irreversibile grazie ad una regolazione positiva che MyoD e Myf5 esercitano sui propri geni.

L'analisi dei fattori del differenziamento muscolare ha anche messo in luce uno dei meccanismi di funzionamento dei *repressori trascrizionali* (v. sotto). I fattori bHLH sono attivi sotto forma di eterodimeri con proteine ubiquitarie come E12, E47 o 12O1. Uno dei membri di questa famiglia,

la proteina Id, possiede il dominio di dimerizzazione ma manca di quello di attivazione della trascrizione. In alcune circostanze Id si associa alle proteine E formando dei complessi inattivi inibendo così la formazione degli attivatori e la trascrizione dei geni necessari al differenziamento.

Repressori trascrizionali

Il fatto che in ogni cellula solamente una piccola percentuale dei geni è attiva trascrizionalmente ha portato all'ipotesi che la regolazione dell'espressione negli eucarioti sia prevalentemente di tipo positivo (v. sopra). Infatti è ragionevole pensare che per una cellula sia più semplice ed energeticamente più favorevole attivare pochi geni piuttosto che reprimere tutti gli altri. Tuttavia fin dai primi studi sui fattori di trascrizione sono emersi esempi di repressori ed è ormai chiaro che la repressione della trascrizione non è un aspetto marginale della regolazione dell'espressione dei geni.

Da un punto di vista funzionale i repressori possono essere divisi in due categorie.

a) *Repressori passivi*. - In questo gruppo rientrano tutti quei fattori che attraverso meccanismi diversi impediscono l'azione di attivatori trascrizionali. La formazione di eterodimeri inattivi sopradescritta nel caso dei fattori bHLH è un esempio di repressione passiva. Anche tra i membri delle altre famiglie di fattori che formano dimeri ci sono esempi di complessi inattivi a causa dell'incapacità di legare il DNA oppure di attivare la trascrizione. Un aspetto interessante della repressione è che uno stesso fattore può comportarsi da attivatore o inibitore trascrizionale a seconda del contesto cellulare nel quale si trova. Ad es. i fattori AP-1 e il recettore dei glucocorticoidi (GR) sono entrambi degli attivatori di numerosi geni che contengono le rispettive sequenze di riconoscimento. Tuttavia in alcuni casi, come nel gene della proliferina, essi, legandosi contemporaneamente, si influenzano a vicenda negativamente con il risultato di inibire la trascrizione.

b) *Repressori attivi*. - In diversi casi di repressione trascrizionale il meccanismo di azione non può essere ricondotto ad una inibizione dell'attivazione. Infatti fattori come gli homeodomain Even-skipped (Eve) e Engrailed (En) e lo *Zn finger* Kruppel (Kr), sono in grado di inibire la trascrizione basale. Il meccanismo ipotizzato è un'azione sul complesso d'inizio che può essere inibizione della formazione oppure il suo blocco in una configurazione inattiva. In alcuni casi è stato possibile identificare nella molecola il dominio di repressione che però non ha rivelato nessuna sequenza particolare.

Infine recentemente, in maniera del tutto analoga ai coattivatori come le TAF (v. sopra), sono stati identificati dei *corepressori*. I recettori dell'acido retinoico (RAR) e dell'ormone tiroideo (TR) sono fattori di trascrizione che in assenza del ligando funzionano da repressori della trascrizione. L'inibizione dipende dall'interazione di RAR e TR con degli altri fattori che quindi hanno la funzione di mediatori. L'ipotesi, non ancora dimostrata, è che tali corepressori abbiano il ruolo d'interagire con il complesso d'inizio della trascrizione.

Conclusioni

Negli ultimi dieci anni la ricerca sui fattori di trascrizione e la regolazione trascrizionale è stato uno dei settori più attivi della Biologia Molecolare. Alcuni degli elementi che collegano la regolazione dell'espressione dei geni allo sviluppo e al funzionamento di un organismo sono stati identificati. Tuttavia, allo stato attuale della conoscenza, ci sono degli aspetti, come la regolazione negativa della trascrizione da parte dei repressori, le interazioni tra fattori nei

promotori complessi, la trasmissione dei segnali dalla membrana cellulare ai fattori di trascrizione, che ancora non sono del tutto compresi. Ad es. un fattore può essere attivatore o repressore a seconda del tipo cellulare e del promotore col quale interagisce. Inoltre esistono fattori diversi che si legano agli stessi elementi di sequenza o diverse sequenze che legano uno stesso fattore. In ultima analisi il quadro generale di come le interazioni fattori di trascrizione-DNA governino la complessità della regolazione trascrizionale è ancora lontano dall'essere completato.

Bibliografia

Alberts B., Bray D., Lewis J., Ratt M., Roberts K., Watson J. D., *Molecular Biology of Cell*, 1994, 3 ed., Garland, New York.
Lewin B., *Gene V*, 1994, Oxford University Press, New York.
Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J., *Molecular Cloning*, 1982, Cold Spring Harbor, New York.
Papavassiliou A. G., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 (1), 45-47.
Tjian R. et al., *Sci. Am.*, 1995, 272, 54.
Watson J. D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M., *DNA Ricombinante*, 1994, Zanichelli, Bologna.

FABRIZIO LORENI

DNA RICOMBINANTE

SOMMARIO

Cenni storici (col. 2405). - **Clonazione molecolare** (col. 2406): *Enzimi di restrizione*. - *Vettori molecolari*. - *Trasformazione e amplificazione di un clone*. - **Risultati conseguiti dalla tecnologia del DNA ricombinante** (col. 2409). - **Ingegneria genetica: prospettive e sviluppi** (col. 2411).

Cenni storici

Prima di addentrarsi nella discussione delle strategie sperimentali e degli obiettivi che la sperimentazione con il DNA ricombinante si prefigge, è opportuno dare alcuni cenni storici sulle origini e lo sviluppo tecnico e scientifico di questa disciplina, filiazione diretta della biologia molecolare e della genetica classiche. Definizioni alternative di tecnologia del DNA ricombinante sono: clonazione molecolare o ingegneria genetica; queste definizioni sono altrettanto valide, sia da un punto di vista concettuale che operativo, e perciò verranno usate in seguito in maniera intercambiabile. V. anche INGEGNERIA GENETICA* (coll. *3810-3824).

Stabilire con precisione assoluta il momento della nascita dell'ingegneria genetica, non è semplice; essa però può essere fatta risalire agli inizi degli anni '70. Allora infatti vennero compiute alcune scoperte di importanza fondamentale per il successivo sviluppo tecnologico dell'ingegneria genetica. Le prime due avvennero nel 1970 e consistettero, rispettivamente, nella scoperta degli enzimi di restrizione, il cui meccanismo di azione biochimico-molecolare sarà discusso in seguito, e nella scoperta di un enzima in grado di saldare tra loro frammenti di DNA indipendentemente dalla loro origine biologica. Il risultato di tali ricerche rendeva perciò potenzialmente possibile la fusione di DNA isolato da specie biologiche filogeneticamente distanti quali virus, batteri, lievito, mammiferi, piante. Gli autori di queste scoperte: Hamilton Smith, Werner Arber e Daniel Nathans ricevettero qualche anno più tardi il premio Nobel. Una terza fondamentale scoperta fu pubblicata nel 1972: un gruppo di ricerca guidato da Paul Berg, aveva messo a punto un protocollo sperimentale biochimico che permetteva la ricombinazione *in vitro* tra il DNA di un virus di scimmia noto come SV40 (*Simian Vacuolating 40*) ed il DNA del batterio *Escherichia coli*. Anche Paul Berg avrebbe ricevuto qualche anno più tardi, il premio Nobel per le sue ricerche. A quel tempo, la possibilità reale di ricombinare in laboratorio il DNA isolato da un virus di cui erano note le potenzialità di agente tumorale, con il DNA di un batterio che normalmente colonizza l'intestino umano, fece intravedere rischi e pericoli che alla verifica dei fatti si sono rivelati del tutto infondati. Comunque, a quel tempo la stessa comunità scientifica impegnata nella sperimentazione con il DNA ricombi-

nante, si pose dei problemi di ordine etico che furono affrontati in due convegni internazionali. Il termine DNA ricombinante, ovvero «accoppiamento» deliberato di DNA di origine disparata, è entrato oggi nell'uso comune e i timori originari sulle conseguenze potenzialmente disastrose dell'applicazione di queste tecnologie, sono ormai dimenticati.

Clonazione molecolare

Enzimi di restrizione

Gli enzimi appartenenti a questa categoria e usati in ingegneria genetica, sono endonucleasi in grado di riconoscere in maniera assolutamente accurata e precisa, strutture del DNA note come *palindromi*. I palindromi sono dotati di una simmetria diadica e presentano una sequenza identica su entrambi i filamenti della doppia elica. Una tipica struttura palindromica è costituita dalla sequenza

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

che è chiaramente leggibile nella stessa maniera sia sul filamento con direzione 5' → 3' che sul filamento antiparallelo 3' → 5' del DNA. In particolare, questa è la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *EcoRI* che, come tutti gli enzimi di restrizione, rompe il legame 3'-5' fosfodiesterico presente nello scheletro zucchero-fosfato del DNA: l'idrolisi viene operata asimmetricamente, a livello della giunzione tra la G e la A della sequenza palindromica.

Il risultato di questo taglio sfalsato, ripetuto ogni volta che l'endonucleasi trova la sequenza lungo la doppia elica, consiste nella formazione di una popolazione di frammenti di restrizione di dimensione variabile ma dotate in tutti i casi di estremità del tipo

5'-G AATTC-3'
3'-CTTAA G-5'

Tali estremità sono dette coesive in quanto le basi libere possono formare tra loro appaiamento secondo la regola di complementarità di Watson-Crick. Gli enzimi di restrizione sono dunque forbici molecolari che tagliano la doppia elica in maniera precisa ed efficiente. Le estremità coesive sembrano essere un dettaglio trascurabile, esse invece svolgono un ruolo chiave nella tecnologia del DNA ricombinante. Infatti, frammenti di restrizione ottenuti dopo digestione di DNA di qualsivoglia origine, possono ricongiungersi tra loro per formare chimere molecolari in quanto dotate di estremità complementari.

Esistono enzimi di restrizione che tagliano il DNA in maniera simmetrica (non sfalsata) e che non creano, dunque, estremità coesive. Questi trovano uso solo in strategie sperimentali particolari. Gli enzimi di restrizione sono stati sinora isolati solo dai batteri. Ne esistono oltre 200 tipi, disponibili in commercio, che riconoscono una grande varietà di palindromi di estensione e sequenza diverse. Questo rende possibile la creazione di un grandissimo numero di estremità coesive dotate di sequenze diverse: ciò è molto importante per il successivo sviluppo della strategia di clonazione molecolare. Per ragioni di precisione scientifica bisogna infine dire che esistono altri tipi di enzimi di restrizione: però quello qui descritto è l'unico a trovare un impiego in ingegneria genetica.

Vettori molecolari

La finalità ultima di un esperimento di clonazione molecolare consiste nell'ottenere una quantità elevatissima dello stesso frammento di DNA e quindi, sottoporla ad analisi di tipo strutturale e funzionale. Perciò, una volta ottenuti i frammenti di restrizione, bisogna che questi vengano dapprima inseriti in un vettore che provvederà alla loro conservazione e alla successiva propagazione. Esiste un numero elevatissimo di vettori, ciascuno dotato di caratteristiche proprie e quindi da usare a seconda della strategia e della finalità dell'esperimento di clonazione.

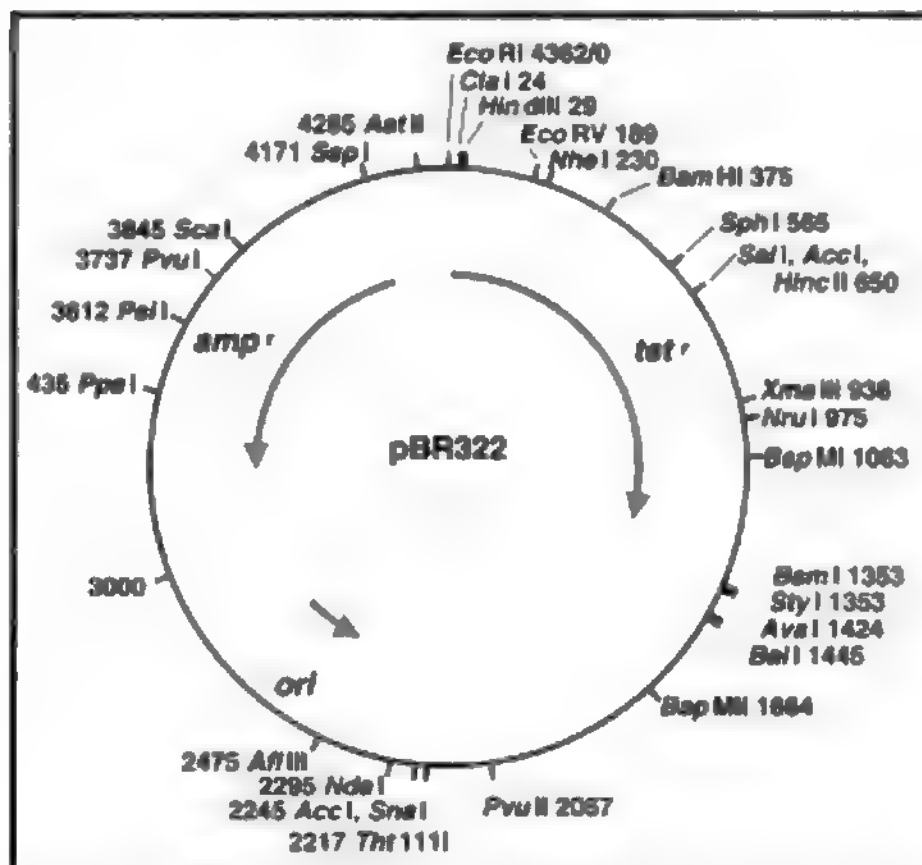


Fig. 12. Mappa di restrizione del plasmide pBR322. Il plasmide ha una dimensione di 4362 coppie di basi. Sono riportati i siti di restrizione solo per alcuni enzimi. Le due frecce divergenti grandi indicano i geni per la resistenza ad ampicillina e tetraciclina. La freccia piccola indica le sequenze di DNA che controllano la replicazione del plasmide stesso. (Da G. Ruvolo, 1994).

Un vettore «classico» è rappresentato dal plasmide pBR322 (fig. 12): capostipite di una serie di plasmidi più sofisticati che trovano usi più specifici. Anche se usato scarsamente tutt'oggi, pBR322 è dotato delle caratteristiche comuni a tutti i vettori. Esso è infatti costituito da una molecola di DNA circolare a doppia elica dotata di un'origine di replicazione autonoma e quindi in grado di replicarsi una volta penetrato all'interno di una cellula di *E. coli*. Inoltre, esso possiede alcuni siti di restrizione unici per più enzimi diversi e due resistenze ad antibiotici: tetraciclina e ampicillina.

Grazie alla presenza di siti unici è possibile digerire il DNA di pBR322 con un enzima di restrizione per ottenere una molecola di DNA lineare dotata di estremità coesive. L'aggiunta dei frammenti ottenuti in precedenza, dotati delle stesse estremità coesive, rende possibile la formazione di ibridi molecolari con il DNA plasmidico linearizzato. Le varie molecole ibride sono quindi saldate *in vitro* tramite l'aggiunta della DNA-ligasi. Questo enzima media la formazione del legame fosfodiesterico lungo lo scheletro della doppia elica e ovviamente, non distingue tra DNA di origine batterica (quale in questo caso, il vettore) e quello dell'inserito che può essere di natura a sua volta batterica ma anche umana, vegetale, virale o di lievito. Non esiste limite apparente alla realizzazione di tali chimere molecolari; inoltre la lunghezza e la sequenza delle basi che formano il sito di riconoscimento di una endonucleasi di restrizione, variano da enzima a enzima, per cui, endonucleasi con siti di riconoscimento più brevi, tagliano il DNA con maggiore frequenza e producono frammenti relativamente più brevi. L'opposto è vero per gli enzimi di restrizione che riconoscono palindromi più lunghi: questo aumenta la flessibilità della tecnica di clonazione.

Il passo successivo alla formazione dell'ibrido tra DNA vettore e DNA esogeno consiste nell'amplificazione delle sequenze inserite nel vettore stesso.

Sotto l'aspetto puramente tecnico esiste un limite superiore alla quantità di DNA inseribile (ricombinabile) con un vettore plasmidico. In generale un plasmide può assumere frammenti DNA di dimensioni pari alla sua o di poco superiori. Perciò se si vogliono ottenere cloni contenenti inserti di grandi dimensioni bisogna ricorrere a vettori di altro tipo. Inoltre, come accennato in precedenza, con il progredire delle strategie di clonazione molecolare, sono stati costruiti vettori che trovano un impiego specialistico: quali quelli usati per studiare l'espressione genica (noti come *vettori di espressione*) o altri impiegati per fare la sequenza del DNA. La tab. I riporta un elenco semplificato dei vettori e la strategia di clonazione in cui essi vengono usati.

Trasformazione e amplificazione di un clone

Tutti i vettori sono legati in qualche modo al processo di replicazione del DNA. Dunque una volta inseriti in ambiente cellulare adatto, questi saranno in grado di replicarsi e contemporaneamente replicheranno le sequenze di DNA esogeno in essi introdotti. Esistono parecchie strategie sperimentali per introdurre molecole di DNA-ricombinante all'interno di batteri che ne consentono la replicazione: le più comuni sono la trasformazione in presenza di CaCl_2 e la elettroporazione.

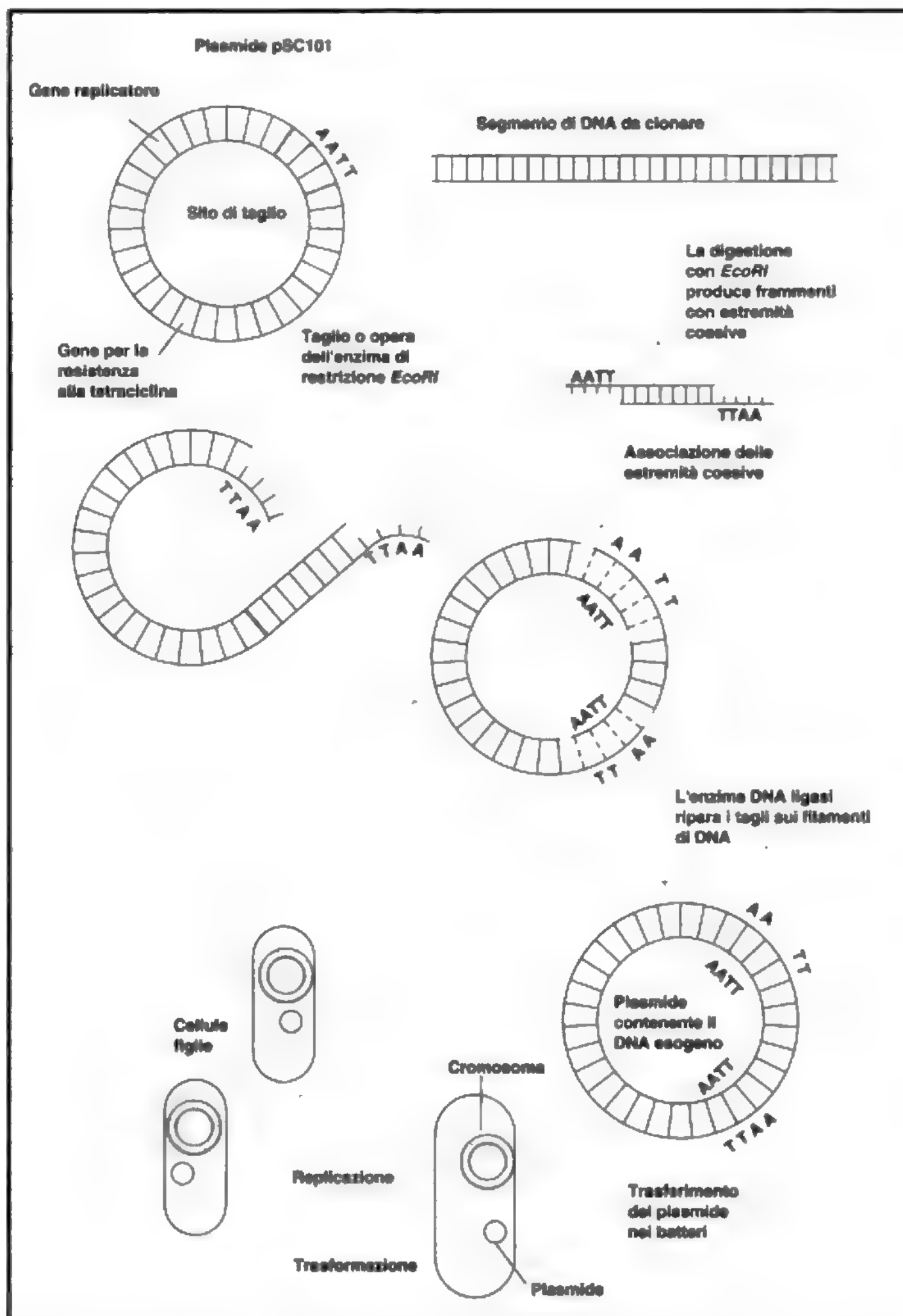
La prima consiste nel trattare batteri sensibili agli antibiotici con CaCl_2 ; questo sale provoca una alterazione strutturale della parete cellulare che diviene permeabile e dunque consente l'ingresso di macromolecole esogene; la seconda consiste nel sottoporre le cellule batteriche a brevi impulsi elettrici che anche in questo caso risultano in una maggiore permeabilità della parete.

Per facilitare l'identificazione dei batteri che hanno assunto chimere ricombinanti si ricorre, infine, alla selezione su terreno contenente antibiotici. I batteri trasformati, cioè quelli che hanno assunto DNA-ricombinante, avranno acquisito resistenza agli antibiotici che è stata loro conferita grazie all'assunzione dei plasmidi ricombinanti (v. PLASMIDI*). La crescita su terreno selettivo indica soltanto che il batterio, originariamente sensibile, ha assunto un plasmide che con buona probabilità si è ricombinato con DNA esogeno. Bisogna poi procedere a tecniche di analisi più raffinate, quali ad esempio ibridazioni con sonde molecolari (v.*) marcate radioattivamente (*Southern blot* e *Northern blot*; v. BLOTTING*) o isolamento dei plasmidi dai batteri trasformati e loro analisi con enzimi di restrizione. Solo questo tipo di analisi dimostra che la popolazione batterica resistente all'antibiotico ha effettivamente assunto un plasmide ricombinante. La fig. 13 illustra in maniera grafica la sequenze di eventi discussi sinora. V. anche: CLONE E CLONAZIONE*.

TAB. I. VETTORI DI USO PIÙ COMUNE IN INGEGNERIA GENETICA

	Plasmidi	Fago λ	Cosmidi	Fago M13 e suoi derivati
Clonazione frammenti di grandi dimensioni	±	+	++	-
Genoteche	-	+	++	-
Vettori di espressione	+	-	-	-
Sequenze di DNA	+	-	.	+
Mutagenesi sito-specifica	±	-	-	++

Fig. 13. Schematizzazione di un esperimento di clonazione molecolare. (Da G. Risuleo, 1994).



Il protocollo sperimentale appena descritto, rappresenta un metodo molto generale, ancorché classico, per la clonazione di un frammento qualsivoglia di DNA. Esistono protocolli assai più sofisticati che permettono la clonazione di un determinato gene, di un suo frammento o addirittura la sua mutagenizzazione in siti specifici. Tali tecniche sono di natura estremamente specialistica per cui si consiglia la consultazione di uno dei testi riportati nella bibliografia.

Risultati conseguiti dalla tecnologia del DNA ricombinante
È pressoché impossibile condensare in poche righe, gli enormi risultati conseguiti grazie al DNA ricombinante nel

volgere di un paio di decenni. L'ingegneria genetica (v.*) ha infatti causato una vera e propria esplosione della ricerca sull'organizzazione del genoma, sia procariotico che eucariotico, nonché sulla struttura ed espressione del gene. I risultati di maggiore rilevanza si sono forse avuti negli eucarioti dove, in particolare, la tecnologia del DNA ricombinante ha contribuito in modo determinante a chiarire il paradosso del valore G; cioè l'eccesso di DNA genomico rispetto alla quantità effettivamente espressa e tradotta in proteina. Dunque concetti come: gene interrotto, *splicing*, ribozima, pseudogene, per citarne alcuni, sono stati sviluppati grazie alla tecnologia del DNA ricombinante.

Dal punto di vista della *ricerca di base*, si sono ottenuti risultati di valore enorme per lo studio dell'espressione genica (v. GENETICA** [coll. **2381; **2387]). L'evoluzione di tecniche di mutagenesi sito-specifica, ha creato un concetto del tutto nuovo e rivoluzionario: quello di *genetica inversa*. Infatti a differenza della mutagenesi classica, in cui l'agente mutageno esercitava un'azione pressoché casuale lungo tutto il genoma, le tecniche di manipolazione genetica permettono di modificare un gene clonato in un sito qualsivoglia a scelta dallo sperimentatore. La messa a punto di tecniche, quali il saggio CAT (*Chloramphenicol Trans Acetylase*), in combinazione con la mutagenesi sito-specifica, ha permesso di studiare le sequenze ad azione *cis*-agente localizzate alle estremità di un gene. Risultati assai rilevanti sono stati ottenuti anche per quanto riguarda il controllo dell'espressione genica ad opera di fattori proteici *trans*-agenti. Infatti, lo sviluppo di strategie come il ritardo elettroforetico (*gel retardation assay*) o il *foot-printing* hanno permesso di individuare i siti di legame tra proteina e DNA e quindi di valutare l'eventuale valore regolativo del legame stesso.

Inoltre, la clonazione del gene ha permesso di chiarire la sequenza delle proteine che si legano al DNA e dunque di dedurre la struttura tramite tecniche di analisi informatica. Esistono infatti programmi sofisticati che permettono la ricostruzione tridimensionale di proteine la cui struttura primaria, in virtù della non ambiguità del codice genetico, è stata dedotta dalla sequenza genica che la codifica. Tali studi combinati di interazione DNA/proteine e analisi informatica hanno rivelato l'importanza di strutture proteiche, quali le dita di zinco (*zinc fingers*; v. EMBRIOLOGIA*, *2525 [fig. 1]) o le cerniere di leucina (*leucine zippers*); v. anche sopra: col. **2400.

Dal punto di vista della *ricerca applicata*, l'ingegneria genetica ha avuto una enorme importanza nella ricerca clinico/medica e nello sviluppo delle biotecnologie soprattutto in campo agrozootecnico. La tecnologia del DNA ricombinante trovò una importantissima applicazione già negli anni Settanta con la produzione per via biotecnologica di insulina e somatostatina. Oggi esistono vaccini contro malattie umane e di importanza zootecnica, prodotti grazie al DNA ricombinante. Un ulteriore risultato consiste nella possibilità di creare animali o piante transgeniche: cioè organismi in cui viene espresso un gene esogeno (v. TRANSGENICI ANIMALI*). Tale tipo di esperimenti ha permesso alcuni anni orsono, la creazione di topi giganti in cui veniva espresso l'ormone somatotropo di ratto.

Nel campo dell'ingegneria genetica delle piante sono infine in corso massicci studi volti a migliorare il valore alimentare delle proteine vegetali e la resistenza delle piante al gelo o ai parassiti. L'ingegneria genetica delle piante è un campo dalle enormi potenzialità; ad es. esistono piante transgeniche che esprimono immunoglobuline umane (cfr. tab. II per una lista semplificata di geni espressi in piante); questo apre l'affascinante prospettiva di produrre vaccini in maniera semplice ed economica.

Ingegneria genetica: prospettive e sviluppi

A dispetto dei timori iniziali, il DNA ricombinante si sta trasformando in una risorsa sicura e quasi inesauribile. Dall'ingegneria genetica (v.*) infatti sono arrivate alcune tecnologie altamente innovative che rivestono un valore rilevante in agri-zootecnica, nella clinica e terapia biomedica e perfino in campo legale. I polimorfismi di restrizione (RFLP, ovvero *Restriction Fragment Length Polymorphisms* [v. POLIMORFISMI GENETICI*]) permettono infatti la diagnosi di malattie genetiche e la determinazione della paternità di un individuo, ma permettono anche di verificare se un campione di tessuto, per esempio di sangue, appartiene a una persona.

TAB. II. ALCUNI GENI ESPRESSI IN PIANTE TRANSGENICHE ATTRAVERSO TECNICHE DI MANIPOLAZIONE GENETICA

(Compilata con l'aiuto della Professoressa L. Spanò, Università de l'Aquila)

Gene	Effetto
Pectina esterasi	Maturazione dei frutti
Poligalatturonidasi	
Nitrato riduttasi	Assimilazione del nitrato
ADP-glucosilpiro-fosforilasi	Contenuto in amido
Glicerolo-3-fosfato aciltrasferasi	Protezione dagli stress da freddo
Nitrilasi	Resistenza a erbicidi
Fosfinoxinacetiltrasferasi	
CRY (da <i>B. thuringiensis</i>)	Resistenza agli insetti
Luciferasi (da lucciola)	Pianta luminescente

L'analisi dei RFLP viene sempre più spesso effettuata in associazione con la tecnica dell'amplificazione del DNA: tale tecnica è nota come reazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*; v. PCR*, PCR**). Essa si basa su una sintesi ciclica del DNA che permette di ottenere oltre un miliardo di copie della stessa sequenza dopo appena 32 cicli di sintesi (v. PCR*, fig. 1; SONDE MOLECOLARI*, fig. 15). L'accoppiamento di PCR e RFLP è noto nell'accezione comune di *test del DNA*. Una spettacolare applicazione della PCR ha permesso alcuni anni orsono, la clonazione di DNA isolato da una mummia e da reperti tassidermici di animali estinti.

Per quanto riguarda la potenzialità dell'ingegneria genetica in terapia umana, sono state introdotte alcune tecniche assai interessanti. Una è nota come terapia genica (v.*; v.***) e consiste nella sostituzione di un gene difettoso con la sua copia «sana». La terapia genica è limitata, per motivi di carattere etico, alla correzione di difetti genetici solo nelle linee cellulari somatiche; quindi la correzione non ha conseguenze ereditarie. Interventi di terapia genica somatica sono stati già eseguiti con successo nella cura di alcuni tipi di IMMUNODEFICIENZE (v.*; v.**), ad es. la SCID.

Un altro tipo di possibile intervento terapeutico è noto come terapia antisense (v. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDI**). Questa consiste nel far penetrare all'interno della cellula, un oligonucleotide sintetico, cioè un breve frammento di DNA o di RNA sintetico, in grado di formare appaiamento Watson-Crick con le sequenze di controllo dell'espressione genica. Il risultato di questa interazione determina l'inattivazione del gene stesso. Sono dunque ovvie le potenzialità di tale approccio alla cura di malattie di origine virale. In particolare, la terapia antisense è considerata molto promettente per la cura di patologie a carattere tumorale.

Con lo sviluppo di alcune tecnologie innovative che fondono la ricombinazione genica classica con tecniche di ingegneria genetica, è possibile inattivare selettivamente geni specifici secondo un protocollo sperimentale noto come «gene targeting» (bersagliamento genico). La realizzazione di tali tecniche ha permesso di identificare geni implicati in fenomeni estremamente complessi quali il differenziamento, lo sviluppo, l'invecchiamento e la morte cellulare programmata (apoptosi [v.**]).

Bibliografia

Boncinelli E., Simeone A., *Ingegneria Genetica*, 1991, Idelson, Napoli.

- Cacchione S., Franzini C., Risuleo G., *Molecular Targets in Oncology*, 1995, Signum Edizioni, Milano.
 Glick B. R., Pasternak J. J., *Molecular Biotechnology*, 1994, ASM Press, Washington.
 Risuleo G., *Ingegneria Genetica: nuova frontiera della biologia*, 1994, Casa Editrice Scientifica Internazionale, Roma.
 Rubenstein J. L., *Gene Cloning*, in Leder P., Clayton D. A., Rubenstein E. eds., *Molecular Medicine*, 1994, Scientific American, New York, pp. 103-132.
 Strachan T., Read A. P., *Genetica umana molecolare*, 1997, UTET, Torino.
 Tooze J., *The DNA story*, 1981, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 Watson J. D., Gilman M., Witkowski J., Zollar M., *DNA Ricombinante*, 1994, Zanichelli, Bologna.
 Wolff J. A., *Gene Therapeutics*, 1994, Birkhäuser, Boston.

GIANFRANCO RISULEO

DNA FINGERPRINTING

SOMMARIO

DEFINIZIONE E INTRODUZIONE	col. 2413
NUOVE TECNICHE DI DNA FINGERPRINTING	col. 2414
Premessa (col. 2414). - AP-PCR ; RAPD ; DAF (col. 2415). - AFLP (col. 2416). - FERP (col. 2417). - Dideossifingerprinting (col. 2418).	
APPLICAZIONI DEL DNA FINGERPRINTING E DI TECNICHE AFFINI	col. 2419
Medicina forense (col. 2419): <i>Nuovi progressi</i> . - <i>Le critiche sull'attendibilità dei risultati</i> . - <i>Problemi relativi alla interpretazione dei risultati</i> . - <i>Discordanze</i> . - Microbiologia medica (col. 2425): <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . - <i>Helicobacter pylori</i> . - <i>Streptococcus pyogenes</i> . - <i>Enterobacter aerogenes</i> . - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . - <i>Altri patogeni</i> . - Tumori (col. 2427): <i>Carcinoma multiplo epatocellulare</i> . - <i>Carcinoma della mammella</i> . - <i>Carcinomi colorettali</i> . - <i>PTLPD</i> . - <i>Variazione dello xeroderma pigmentoso (XPV)</i> . - <i>Effetti del 17β-estradiolo sul genoma di cellule tumorali</i> . - <i>Mappatura del genoma umano: allineamento del contig</i> (col. 2429). - <i>Trapianti</i> (col. 2430). - <i>Espressione genica</i> (col. 2431). - <i>Diversità genetica</i> (col. 2432). - <i>Altre applicazioni</i> (col. 2432).	

DEFINIZIONE E INTRODUZIONE

Come si è visto nelle voci IDENTIFICAZIONE*, IDENTIFICAZIONE mediante impronte genetiche (Agg. I, coll. *3580-3585), INGEGNERIA GENETICA* (Agg. I, coll. *3819-3821) e PATERNITÀ, RICERCA DELLA* (Agg. I, coll. *5717-5740), per DNA fingerprint (o impronta «digitale») di un DNA, si intende un fenotipo (pattern o quadro) elettroforetico abbastanza complesso (tutte le tecniche di DNA fingerprinting hanno lo scopo di ottenere una serie di numerosi frammenti da un singolo campione di DNA) ed «unico» da giustificare l'ipotesi (se non addirittura la certezza) che esso indichi l'origine di quel DNA con una specificità paragonabile, appunto, a quella delle impronte digitali. Per il suo aspetto un DNA fingerprint è paragonabile ad un codice a barre. DNA fingerprinting è qualsiasi tecnica diretta ad ottenere un DNA fingerprint.

Le proprietà fondamentali di un DNA fingerprint sono cioè la complessità e la altissima variabilità (per esempio tra individui, cloni di cellule o di batteri, etc.); la complessità è la condizione necessaria, ma non necessariamente sufficiente, alla esistenza della forte variabilità e quindi alla «unicità», che è la proprietà qualificante di un fingerprint. Le basi metodologiche e concettuali del primo DNA fingerprinting, cioè di quello proposto da Jeffreys *et al.* nella seconda metà degli anni '80, sono illustrate nelle voci citate sopra, ma gli sviluppi di questa tecnica in questi ultimi anni sono stati così cospicui da rendere necessario un riesame radicale dell'intero argomento: da un tipo di ricerche limitate solo al DNA ed alla genetica umana, anzi quasi solo alle sue applicazioni nella medicina forense (identificazione ed accertamento della paternità), si è sviluppato in pochissimi anni un insieme di approcci tecnici che hanno esteso il campo di indagine del

DNA fingerprinting anche all'RNA e ad aree completamente nuove e diversissime fra loro, come l'epidemiologia molecolare, i tumori, i trapianti, la differenziazione, l'ecologia, l'evoluzione, la tassonomia, etc.

Prima di passare in rassegna i progressi principali dei DNA fingerprinting e delle loro applicazioni conviene accennare brevemente ai principi su cui si basano le nuove tecniche — che in un modo o nell'altro sfruttano quasi tutte la Polymerase Chain Reaction (PCR [v.*; v.**]) — atte a generare pattern (quadri) elettroforetici abbastanza complessi da poter essere considerati fingerprint del DNA preso in esame. Conviene comunque mettere in chiaro che anche i DNA fingerprint ottenuti con queste nuove tecniche costituiscono fenotipi, non genotipi, perché non si hanno informazioni sui loci e sugli alleli che sono alla base di questi pattern complessi.

Si suddividerà il testo in due parti: la prima presenterà le nuove tecniche; nella seconda saranno illustrati in modo sistematico i vari nuovi campi di applicazione del DNA fingerprinting.

NUOVE TECNICHE DI DNA FINGERPRINTING

(AP-PCR [Arbitrary Primed PCR], RAPD [Random Amplified Polymorphic DNA], DAF [DNA Amplified Fingerprinting], AFLP; vanno considerate a parte: FERP; dideossifingerprinting).

Premessa

Due buone rassegne su questi metodi e sui loro campi di applicazione si trovano in un articolo di Welsh *et al.* del 1995 (*Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis*) ed in un altro articolo dello stesso gruppo dove sono trattati alcuni importanti aspetti tecnici (*Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: Application in cancer research*) di Perucho *et al.* (1995).

In linea di principio queste tecniche sono molto simili fra loro perché consistono tutte in una amplificazione selettiva di sequenze genomiche aventi in comune la proprietà di essere fiancheggiate da due sequenze (non troppo distanti fra loro) complementari a due primer (una su un'elica e l'altra antiparallela, cioè in senso opposto e sull'altra elica) scelte in modo arbitrario. (Il termine primer può venir tradotto con «innesco»).

Si genera un frammento (cioè una banda del DNA fingerprint) tutte le volte che i due primer trovano due sequenze complementari sufficientemente vicine e nell'orientamento corretto per cui viene amplificata la regione interposta tra di esse indipendentemente dalla sua sequenza.

Conviene a questo punto confrontare i DNA fingerprint di Jeffreys con quelli ottenibili con questi nuovi metodi: essi differiscono, non solo dal punto di vista tecnico, ma anche per il loro significato biologico.

Nel metodo originario di Jeffreys (v. PATERNITÀ, RICERCA DELLA* [coll. *5725-5739]) il gran numero di bande, cioè la complessità del quadro elettroforetico, riflette il gran numero di regioni del genoma (analizzate simultaneamente, cioè con una sola analisi [multilocus fingerprinting]) in cui si trovano «variazioni sul tema» di un certo core, da ognuna delle quali si genera un frammento di DNA, mentre la variabilità individuale, cioè la proprietà che rende il pattern non solo complesso ma anche molto variabile da un individuo all'altro (cioè un DNA fingerprint [se fosse complesso, ma uniforme tra i vari individui, a tutto sarebbe paragonabile meno che ad un fingerprint]) è dovuta al fatto che in ciascuna di quelle regioni la variante locale è costituita da un numero di ripetizioni del core che varia da un genoma all'altro. (Variable Number of Tandem Repeats o VNTR):

ognuno degli alleli di quel particolare *locus* variabile corrisponde appunto al numero di ripetizioni di cui è costituito.

La forte variabilità allelica praticamente di tutte queste regioni (quasi) raddoppia il numero di bande che costituiscono il *fingerprint* di ogni individuo rispetto a quello che si avrebbe se per ognuna di esse l'individuo fosse omozigote invece che eterozigote.

È evidente allora che le sequenze delle bande di un DNA *fingerprint* di questo genere sono tutte molto simili nella loro parte centrale (le parti centrali differiscono da un frammento all'altro solo per il numero di volte con cui un certo motivo comune è ripetuto) e molto diverse fra loro per le sequenze fiancheggianti.

AP-PCR; RAPD; DAF

I vari frammenti di un DNA *fingerprint* ottenuto mediante un «primer arbitrario» (AP-PCR, RAPD e DAF *fingerprinting*), al contrario del metodo originario di Jeffrey, hanno in comune proprio le sequenze fiancheggianti che, essendo complementari una ad uno dei due primer arbitrari e l'altra all'altro, hanno permesso la amplificazione della sequenza interposta tra di essi, qualunque essa sia: in questi *fingerprint* risultano amplificate sequenze che per caso sono fiancheggiate da sequenze complementari ai due probe (sonde molecolari [v.*; v.**]). Ed è proprio il fatto di non richiedere, a differenza dei *fingerprint* dei VNTR, una grande ripetitività di determinate sequenze estese (= elevata ridondanza) che rende questi *fingerprint* gli unici ottenibili su organismi semplici, come i batteri o addirittura i virus, i cui genomi non hanno gradi di ridondanza elevati.

Uno dei grandi vantaggi delle tecniche di questo tipo è che non richiedono alcuna conoscenza preliminare né delle sequenze che risulteranno amplificate né di quelle che le fiancheggiano e per merito delle quali se ne ottiene l'amplificazione. Uno svantaggio considerevole è invece la forte dipendenza del DNA *fingerprint* dal protocollo di amplificazione che si è adottato (concentrazione del DNA template, del primer, del cloruro di magnesio e della Taq polimerasi (v. PCR**), temperatura di annealing, numero di cicli termici, tipo di Taq polimerasi e di apparecchio per la PCR) che ne rende molto problematica la riproducibilità soprattutto tra laboratori diversi.

Tanto la AP-PCR, che la RAPD e la DAF utilizzano un primer arbitrario e due fasi ben distinte di amplificazione. La prima, a bassa stringenza, consiste di due soli cicli di lunga durata (vari minuti) e con bassa temperatura di annealing (45 °C); la seconda è costituita invece da varie decine di cicli di amplificazione per cui è questa la fase che porta alla amplificazione vera e propria.

Gli elementi differenziali tra le tre tecniche riguardano la lunghezza dei primer arbitrari (20 basi nell'AP-PCR, 10-12 nella RAPD e 5 nella DAF) e la seconda fase della amplificazione (temperatura, durata dei singoli cicli e loro numero). Queste tre tecniche differiscono inoltre anche per i procedimenti messi in atto per evidenziare i frammenti amplificati e le loro dimensioni (fino a 500 b.p. [paia di basi] nell'AP-PCR e nella DAF e da 300 a 4000 nella RAPD) (cfr. «Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting» di Meunier e Grimont, 1993).

Le difficoltà relative all'allineamento di RAPD-DNA *fingerprint* ottenuti su un gran numero di ceppi batterici isolati ed esaminati su gel diversi ed in tempi molto diversi si sono dimostrate in larga misura risolvibili analizzando questi pattern con un metodo automatizzato (ALFA: Automated Laser Fluorescence Analysis) in grado di generare una cluster analysis computerizzata. In uno studio condotto su *Acinetobacter baumannii* confrontando tre pattern

(di cui due ottenuti su *A. baumannii* isolati da secrezioni tracheali di due neonati con infezioni polmonari ricoverati contemporaneamente nella stessa corsia ed il terzo dalle mani della infermiera che li accudiva) con altri pattern di altra origine, i tre pattern sono risultati quasi identici fra loro, cioè tutti nello stesso cluster, che era invece molto distante dai cluster costituiti da sottoinsiemi di *A. baumannii* di altra provenienza. Questi risultati concordavano con quelli ottenuti sugli stessi materiali esaminati sottoponendo però i prodotti della RAPD alla PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) che però è un procedimento estremamente più lungo (circa 90 ore invece che meno di 8 ore), laborioso e costoso. Sembra quindi che la combinazione di tre elementi (la RAPD, l'ALFA ed un procedimento avanzato di analisi dei dati) in luogo della sola RAPD, possa costituire una soluzione soddisfacente ai problemi relativi all'origine uni- o poli-focale di determinate infezioni ospedaliere, verificatesi per esempio in unità di terapia intensiva (Grundman *et al.*, 1995). La stessa tecnica è stata utilizzata con successo dallo stesso gruppo per studiare la trasmissione di *Pseudomonas aeruginosa*.

AFLP

Il DNA da analizzare è prima digerito con due enzimi di restrizione (che chiameremo R_{enzA} ed R_{enzB}); poi alcuni dei frammenti le cui due estremità terminano una con il sito per l' R_{enzA} e l'altra con il sito per l' R_{enzB} sono selettivamente legati a due oligonucleotidi (a doppia elica ma con estremità a baionetta cioè a singola elica) che funzioneranno tanto da adattatori che da primer nella fase successiva; si procede poi alla amplificazione per PCR dei frammenti le cui due estremità si sono entrambe legate al primer; infine si effettua l'analisi elettroforetica della miscela dei frammenti amplificati.

È una tecnica che combina le attendibilità e riproducibilità della digestione con enzimi di restrizione alla efficienza di amplificazione della PCR e che può essere utilizzata, per studiare DNA di qualsiasi origine e complessità, compresi i cDNA (cioè l'espressione, oltre che la struttura, dei geni) di cui inoltre non è necessario conoscere preventivamente la sequenza.

Come si è appena detto, la serie di bande degli AFLP-DNA *fingerprint* è costituita da un sottoinsieme dei frammenti di restrizione che si ottengono digerendo il DNA in esame con i due enzimi di restrizione R_{enzA} e R_{enzB} . È un sottoinsieme in quanto con questo procedimento si realizza l'amplificazione di solo alcuni dei frammenti di restrizione ottenuti con la doppia digestione (quindi un acronimo adatto a questa tecnica sarebbe: ASRF per «Amplification of Selected Restriction Fragments» invece di quello usato dagli AA. dato che — come essi stessi precisano nelle conclusioni del loro lavoro [Vos *et al.*, 1995] — AFLP «should not be used» come acronimo di questo metodo).

L'amplificazione è resa selettiva mediante l'uso di due primer ciascuno costituito da 3 regioni. Quella centrale, nel primo primer è una sequenza complementare al sito di restrizione dell' R_{enzA} e nel secondo primer è una sequenza complementare al sito di restrizione dell' R_{enzB} ; in entrambi i primer la sequenza in 3' rispetto a quella centrale è la sequenza adattatore (di 1-3 basi); infine la sequenza situata dal lato opposto (cioè 5') rispetto all'adattatore è in entrambi i primer la sequenza core la cui lunghezza viene decisa in modo da far sì che l'oligonucleotide sia costituito da un numero di b.p. (paia di basi) sufficiente in totale ad assicurare l'amplificazione con la PCR, cioè abbia una lunghezza totale di circa 20 b.p. I due primer, oltre che per la sequenza centrale, in genere differiscono fra loro anche per la lunghezza e la sequenza delle due regioni, adattatore e

core, che la fiancheggiano. Quindi sono resi amplificabili solo quelli (dell'insieme dei frammenti delimitati dai siti di restrizione A e B) in cui questi due siti sono adiacenti alla sequenza adattatore corrispondente: l'estremità tagliata dall' R_{enzA} deve continuare con una sequenza di 1-3 basi complementare al suo adattatore e lo stesso deve accadere per l'estremità tagliata dall' R_{enzB} .

Era prevedibile a priori, ed è stato effettivamente constatato, che il numero di bande del *pattern* ottenuto amplificando con *primer* privi di adattatore (che avrebbero cioè innescato la PCR solo grazie alla loro complementarità al sito di restrizione corrispondente) si riduce all'incirca di un fattore 4 per ogni base inserita nell'adattatore e che le bande «residue» sono un sottoinsieme di quelle che costituiscono i *pattern* ottenuti con adattatori più corti. Quindi la lunghezza degli adattatori deve essere decisa sulla base della complessità del genoma in esame: tanto più grande questa complessità tanto maggiore il fattore di riduzione richiesto per ridurla entro limiti accettabili e quindi la lunghezza totale dei due adattatori e, dato che ogni adattatore deve essere costituito da non più di 3 basi (oltre questo numero la selettività dell'amplificazione va perduta), il massimo fattore di riduzione del numero di bande che si può ottenere è circa 4^6 (che è il prodotto di 4^3 [fattore di riduzione dovuto all'adattatore del primo *primer*] per 4^3 [dovuto al secondo *primer*]), cioè circa 4000.

Per genomi molto lunghi (uomo, varie piante superiori, etc.) è necessario usare adattatori di 3 basi. In questi casi si possono verificare amplificazioni non perfettamente specifiche. A questo però è possibile ovviare facendo precedere l'amplificazione vera e propria (cioè quella con gli adattatori di 3 basi) da una amplificazione preliminare con adattatori di una sola base.

Per ulteriori dettagli e, in particolare, per i motivi per cui è opportuno digerire il DNA in esame con due enzimi di restrizione diversi (un *common* ed un *rare cutter*) si rimanda al lavoro originale di Vos *et al.*, 1995.

FERP

L'approccio comune alle tecniche del gruppo FERP (*Fluorophore-Enhanced Repetitive sequence-based Polymerase chain reaction*), va tenuto distinto da quello delle precedenti perché i *primer* che utilizza per ottenere l'amplificazione simultanea di vari *loci* del genoma non sono *random* (cioè non sono scelti arbitrariamente) bensì decisi per il fatto di essere complementari a sequenze ripetitive *note* e ben definite che sono conservate e intersperse nel genoma batterico. Poiché le amplificazioni di questo tipo sono basate sulla conoscenza di sequenze ripetitive vengono designate con il nome rep-PCR. Esse possono essere applicate a molti batteri diversi purché il loro genoma sia stato caratterizzato abbastanza da avervi individuato sequenze ripetitive.

Versalovic *et al.* (1995) hanno introdotto due importanti perfezionamenti nella rep-PCR trasformandola nella FERP.

Il primo di questi perfezionamenti è consistito nell'aver introdotto l'uso di *primer* legati covalentemente con la loro estremità 5' ad una sostanza fluorescente che rende evidenziabili con un laser i vari frammenti anche durante la corsa elettroforetica.

Il secondo è l'utilizzazione *nella stessa amplificazione* di una coppia aggiuntiva di *primer* (anch'essi legati ad un fluoroforo che è però diverso da quello della prima coppia di *primer* [per cui eccitato con il laser genera una luce di colore diverso]) complementari alla sequenza di un gene scelto per la sua rilevanza clinica (per esempio un gene che conferisca virulenza [il gene di una tossina] oppure resistenza ad un determinato antibiotico).

In questo modo si è potuto, non solo distinguere vari cloni batterici l'uno dall'altro, ma anche caratterizzarli uno per uno per proprietà cliniche rilevanti e questo in un unico procedimento di PCR e di analisi elettroforetica.

Un ulteriore vantaggio di questa tecnica è che la si può utilizzare anche effettuando la PCR direttamente su sospensioni batteriche.

I batteri studiati in questo lavoro erano vari ceppi di *Escherichia coli*, di *Mycobacterium avium* e di *Streptococcus pneumoniae*.

Dideossifingerprinting

È una tecnica diretta alla ricerca di nuove mutazioni, che è risultata dalla fusione del metodo classico di Sanger (di sequenziamento del DNA con dideossinucleotidi) con la tecnica detta SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), o meglio SSCA (*Single Strand Conformation Analysis*) e che è stata proposta da Sarkar *et al.* (1992).

La SSCA è una tecnica di ricerca di mutazioni che consiste essenzialmente nell'analisi elettroforetica su gel non denaturante (cioè tale da non disturbare la conformazione delle singole eliche di DNA) del frammento di DNA in esame ridotto a singola elica. In questa forma una buona percentuale di mutazioni (variabile a seconda dei casi tra il 30% ed il 70%), anche se puntiformi (Sostituzioni di Singoli Nucleotidi = SSN) è sufficiente a modificare il comportamento elettroforetico del frammento (perché ne altera la conformazione) e quindi a rendersi manifesta per confronto con il frammento normale.

La sequenza di DNA in esame, prima di essere fatta correre come per un'analisi SSCA, viene amplificata mediante PCR usando un dideossinucleotide (per es. il ddGp) invece di tutti e 4 separatamente l'uno dall'altro, come nel metodo standard di sequenziamento per PCR. Si genera così tutta una serie di frammenti, invece di uno solo come nell'SSCA standard, ciascuno interrotto ad uno dei livelli occupati dal ddGp (restando nell'esempio precedente), cioè un vero e proprio DNA *fingerprint* dove ciascun frammento costituisce una SSCA di una sequenza di DNA uguale a quella del DNA in esame per il tratto che va dalla sua estremità 5' fino al punto in cui è stato incorporato il ddGp.

Il *fingerprint* del frammento mutato potrà risultare diverso da quello normale in più di un modo:

a) se la SSN coinvolge il dideossinucleotide usato nell'esperimento (si tratta per es. di una G $\leftrightarrow$ non-G) si noterà nel *fingerprint* mutato l'assenza di una banda che è presente in quello normale se la SSN è una G $\rightarrow$ non-G, oppure la presenza di una banda sovrannumeraria se la SSN è una non-G $\rightarrow$ G. Inoltre da quel punto in poi (cioè da quel frammento a quelli via via sempre più lunghi) tutte le bande occupano una posizione anomala perché ciascuna di esse costituisce una SSCA di un frammento anomalo: questo *fingerprint* è di fatto un *insieme* di SSCA al posto di uno solo. In alcuni casi però l'unica alterazione visibile consiste nella perdita di una banda normalmente presente (se la SSN è una G $\rightarrow$ non-G) oppure nella comparsa di una banda in eccesso (se la SSN è una non-G $\rightarrow$ G) e, naturalmente, ciò si verifica soprattutto se la SSN è in posizione terminale.

b) se invece la SSN non coinvolge il dideossinucleotide scelto per l'esperimento, essa non causa un cambiamento del numero delle bande, ma solo lo spostamento della posizione di tutte le bande da un certo livello in poi, come nel caso precedente.

Poiché in entrambi i casi il *pattern* cambia radicalmente dato che il cambiamento coinvolge un intero sottoinsieme di bande, è molto difficile che una mutazione sfugga a questo metodo di indagine. Non solo: esso, oltre a scoprire mutazioni con una efficienza che appare essere del 100% (sono state studiate 84 mutazioni già note del gene, *X-linked*, del fattore IX [*Christmas disease*] e tutte 84 sono

state identificate), cioè molto maggiore di quella dell'SSCA, indica anche quasi perfettamente la sede della mutazione su cui invece l'SSCA non dà alcuna informazione. Si deve però notare che in questo lavoro è stato studiato un gene del cromosoma X, per cui le mutazioni si trovavano allo stato emizigote.

Blaszyk *et al.* (1995) hanno confermato questi risultati studiando con questa tecnica 25 mutazioni già note della p53 (v. p53 GENE E PROTEINA**) — che è codificata da un gene autosomico — ed identificandole tutte. Gli AA. precisano, però, che alcune di queste mutazioni sarebbero sfuggite se non avessero effettuato l'analisi su entrambi i filamenti (questo perché i casi che si manifestano con la scomparsa di una banda non accompagnata da variazione della posizione di un certo numero delle altre bande, negli eterozigoti si manifesterebbero con il solo indebolimento di quella banda). In questo stesso lavoro vengono anche descritti in grande dettaglio gli accorgimenti tecnici da adottare per rendere massima l'efficienza e l'attendibilità del metodo.

Altri aspetti tecnici verranno illustrati nelle sezioni pertinenti della parte applicativa (v. sotto: *mappatura del genoma umano; espressione genica*).

APPLICAZIONI DEL DNA FINGERPRINTING E DI TECNICHE AFFINI

Medicina forense

Nuovi progressi

Non c'è dubbio che è questo il campo in cui il DNA fingerprinting è stato applicato per la prima volta su larga scala (v. PATERNITÀ, RICERCA DELLA*). Tuttavia l'impatto delle numerose tecniche di DNA fingerprinting inventate in questi ultimi anni è stato per la medicina forense molto minore di quello che si è avuto per campi diversi.

Sono stati comunque sperimentati con successo, dopo quelli iniziali di Jeffreys, nuovi probe (sonde molecolari) come il (CAC)_n e la regione HVR 3' rispetto ai geni delle α globine.

Oltre ai progressi compiuti utilizzando nuovi probe, ma seguendo l'approccio tradizionale (definito tale in quanto basato su quello originale di Jeffreys [digestione del DNA genomico intero seguita da Southern blot e da evidenziazione del multilocus DNA fingerprint con un probe marcato]), se ne sono verificati altri lungo un approccio sostanzialmente nuovo basato sull'esame di un certo numero di regioni ciascuna contenente un STR (= Simple Tandem Repeat; altrimenti chiamata SSR = Simple Sequence Repeat), cioè una sequenza che esiste sotto molte forme alleliche (v. PATERNITÀ, RICERCA DELLA*). Ognuna di queste regioni viene studiata in un esperimento proprio (che consiste nella sua amplificazione seguita dall'analisi elettroforetica dei frammenti che, essendo stati amplificati, si possono evidenziare direttamente, cioè senza ricorrere né al Southern blot [v. BLOTTING*] né ad alcun probe) e dà origine ad un pattern molto semplice (di una banda se il soggetto in esame è omozigote, di due se è eterozigote. Dato che gli STR hanno un numero elevato di alleli comuni il pattern è costituito quasi sempre da due bande). Individui diversi che condividano lo stesso pattern per tutte le regioni prese in esame capitano «raramente», cioè non proprio «mai», come accade per i multilocus DNA fingerprint alla Jeffreys, e questo perché il numero di loci presi in esame con questo tipo di approccio (che è costituito da un certo numero di single locus experiments invece un single multilocus experiment) è molto più piccolo di quello (genoto) del metodo originale (multilocus) di Jeffreys. In compenso, l'insieme di tutti i single locus patterns costituisce un insieme combinato di

genotipi, invece che un fenotipo con base genetica ignota perché sono noti i loci e gli alleli coinvolti. In conclusione, un pattern di questo genere può non essere sufficiente ad identificare con certezza un individuo e per questo motivo lo si denomina in genere profilo di DNA, termine proposto da Jeffreys *et al.* (1991) (cioè «combinazione di pochi pattern» ciascuno riguardante una singola sequenza molto variabile), invece che «DNA fingerprint» (cioè pattern che risulta dalla analisi simultanea di molte sequenze ciascuna delle quali è molto variabile). È evidente però che la identificazione sostanzialmente certa di singoli individui può essere ottenuta anche con questo tipo di approccio purché si esaminino un numero non piccolo di STR, per esempio più di cinque.

Sebbene in questi ultimi anni l'approccio del DNA fingerprinting e quello del profilo di DNA siano stati di fatto accettati universalmente, permangono ancora delle discussioni sul grado della loro validità come prova definitiva a livello processuale (discussioni che sono già state in parte illustrate nella voce: PATERNITÀ, RICERCA DELLA*). Dei numerosissimi articoli che trattano di questo dibattito se ne citano qui solo quattro («Principles and recent advances in human DNA fingerprinting» di Jeffreys *et al.*, 1991; «Statistical evaluation of DNA fingerprinting: a critique of the NRC's report» di Devlin *et al.*, 1993; «DNA fingerprinting dispute laid to rest» di Lander e Budowle, 1994; «DNA on trial - the molecular basis of DNA fingerprinting» di Housman, 1995).

Conviene trattare le critiche di natura tecnica che riguardano l'attendibilità dei risultati, separatamente da quelle relative alla loro interpretazione.

Le critiche sull'attendibilità dei risultati

Se ci si sta occupando di un caso di identificazione, si riferiscono alla domanda: i due profili di DNA (o i due DNA fingerprint) in esame — che appaiono essere perfettamente identici — lo sono veramente? Più precisamente queste critiche sostengono che esiste un rischio non trascurabile di arrivare ad una errata diagnosi di identità anche se non si sono prodotti artefatti né compiuti errori tecnici di alcun genere. Poiché ad una diagnosi di identità si giunge solo se tutte le bande del primo campione coincidono con quelle del secondo, il dubbio riguarda il grado di certezza con cui si afferma per tutte le bande che ognuna di esse ha mostrato nei due quadri lo stesso «identico» comportamento elettroforetico. È evidente però che, dato che la parola «identico» è un'astrazione teorica, occorre decidere in pratica un grado di tolleranza realistico tale che una eventuale differenza tra due bande debba indurre a diagnosticarle come differenti solo se supera questa soglia.

A questa difficoltà si è in parte ovviato introducendo il concetto di «bin» cioè di raggruppamento di bande le cui posizioni sono così «simili» che si decide di considerarle «uguali» in quanto le loro eventuali differenze sono al di sotto dell'ambito di risoluzione, su base di certezza, del metodo di analisi adottato (cfr., ad esempio, Housman, 1995). Ma quale ampiezza è opportuno attribuire ad un «bin»? Non esiste una risposta a priori a questa domanda salvo che, come era logico aspettarsi e come è stato effettivamente constatato sperimentalmente, l'ampiezza della fluttuazione che la posizione di una banda può mostrare da un esperimento all'altro per «puro caso» (in quanto osservata tra pattern ottenuti esaminando campioni di DNA ottenuti dallo stesso individuo) è proporzionale alla lunghezza della sua corsa, cioè il suo coefficiente di variazione cv (cv = deviazione standard/media) tende a rimanere costante (per una discussione di questo aspetto cfr.: Majumder, 1995). È chiaro che la soglia di tolleranza di una differenza tra due

bande (una ottenuta su un campione di DNA e l'altra ottenuta su un altro campione) al di sotto della quale le loro posizioni nel quadro elettroforetico vengono considerate identiche può variare in pratica da un laboratorio all'altro, anzi addirittura da un operatore all'altro nello stesso laboratorio e, al limite, da una corsia all'altra dello stesso gel, per cui la garanzia assoluta della esattezza di una diagnosi di identità dipende necessariamente dalla sua riproducibilità (che però non sempre è saggiabile perché talora la quantità di materiale biologico disponibile è insufficiente) e dalla 'serietà' del laboratorio di analisi.

Per quanto riguarda la attendibilità dal punto di vista tecnico del DNA *fingerprinting* nell'accertamento di paternità si consiglia di consultare «Paternity testing with oligonucleotide multilocus probe (CAC)₃ (GTG)₅: A multicenter study» (Krawczak *et al.*, 1993) in cui, dopo aver confrontato i risultati ottenuti indipendentemente da 7 laboratori sugli stessi 256 casi, si conclude che, sebbene le 7 serie di risultati differissero significativamente da svariati punti di vista, le loro conclusioni diagnostiche coincidevano pienamente e che uno solo dei 256 casi è rimasto dubbio (non essendo stato possibile decidere tra l'ipotesi di 2 mutazioni e quella di un padre diverso da quello presunto, ma ad esso strettamente imparentato).

Problemi relativi alla interpretazione dei risultati

Si supponga di aver risposto inequivocabilmente al quesito precedente dimostrando con certezza che i due materiali biologici in esame provengono da DNA identici per le caratteristiche prese in esame (nel caso di un accertamento di identità) o che il presunto padre è compatibile con il presunto figlio (nel caso di un accertamento di paternità).

Sorgono allora a questo punto le domande tradizionali, quelle che da sempre la medicina forense si è posta in tutti gli approcci genetici, e cioè: quale è la probabilità che un soggetto X estratto a caso dalla popolazione mostri con gli esami effettuati un *pattern* (DNA *fingerprint* oppure profilo di DNA) identico a quello dell'imputato, oppure rispettivamente, tale da non poter escludere che sia il padre biologico del presunto figlio?

Sebbene sia vero che queste sono le vecchie domande degli approcci genetici della medicina forense di epoca pre-DNA, è anche vero che le risposte relative ai dati ricavati con questi nuovi approcci non possono essere ottenuti semplicemente per estrapolazione da quelle che si davano con i vecchi marcatori mendeliani di cui in genere si conoscevano, non solo la modalità di trasmissione, ma anche le frequenze dei vari alleli e che inoltre non mutavano «mai». Essi cioè, a parte il difetto capitale di essere molto meno probanti di un DNA *fingerprint* o di un profilo di DNA, erano per tutto il resto più sicuri ed infondevano (se ci è permesso questo modo di esprimersi inusuale per un articolo scientifico) un 'senso di tranquillità' che discendeva dal fatto che 'tutto era sotto controllo' perché le stime del grado di verosimiglianza raggiunto, sebbene molto più basse di quelle raggiungibili con i metodi del DNA, erano però molto più rigorose. Resta comunque il fatto che, ai fini pratici, è molto più convincente una diagnosi con un margine di errore che, se pure stimato grossolanamente, è di sicuro infinitamente piccolo (per esempio, dell'ordine di 10^{-6}), di una diagnosi il cui margine di errore stimato in modo molto più rigoroso risulti però essere molto meno piccolo, e quindi non trascurabile, per esempio dell'ordine di 10^{-3} (a questo proposito si veda ancora: PATERNITÀ, RICERCA DELLA*).

Dopo questa premessa conviene passare ad esaminare i principali punti di disaccordo, questa volta a livello interpretativo, sulla validità dei metodi basati sull'analisi del DNA.

I motivi che hanno reso «incandescente» questo dibattito

sono stati illustrati da Lander e Budowle (1994). Essi vanno ricercati, tanto per cominciare, nella particolare attrattiva che questo tipo di argomento esercita sul grande pubblico (gli AA. si riferivano, a titolo di esempio, al processo contro il campione di football americano O. J. Simpson che sarebbe iniziato nel novembre '94 e che aveva causato lo svolgimento, in parecchie tra le più importanti reti televisive degli Stati Uniti, del corso più dettagliato di genetica molecolare che fosse mai stato impartito ai cittadini U.S.A.). Poiché i profani, anche se avevano seguito proficuamente il «corso televisivo», non erano in grado di giudicare la validità delle varie argomentazioni scientifiche, esse sono state di fatto sostituite da una sorta di «sondaggio di opinioni» guidato soprattutto da personalità di spicco nel campo giuridico, come procuratori e avvocati difensori. Essi però, oltre ad essere incompetenti in questo campo specifico, erano per definizione parziali nel senso di avere interesse ad accettare, gli uni la infallibilità di questo tipo di prove e gli altri la incertezza delle stesse. Il risultato inevitabile è stata la conclusione che la validità del DNA *fingerprinting* rimaneva «controversa» essendo indebolita dalla persistenza di un certo numero di problemi fondamentali non risolti.

A tutto questo, sempre secondo Lander e Budowle, andava aggiunto il modo sbagliato con cui era partita questa tecnologia, cioè mentre ancora mancavano standard adeguati per affermare l'identità di DNA *fingerprint*, per scoprire artefatti dei gel, per scegliere le sonde molecolari più adeguate e per computare le frequenze geniche. Questa partenza trionfalmente prematura aveva all'inizio gettato discredito sull'approccio del DNA *fingerprinting*.

Fortunatamente il dibattito è stato rimesso nel binario giusto. In particolare, ben 4 Corti superiori degli Stati Uniti hanno affermato che i problemi di genetica delle popolazioni (i punti di divergenza più 'caldi' di questa controversia) vanno risolti dai genetisti delle popolazioni. Si è deciso cioè che, non essendo i giudici in grado di valutare la validità di questo tipo di prove, la loro introduzione nel sistema legale degli Stati Uniti doveva essere basata sul così detto *criterio di Frye* secondo il quale «una nuova tecnica scientifica può essere presentata ad una giuria solo se ha conquistato una accettazione generale nel campo specifico a cui appartiene». Potrebbe sembrare anche questo un «sondaggio di opinioni», ma non lo è, dato che se la decisione di accettare o di respingere una ipotesi scientifica deve essere presa da esperti del campo specifico, invece che da profani, sarà basata — o almeno dovrebbe esserlo — solo sulla valutazione della validità degli argomenti pro e contro di essa, invece che su di una votazione.

Oltre che la «votazione» va, naturalmente, scartato come criterio di giudizio sulla bontà del metodo del DNA *fingerprinting*, l'elenco delle sue «benemeritenze», cioè dei casi più clamorosi di successo sia nell'identificare un colpevole che nello scagionare un innocente, per quanto straordinario possa essere questo elenco. Infatti l'argomento in discussione non è se il DNA *fingerprinting* ha la capacità di risolvere «alcuni» dei casi in esame — perché di questo non dubita nessuno — bensì se c'è o non c'è il rischio che questa metodologia possa portare in certi (altri) casi, comunque rari, ad una diagnosi grossolanamente sbagliata.

Queste controversie si potevano dirimere solo individuando una base di accordo comune a 'tutti' gli esperti (cioè soddisfacendo il criterio di Frye). Sono state create a questo scopo nei primi anni '90 due commissioni, una negli Stati Uniti (la TWGDAM = *Technical Working Group on DNA Analysis Methods*) ed una in Gran Bretagna (un comitato dell'NRC = *National Research Council*). Entrambe le commissioni hanno deciso preliminarmente di optare in

senso conservativo, cioè a favore dell'«imputato», tutte le volte che fossero sorti dubbi sul criterio da adottare. Questa decisione è stata applicata in modo così estremo che molti hanno giudicato i criteri consigliati da queste commissioni eccessivamente *biased* (viziati). In compenso essi evidentemente hanno il vantaggio di mettere al riparo questi criteri da critiche «garantiste».

Va oltre gli scopi di questa voce analizzare in modo esauriente, e tanto meno sistematico, tutti gli aspetti della controversia sulla validità dei metodi basati sul DNA *fingerprinting* e sul profilo del DNA (a questo scopo si veda soprattutto l'articolo già citato di Lander e Budowle del 1994). Passeremo quindi in rassegna solo quelli più importanti. È conveniente suddividerli in due gruppi: quelli che riguardano il «peso» o «score» (= LR o *Likelihood Ratio*) da attribuire ai singoli marcatori (per esempio, ad una particolare banda allelica di un profilo di DNA) *presi uno alla volta* e quelli che si riferiscono invece al loro *valore combinato*.

1. *Gli LR per singoli marcatori.* - La probabilità che la coincidenza osservata tra la banda (semplice o «binned» che sia) trovata nel DNA del sangue dell'imputato e quella del materiale biologico di confronto (trovato, per esempio, nel luogo del crimine) sia puramente casuale non è altro che «la sua frequenza nella popolazione» e quindi l'LR è semplicemente il reciproco di questa frequenza. Se chiamiamo p la frequenza dell'allele responsabile della comparsa di questa banda, la frequenza dei soggetti che la presentano è $p^2 + 2p(1 - p)$ (ma, se p è piccolo, come in genere si verifica se gli alleli sono molti, $2p$ è una approssimazione perfettamente accettabile [perché $p^2 = 0$ ed $(1 - p) = 1$] soprattutto se si tiene conto del grado di incertezza molto maggiore riguardante la stima di p). Il problema è quindi di valutare correttamente p e questo può essere difficile, se non impossibile, per una società pluri-etnica le cui componenti popolazionistiche potrebbero avere p molto diversi per cui il suo valore esatto dovrebbe essere una loro media ponderata. Per ovviare a questa possibile fonte di errore si è convenuto di non attribuire in nessun caso a p un valore minore di 0,1 (per alcuni: 0,05) anche se la sua stima per la popolazione generale residente nel «luogo del delitto» fosse risultata molto inferiore (in questo modo nessun singolo marcatore può far aumentare l'LR combinato di più di 10 volte).

2. *Gli LR combinati.* - Si ottengono come prodotto degli LR singoli di cui sono composti, procedimento che, evidentemente, è giustificato solo se sono *indipendenti*. Due sono i motivi principali per cui potrebbero non esserlo: il *linkage disequilibrium* (v. GENETICA MEDICA*, coll. *3350-3353) ed una stratificazione della popolazione.

La prima fonte di errore si può neutralizzare non includendo mai, nella serie di marcatori scelti per effettuare la diagnosi combinata, marcatori strettamente associati. È evidente che questo accorgimento è attuabile solo per i profili di DNA (perché ciascuno di essi è un marcatore mendeliano e come tale mappabile rispetto ad altri marcatori anch'essi mendeliani) e anche per questi non è facile da attuare, mentre è del tutto inattuabile per i DNA *fingerprint* in cui le singole bande che ne costituiscono il complesso quadro hanno una determinazione genetica sconosciuta.

La seconda possibile fonte di errore, cioè una eventuale stratificazione della popolazione, potrebbe in linea di principio portare a sopravvalutazioni dell'LR (cioè a sfavore dell'imputato) anche rispetto

gruppi le cui frequenze negli europoidi sono circa 0 e 0,025, negli afroamericani circa 0,05 e 0,4 ed infine nella popolazione globale degli USA circa 0,005 e 0,04 (supponendo che gli afroamericani costituiscano circa il 10% della popolazione globale). Se si fosse trovata una coincidenza per β^A (cioè tanto il campione trovato nel luogo del delitto che quello ottenuto dall'imputato avessero presentato questo allele allo stato eterozigote) l'LR contribuito da questa coincidenza all'LR combinato sarebbe stato $1/(2p) = 1/0,01 = 100$; analogamente, una coincidenza per R' avrebbe contribuito con un LR pari a $1/0,08$, cioè 12,5. L'LR combinato sarebbe stato allora 1250, un valore quasi probatorio contro l'imputato. Ma l'LR in questo caso sarebbe stato *grossolanamente* sovrastimato. Infatti, dato che l'imputato di questo caso immaginario, se trovato negli Stati Uniti, sarebbe quasi senza eccezione un afroamericano, l'LR da applicare nel suo caso sarebbe stato $[1/(2 \times 0,05 \times 0,95) \times 1/(2 \times 0,4 \times 0,6)] = 21,9$, invece di 1250, cioè si sarebbe dovuto concludere che l'«ignoto assassino» era sicuramente un afroamericano come l'imputato, ma che una percentuale elevata di afroamericani (circa il 5%, cioè $1/21,9$) presentava la stessa doppia coincidenza. In altre parole, combinando l'LR di 10 dovuto alla coincidenza etnica con quello combinato delle due coincidenze genotipiche tra gli afroamericani (21,9), si sarebbe dovuti arrivare ad un LR finale di 219, ben inferiore al 1250 a cui si sarebbe arrivati ignorando la stratificazione della popolazione.

L'esempio appena discusso è talmente estremo ed ovvio che non si sarebbe mai caduti in un errore così grossolano. Ma solo eccezionalmente le possibili sorgenti di errori di questo tipo sono così appariscenti perché, sebbene esistano non pochi marcatori con frequenze molto diverse in etnie diverse, solo pochissimi di essi (e comunque nessuno a livello di DNA) sono stati studiati a fondo come quelli considerati nell'esempio. Si è cioè ben lontani dal poter applicare procedimenti come quello illustrato sopra ai profili di DNA. Si è allora deciso di adottare un procedimento *conservativo al massimo* basato sul così detto *ceiling principle* o principio del «tetto» (o della «soglia»). Esso consiste nell'usare, per i calcoli degli LR combinati, per ogni marcatore la *frequenza più alta* con cui lo si è trovato nei vari gruppi etnici che coesistono nel territorio (per esempio se i gruppi etnici del territorio sono cinque e le frequenze del marcatore in questione sono 0,03; 0,08; 0,02; 0,05 e 0,10 si introdurrà nel calcolo il valore di 0,1). Evidentemente questo procedimento è attuabile solo per i marcatori che siano stati studiati accuratamente in tutte le etnie che costituiscono la popolazione dove si svolge l'indagine e questo requisito non sempre è soddisfatto.

Sebbene le commissioni create *ad hoc* per affrontare questo problema siano state ormai sciolte, per cui eventuali nuovi dubbi potranno tutt'al più ricevere risposte «private», si può ora concludere che la controversia sulla validità e l'estrema utilità degli approcci a livello di DNA in medicina forense è stata definitivamente risolta a loro favore sotto tutti i punti di vista essenziali (lasciando da parte la possibile esistenza di un gemello MZ e di un eventuale scambio di provette).

Discordanze

Tutto quanto si è detto riguarda gli errori di interpretazione in cui si può incorrere quando il risultato sia stato una coincidenza perfetta tra i campioni che si stanno confrontando. Se invece, in una ricerca relativa ad una identificazione si è incontrata anche una sola discordanza (*mismatch*) non c'è alcun problema di interpretazione. In questo caso eventuali dubbi riguardano solo il grado di certezza con cui si afferma che c'è il *mismatch*: contaminazione del campione, scambio di provetta, altri possibili errori tecnici o di registrazione dei risultati. L'eliminazione di questo tipo di errori è compito specifico di ogni singolo laboratorio.

* Si considerino a titolo di esempio due marcatori tradizionali ben noti come p^A e p^B della nicotina ed R' e D' (v. SANGUIGNI

Microbiologia medica

Due sono i problemi principali della epidemiologia medica per la cui soluzione l'approccio del DNA *fingerprinting* si è rivelato di estrema utilità, anche perché, a differenza dei metodi tradizionali (basati su caratteri biochimici, sierologici, di sensibilità a fagi e ad antibiotici) non richiedono l'espressione, ma solo la presenza, delle sequenze di DNA in esame:

a) la distinzione in singoli pazienti tra ricadute oppure attivazioni di infezioni latenti, da una parte, rispetto a reinfezioni, dall'altra;

b) l'origine mono- o polifocale di microepidemie scopiate, ad esempio, in un centro di terapia intensiva od in un nosocomio (la cui diffusione sia stata cioè favorita dalla insufficienza delle difese immunitarie dei pazienti o, rispettivamente, dal comportamento non igienico dei ricoverati legato al loro stato psichico anormale).

Mycobacterium tuberculosis

Le infezioni da *M. tuberculosis*, che erano molto diminuite nel mondo tecnologicamente avanzato, stanno raggiungendo di nuovo una diffusione considerevole. Ciò ha fortemente stimolato gli studi su questo batterio, compresi quelli epidemiologici che hanno tra gli scopi principali l'accertare l'origine esatta dei nuovi casi: recrudescenza o reinfezione? Sfortunatamente *M. tuberculosis* è uno dei batteri patogeni che meno si sono prestati ad una suddivisione intraspecifica con tutti i numerosi approcci tradizionali che si sono via via tentati (cfr. la rassegna di Saunders del 1995: «State of the art: *Mycobacterium tuberculosis*») perché, evidentemente, si tratta di una specie considerevolmente omogenea a livello fenotipico.

La vera svolta per la soluzione di questo problema è stata effettuata grazie al gruppo di van Soolingen (1994) che ha messo a punto una tecnica molto efficiente di DNA *fingerprinting* del *M. tuberculosis*. Il metodo è descritto in dettaglio sia nei suoi principi che dal punto di vista strettamente tecnico da van Soolingen e collaboratori in un articolo del 1994 («DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*») che andrebbe letto per esteso. Limitandosi a prendere in esame solo i marcatori studiabili direttamente a livello di DNA, gli AA. concentrano la loro attenzione sugli elementi trasponibili o *Insertion Sequences* (ISs) (= sequenze di inserzione) e lasciano da parte le STR (*Simple Tandem Repeat*; v. PATERITÀ, RICERCA DELLA*), o SSR (*Simple Sequence Repeat*). Delle due IS note, la IS1081 e la IS6110, solo quest'ultima mostra un certo grado di instabilità, e quindi di variabilità genetica, tale da renderla adatta a distinguere fra loro ceppi diversi di *M. tuberculosis*. La variabilità dell'IS6110, che questi AA. sono stati in grado di scoprire esaminando numerosi isolati di *M. tuberculosis*, è risultata essere espressione di due tipi di variabilità, una riguardante il numero di copie dell'elemento di base presente in ciascuna delle sequenze IS6110 e l'altra i siti di inserzione delle varie sequenze IS6110 nel cromosoma. I vari elementi di base sembrano invece essere pressoché identici: sono tutti lunghi 1,4 Kb ed i tre che sono stati sequenziati differivano solo per pochi nucleotidi.

Il metodo con cui si sono ottenuti i DNA *fingerprint* basati sull'IS6110 è sostanzialmente lo stesso di quello tradizionale di Jeffreys. Si tratta infatti anche in questo caso di una digestione con un enzima di restrizione adatto (il *Pvu II*) seguito dal *Southern blotting* e dalla evidenziazione dei frammenti contenenti la sequenza IS6110 con una sonda (di 245 b.p.) legata alla perossidasi. È importante includere in ogni gel due o tre corsie con DNA costituiti da frammenti di peso molecolare noto.

Alla fine di quella rassegna gli AA. elencano alcune delle utilizzazioni di questo approccio di cui alcune già realizzate (come il monitoraggio della efficacia di una chemioterapia, l'impatto di stati di immunosoppressione sulla suscettibilità a [re]infezioni, il risalire all'origine di infezioni in nosocomi, etc.), ed altre facilmente prevedibili (valutazioni del contributo relativo delle reinfezioni e delle riattivazioni, l'impatto dei soggetti sieropositivi per l'HIV sulla trasmissione di *M. tuberculosis* alla popolazione generale sieronegativa, l'identificazione di ceppi ad alta virulenza e/o trasmissibilità e/o tropismo tissutale, etc.).

Fra i vari lavori che descrivono i risultati conseguiti con questo metodo se ne ricordano qui solo tre.

Il primo (Alland *et al.*, 1994) mostra, sulla base di uno studio effettuato su 130 pazienti di New York City, che il recente aumento di casi di tubercolosi verificatosi in questa comunità è dovuto soprattutto alla sua trasmissione recente per contagio più che a riattivazione di forme latenti.

Il secondo lavoro (Warren *et al.*, 1996), in cui si è studiata una recrudescenza epidemica in due comunità della regione di Città del Capo, mostra risultati che suggeriscono che il forte addensamento di casi di resistenza agli antibiotici che era stato osservato era da attribuirsi ad incremento del contagio più che a cattiva osservanza delle prescrizioni mediche da parte dei pazienti.

Il terzo lavoro (Lutsey *et al.*, 1996) riporta i risultati di uno studio diretto a scoprire l'origine della resistenza alla mono-rifampina in *M. tuberculosis* di pazienti con l'AIDS. *M. tuberculosis* resistenti alla rifampina isolati da questi pazienti sono stati confrontati non solo per l'IS6110 DNA *fingerprint*, ma anche sequenziando la regione del gene strutturale per la subunità β della RNA polimerasi (*rpoB*) che è quella in cui sono localizzate le mutazioni che conferiscono resistenza a questo antibiotico. Con entrambi questi criteri si è mostrato che tutti i ceppi di *M. tuberculosis* esaminati avevano acquisito indipendentemente la resistenza.

Helicobacter pylori

Due lavori (Xia *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1995) effettuati entrambi su pazienti che, clinicamente guariti da un'infezione da *H. pylori*, avevano di nuovo presentato la stessa infezione, hanno mostrato con la RAPD e con metodi simili che in tutti i casi si trattava di recrudescenza e non di reinfezione. E questo malgrado che le IgG specifiche verso l'*H. pylori* avessero mantenuto un alto titolo durante l'intero periodo di remissione clinica completa (perfino per 4 anni).

Streptococcus pyogenes

Fino a pochi anni fa si disponeva solo dell'approccio sierologico (antigeni M e T) per caratterizzare ceppi di isolamento di *S. pyogenes* ed affrontare il solito problema della distinzione tra recrudescenza e reinfezione nei casi di faringotonsillite ricorrente. In seguito sono stati introdotti nuovi metodi basati su *genomic* oppure su *RNA typing* (*ribotyping*) tutt'altro che soddisfacenti perché laboriosi, tecnicamente complessi e molto costosi.

L'utilizzazione del RAPD ha costituito un progresso notevole. Con questo metodo Österlund ed Engstrand (1995) hanno confrontato *S. pyogenes* isolati da pazienti con faringotonsillite ricorrente ed in tutti i casi i quadri RAPD ottenuti dopo il trattamento antibiotico sono risultati uguali a quelli di prima del trattamento.

Enterobacter aerogenes

È un germe che sta recentemente acquistando importanza tra i batteri opportunisti, ma fino a pochi anni fa anche per questo batterio si disponeva solo di metodi inefficienti per distinguere le varie linee e quindi ricostruire l'origine e lo sviluppo di epidemie da esso provocate. Anche in questo caso la RAPD si è dimostrata molto utile. Per esempio Davin-Regli *et al.* (1996), studiando con questa tecnica *E.*

aerogenes isolati da pazienti di due centri di terapia intensiva, in cui era esplosa una microepidemia dovuta a questo germe, hanno dimostrato che in uno dei due centri si erano diffusi da un paziente all'altro ceppi diversi di *E. aerogenes*: anzi in certi casi si erano isolati *E. aerogenes* con quadri di RAPD diversi, da siti anatomici diversi di un singolo paziente, mentre nell'altro da tutti i pazienti affetti è stata isolata la stessa singola linea di *E. aerogenes*. Si ricorda che *E. aerogenes* veniva precedentemente designato come *Aerobacter aerogenes* (V. AEROBACTER GENERE).

Neisseria gonorrhoeae

Camarena *et al.* (1995) hanno studiato 70 linee di *N. gonorrhoeae* isolati da pazienti non trattati con una infezione gonococcica del canale urogenitale. Tutte le 70 linee sono state caratterizzate per le esigenze culturali, per il fenotipo sierologico, per il tipo di plasmidi, per la sensibilità agli antibiotici e con il DNA fingerprinting. Quest'ultimo approccio ha mostrato una efficienza discriminatoria all'incirca pari a quella combinata degli approcci culturale e sierologico.

Poiché la correlazione tra i vari tipi di classificazione era risultata molto alta, ma non assoluta, si è concluso che è possibile incrementare il potere discriminatorio tra i vari ceppi combinando metodi diversi: i risultati migliori si sono ottenuti con la caratterizzazione sierologica ed il DNA fingerprinting.

Altri patogeni

Sono stati studiati con il DNA fingerprinting molti altri patogeni tra i quali conviene citare la *Legionella pneumophila* (Matsiota-Bernard *et al.*, 1994), lo *Staphylococcus aureus* (Hojo *et al.*, 1995), la *Candida albicans* (Lockhart *et al.*, 1995), ed anche batteri patogeni non per l'uomo («Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and non-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*»: Woodburn *et al.*, 1995), un ibrido putativo di *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* come agente etiologico del 27% (8 casi su 40) dei casi di leishmaniosi cutanea in Nicaragua (Belli *et al.*, 1994) ed il virus dell'epatite C (Fox *et al.*, 1995), quest'ultimo naturalmente con un metodo diverso da quelli utilizzati per i batteri, cioè con il dideoxyfingerprinting.

Tumori

Il DNA fingerprinting si è dimostrato un approccio molto utile (anzi in certi casi come l'unico utilizzabile) per affrontare numerosi problemi oncologici. Anche per questo argomento si citeranno solo alcuni dei lavori pertinenti, che sono così diversi fra loro per gli obiettivi che si prefiggevano, da rendere impossibile raggrupparli in linee di ricerca comuni.

Carcinoma multiplo epatocellulare

Uno dei quesiti più importanti sulla natura e la prognosi del tumore HCC (*Hepato Cellular Carcinoma*; V. FEGATO E VIE BILIARI*, *carcinoma primitivo del fegato*) riguarda l'origine dei noduli intraepatici multipli con cui esso si presenta fin dal suo esordio: sono noduli metastatici derivati da un unico tumore oppure l'espressione di origini polifocali più o meno simultanee? Due gruppi, uno giapponese e l'altro di Taiwan (come è noto l'HCC è particolarmente frequente in Asia orientale), hanno affrontato questo problema su casi molto precoci di HCC (Aihara *et al.*, 1996; Sheu Jin-Chuan *et al.*, 1993) ed entrambi sono giunti alla conclusione che i noduli multipli dell'HCC di singoli pazienti costituivano cloni diversi. Tutti e due questi lavori hanno utilizzato oltre al DNA fingerprinting anche altre indagini a livello di DNA.

Secondo gli AA. di questi due lavori il motivo per cui altri ricercatori avevano concluso per un'origine unifocale dell'HCC è che essi avevano studiato casi *avanzati* di HCC in cui quindi molti dei noduli neoplastici erano effettivamente metastatici.

Nel lavoro di Tomohiko e collaboratori si affronta anche il problema della natura dei noduli displastici che si trovano spesso in fegati cirrotici e che sono in genere considerati lesioni precancerose: gli AA. mostrano che le cellule di questi noduli presentano alterazioni genetiche, tra le quali una perdita di eterozigosità (LOH = *Loss Of Heterozygosity*) in alcuni siti, che è un reperto tipico di molte linee neoplastiche, per cui propendono a considerarli come lesioni già neoplastiche.

Carcinoma della mammella

Hovig *et al.* (1993) hanno studiato con DNA fingerprint uni- e bidimensionali il tessuto tumorale e cellule normali (linfociti) di controllo di 6 pazienti allo scopo di ottenere una valutazione, sia pure molto approssimativa, dell'entità delle alterazioni genetiche che si possono osservare in linee di questo tipo di tumore.

Nel DNA fingerprint bidimensionale di una paziente in cui si distinguevano circa trecento spots hanno trovato 25 differenze rispetto al pattern normale (11 spots in eccesso e 14 mancanti).

Carcinomi coloretali

Sono stati presi in esame (Bocker *et al.*, 1996) 56 casi sporadici di carcinomi coloretali per accertare se una loro eventuale instabilità per microsatelliti (STR = *Simple Tandem Repeats*) fosse correlata con altri tipi di instabilità genomica (ploidia, 'oligonucleotide fingerprinting' e stabilizzazione della p53). Undici dei 56 tumori hanno mostrato un'instabilità dei microsatelliti e questa instabilità era correlata con la sede del tumore che tendeva ad essere prossimale rispetto all'angolo splenico del colon (9 casi su 11 erano prossimali rispetto ad 8 su 45 trovati fra i tumori che non avevano mostrato instabilità) e con una attività proliferativa relativamente bassa.

Gli AA. suggeriscono che lo studio della instabilità dei microsatelliti in questi tumori potrebbe risultare utile nell'individuare un sottogruppo con patogenesi, e forse prognosi, particolari.

PTLPD

La malattia PTLPD (*Post Transplantation Lympho-Proliferative Disease*) è una malattia linfoproliferativa che segue a trapianto ortotopico di fegato.

Si tratta di una ben nota complicazione di trapianti d'organo, in molti casi associata ad una infezione da virus di Epstein-Barr, che può presentare uno spettro molto ampio di quadri clinici: da una malattia simile alla mononucleosi fino ad un linfoma non-Hodgkin.

Generalmente la si è considerata espressione di una proliferazione di linfociti del soggetto che ha ricevuto il trapianto. Però la possibilità che i linfociti proliferanti fossero quelli del donatore contenuti nell'organo trapiantato non poteva essere esclusa ed infatti alcuni casi di questo tipo erano già stati descritti.

In questo lavoro Armes *et al.*, 1994 descrivono due casi di PTLPD che, con lo studio di DNA fingerprint e di microsatelliti, si sono dimostrati di derivazione esogena.

Variante dello xeroderma pigmentoso (XPV)

Lo xeroderma pigmentoso tipico consiste nella compromissione della riparazione mediante escissione dei danni al DNA causati da radiazioni ultraviolette. Nell'XPV sono in-

vece compromessi i meccanismi post-replicativi della riparazione di questi danni.

Allo scopo di studiare la biologia dell'XPV sarebbe essenziale disporre di linee immortalizzate di cellule con questo tipo di lesione. King *et al.* (1995) hanno trasformato, con l'antigene T di alto peso molecolare dell'SV40, fibroblasti di un paziente XPV ed hanno ottenuto 2 linee immortalizzate. A questo punto era necessario avere la certezza che queste linee fossero effettivamente derivate dal paziente e questo è stato dimostrato confrontando un loro DNA *fingerprint* ed un loro profilo di DNA con quelli del paziente. Inoltre questi fibroblasti hanno mostrato, come atteso, una ipersensibilità ai raggi U.V. rispetto a fibroblasti trasformati anch'essi con virus SV40, ma derivati da soggetti normali.

Effetti del 17 β -estradiolo sul genoma di cellule tumorali

Il 17 β -estradiolo ha provocato un forte aumento della frequenza di riarrangiamenti genomici evidenziati a livello di sequenze di minisatelliti su cloni di cellule di topo trasformate con raggi X (Benoit, 1996).

Mappatura del genoma umano: allineamento dei contig

Il progetto «Genoma umano» (v.**), come del resto qualsiasi altro progetto di sequenziamento del genoma di una specie, deve passare attraverso varie fasi intermedie una delle quali consiste nel crearsi una mappa molto fitta di punti di riferimento, cioè di punti ben individuati e localizzati lungo ognuno dei cromosomi. Nella mappa genetica creata a questo scopo per l'Uomo i punti di riferimento (i così detti STS = *Sequence Tagged Sites*, cioè siti con sequenza [unica] etichettata) sono circa cinquemila, pari in media ad uno ogni megabase e ad ogni centimorgan.

Il passo successivo consiste nel costruire una genoteca (v.***) di YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*) ciascuno dei quali sia il vettore di una sequenza derivata dal genoma umano. In media ogni YAC porta una sequenza di circa 1 megabase. Questa genoteca deve essere costituita da un numero di YAC tale che, pur essendo molti di essi più o meno parzialmente sovrapposti con una o più delle sequenze adiacenti (ed è necessario, ai fini della mappatura, che sia così, oltre ad essere comunque inevitabile) tutti i tratti del genoma umano devono essere rappresentati almeno in uno YAC.

A questo punto si deve cercare di ancorare il maggior numero possibile di YAC ad uno o, meglio ancora, a due dei circa 5000 STS. Questo lo si ottiene per tutti quegli YAC che mostrano di contenere almeno una sequenza uguale ad un STS. Nei casi particolarmente favorevoli in cui uno YAC mostra di contenere due STS adiacenti (che chiameremo A e B), il sequenziamento del DNA umano contenuto nello YAC fornisce direttamente la sequenza del genoma umano tra A e B, nonché di un certo tratto a monte di A e di un certo tratto a valle di B.

Ma in tutti i casi, che sono numerosi, in cui uno YAC contiene un solo STS (per es. F) ed un altro YAC un STS ad esso adiacente (per es. G), non è dato sapere cosa c'è tra F e G. Questo problema è stato affrontato, e lo si affronta tuttora, cercando anzitutto di accertare se lo YAC con F ha una zona di sovrapposizione con lo YAC che contiene G (è evidente che se si arriva a questo risultato il problema è risolto) ed in caso negativo cercando YAC che possano fare da ponte tra lo YAC con la sequenza F e quello con la sequenza G, dimostrando di possedere una sequenza parzialmente sovrapposta a quella dello YAC con F ed un'altra parzialmente sovrapposta a quella dello YAC con G. Tale arrangiamento è denominato *contig* (per «contiguo»).

Uno degli approcci più importanti per la ricerca di *contig* utilizza un tipo particolare di DNA *fingerprinting*.

Il procedimento consiste nel far digerire da un enzima di restrizione con molti siti di taglio nel genoma (*common cutter*) gli YAC in esame più i due di riferimento, cioè quello con la sequenza F e quello con la G, e nell'effettuare l'analisi elettroforetica (seguita da *Southern blotting* ed evidenziazione con una sequenza ripetitiva molto comune e quindi capace di ibridare con tutti i frammenti) dei frammenti derivati da questa digestione. Poiché si usa un *common cutter* si ottengono moltissimi frammenti, cioè un *pattern* così complesso da costituire per ciascuno YAC un suo *fingerprint* (con altri enzimi si potrebbero ottenere altri *fingerprint* dello stesso YAC). A questo punto si procede al confronto tra i diversi *pattern* mediante il computer a cui si dà l'istruzione di non tenere conto delle bande comuni a tutti i *pattern* (che, evidentemente, derivano dal vettore comune a tutti gli YAC) e di segnalare i *pattern* che condividono un numero di bande in posizione identica troppo elevato per essere considerato casuale. Se questo risultato è confermato anche con altri enzimi si conclude di aver trovato un *contig* il cui *fingerprint* coincide parzialmente con quello di F mentre con altre bande coincide con quello di G, perché la sua sequenza è per una parte sovrapposta a F e per l'altra parte è sovrapposta a G.

Trapianti

Il DNA *fingerprinting* si è dimostrato utile per seguire il destino di cellule del midollo osseo trapiantate in pazienti SCID (*Severe Combined Immuno-Deficiency*); v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*, v.**]). Lau *et al.* (1995) hanno studiato una bambina affetta da SCID che aveva subito ad 11 mesi un trapianto di cellule di midollo paterne (genoma identico per il 50%) da cui erano state allontanati i linfociti T. Sebbene le mitosi delle sue cellule *midollari* studiate dopo un anno dal trapianto fossero risultate tutte XX (cioè come se non ci fossero più rimaste cellule paterne XY) lo stato clinico della bambina continuava ad essere soddisfacente.

Studi ulteriori, sia cariotipici che di DNA *fingerprinting*, effettuati su cellule mononucleate di sangue periferico, invece che di midollo osseo, stimulate con fitoemoagglutinina (PHA), hanno dato ragione della apparente contraddittorietà di questi risultati: dopo un certo periodo dal trapianto le due popolazioni cellulari, quella midollare (linfociti B e cellule mieloidi) e quella del sangue periferico (linfociti T), della bambina erano diventate molto diverse, cioè la prima costituita principalmente da cellule endogene e l'altra mista. In particolare i granulociti sono risultati di origine endogena (in accordo con i risultati ottenuti sul midollo) mentre le cellule mononucleate mostravano di derivare tanto dal ricevente che dal donatore.

Un risultato interessante è stato che le valutazioni di queste due componenti effettuate, una con il DNA *fingerprinting* e l'altra con lo studio delle mitosi PHA, sono risultate considerevolmente diverse: la proporzione, tra le metafasi indotte con PHA, di quelle con cromosoma Y, cioè la stima della componente donatore, è risultata molto più elevata della stima di questa stessa componente ottenuta invece con il DNA *fingerprinting* e questo divario era proprio quello che ci si aspettava tenendo conto che il DNA *fingerprinting* valuta queste due componenti *sul totale* delle cellule, mentre i conteggi delle mitosi di origine esogena (XY) ed endogena (XX) riguardano solo la *sottopopolazione* delle cellule che sono entrate in mitosi dopo stimolazione con la PHA, che erano necessariamente quasi tutte

derivate dal donatore perché le cellule della paziente erano pochissimo stimolabili dalla PHA.

Espressione genica

L'espressione genica è studiata come *differential displays of cDNAs* sotto forma di RNA fingerprints ottenuti in genere con la RAP, che è una RNA AP-PCR (più esattamente: una AP-PCR effettuata su un insieme di famiglie di molecole di cDNA, ciascuna delle quali è derivata dalla trascrizione inversa dell'mRNA corrispondente).

Si tratta di tecniche semiquantitative il cui scopo è descrivere il fenotipo molecolare in esame in termini di RNA (più precisamente: in termini di «abbondanza relativa dei diversi tipi di mRNA») ed in varie condizioni sperimentali. Idealmente ci si propone di individuare il maggior numero possibile dei diversi tipi di mRNA presenti e di seguirne il comportamento, cioè la loro concentrazione relativa, in presenza di sostanze particolari come, per esempio, il *Transforming Growth Factor β* e la cicloesimide (cfr. Welsh *et al.*, 1995).

La tecnica più utilizzata a questo scopo è la RAP in cui entrambi i primer, cioè anche quello della trascrizione inversa sono arbitrari. Essa è descritta in dettaglio in un articolo già citato di Perucho *et al.* (1995) che tratta della AP-PCR.

La valutazione dell'abbondanza relativa dei vari tipi di molecole evidenziate con questa tecnica è ancora più difficile che con la AP-PCR perché in questo caso ai fattori che possono influenzare l'intensità relativa delle varie bande, anzi perfino la loro presenza od assenza (stabilità della interazione tra primer e stampo, facilità con cui una data sequenza può essere amplificata [eventuali strutture secondarie], etc.), fattori che sono rilevanti anche per la semplice AP-PCR, si aggiunge l'ampissimo spettro delle abbondanze relative iniziali dei vari mRNA. Ciò porta ad una particolare fonte di errore, denominata *C₀t effect* (termine usato negli anni '70 in esperimenti di valutazione del numero di copie per genoma di un determinato gene), dovuta al fatto che un DNA diventato molto abbondante nel corso dell'amplificazione (e questo è ciò che capita ai DNA derivati da mRNA molto abbondanti) tende a competere con il primer corrispondente nel suo *binding*, per cui il fattore di amplificazione per ciclo, che all'inizio della PCR è in genere prossimo a 2, dopo molti cicli di amplificazione si abbassa, non solo per le cause comuni a tutti gli altri DNA (riduzione della attività della Taq polimerasi, accumulo di inibitori come il pirofosfato, diminuzione dei dNTP, etc.), ma anche per la reibridizzazione del DNA. L'effetto finale di questo fenomeno per cui, superato un certo numero di cicli di PCR, si continuano ad amplificare solo, o quasi, i DNA derivati da mRNA poco abbondanti è, evidentemente una sovrastima sempre più accentuata della abbondanza relativa di questi ultimi.

Mathieu-Daudé *et al.* (1996) concludono l'analisi di questo fenomeno indicando due possibili opzioni. Quale delle due scegliere dipende dal tipo di informazioni che si desidera ottenere: se con la RAP si vogliono identificare gli mRNA indipendentemente dalla loro abbondanza relativa, conviene effettuare molti cicli di PCR; se invece si è interessati alle loro abbondanze relative, è necessario ridurre al minimo indispensabile il numero di questi cicli (sia pure con il rischio di non scoprire affatto gli mRNA pochissimo rappresentati).

Welsh *et al.* (1995) nel lavoro già più volte citato passano in rassegna i principali campi di applicazione dell'RNA fingerprinting che vanno dallo sviluppo prenatale e neonatale del cervello all'ematologia dei tumori agli effetti di molecole regolatrici proteiche e non proteiche, etc.

Diversità genetica

Il DNA fingerprinting è stato utilizzato in genetica delle popolazioni umane (cfr. ad esempio: «Use of DNA fingerprinting for human population genetic studies»: Kalnin *et al.*, 1995); per valutare il grado di diversificazione genetica in specie a rischio di estinzione («DNA fingerprinting in captive populations of the endangered Siberian crane [*Grus leucogeranus*]»: Tokarskaya *et al.*, 1995) ed in popolazioni partenogenetiche («Extreme clonal uniformity of *Phoxinus phoxinus* gynogens [Pisces: Cyprinidae] among variable habitats in northern Minnesota beaver ponds»: Elder e Schlosser, 1995). Quest'ultimo lavoro descrive un risultato inatteso e molto interessante: mentre di regola si è trovato un quadro di variazione clonale relativamente elevata anche all'interno di specie partenogenetiche di vertebrati, ben 464 individui di questa specie hanno mostrato lo stesso identico DNA fingerprint.

Altre applicazioni

Sono state così numerose e disparate che è possibile citarne solo alcune e scelte in modo del tutto arbitrario.

Epplen *et al.* (1995) hanno pubblicato una rassegna delle prospettive (perché è ancora prematuro parlare di risultati) di un approccio sistematico con profili di DNA al problema della diagnosi e della caratterizzazione genetica delle malattie poligeniche. Lo stesso gruppo ha proposto un approccio basato sull'utilizzazione del DNA fingerprinting per l'identificazione nei topi di un'eventuale componente genetica di un carattere del comportamento, la *aggressività indotta dall'isolamento* («Congenic AB mice: a novel means for studying the [molecular] genetics of aggression»: Schneider-Stock ed Epplen, 1995).

Il confronto tra i DNA fingerprint di due gemelle, di cui una con la sindrome di Turner, ha portato alla dimostrazione che erano gemelle MZ (malgrado la discordanza per il numero di cromosomi X). Ciò ha permesso di ottenere informazioni sull'effetto isolato (dato che le due gemelle erano geneticamente identiche) dell'anomalia X:0 sul comportamento e sullo sviluppo neuroanatomico («The effects of X monosomy on brain development: monozygotic twins discordant for Turner's syndrome»: Reiss *et al.*, 1993).

Tra le applicazioni principali va ricordata anche la ricerca di mutazioni, ma per questo argomento si rimanda al *di-deossifingerprinting* che è illustrato alle coll. **2418-2419 di questa voce.

Bibliografia

- Aihara T. *et al.*, *Gastroenterology*, 1996, **111**, 455-461.
- Alland D., Kalkut G. E. *et al.*, *New Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1710-1716.
- Armes J. E., Angus P. *et al.*, *Cancer*, 1994, **74**, 2436-2441.
- Belli A. A., Miles M. A. *et al.*, *Parasitology*, 1994, **109**, 435-442.
- Benoit P., *Carcinogenesis*, 1996, **17**, 1221-1225.
- Blaszyk H. *et al.*, *Biotechniques*, 1995, **18**, 256-260.
- Bocker T., Shlegel J. *et al.*, *J. Pathol.*, 1996, **179**, 15-19.
- Camarena J. J., Nogueira J. M. *et al.*, *Sex Transm. Dis.*, 1995, **22**, 128-136.
- Davin-Regli A., Saux P. *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 1996, **44**, 89-98.
- Devlin B., Neil Risch *et al.*, *Science*, 1993, **259**, 748-749 e 837.
- Elder J. F., Schlosser I. J., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, **92**, 5001-5005.
- Epplen J. T., Buitkamp J. *et al.*, *Gene*, 1995, **159**, 49-55.
- Fox S. A. *et al.*, *J. Virological Meth.*, 1995, **53**, 1-9.
- Grundman H., Schneider C. *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 1995, **43**, 446-451.
- Hojo S., Fujita J. *et al.*, *Kansenshogaku Zasshi*, 1995, **69**, 1272-1277.
- Housman D. E., *New Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 534-535.
- Hovig E., Mullaart E. *et al.*, *Genomics*, 1993, **17**, 66-75.
- Jeffreys A. J., Royle N. J. *et al.*, *DNA fingerprinting: approaches and applications*, a cura di Burke T., Dolf G., Jeffreys A. J. e Wolff R., 1991, Birkhauser Verlag, Basel.

- Kalnina V. V., Kalnina O. V. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1995, **247**, 488-493.
 King S. A., Wilson S. J. et al., *Exp. Cell Res.*, 1995, **217**, 100-108.
 Krawczak M., Böhm I. et al., *Forensic Sci. Internat.*, 1993, **59**, 101-117.
 Lander E. S., Budowle B., *Nature*, 1994, **371**, 735-738.
 Lau Y. L., Kwong Y. L. et al., *Bone marrow transplantation*, 1995, **15**, 971-976.
 Lockhart S. R., Fritch J. J. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 1501-1509.
 Luffey M., Della Latta P. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, **153**, 837-840.
 Majumder P. P., *Electrophoresis*, 1995, **16**, 1684-1688.
 Mathieu-Daudé F., Welsh J. et al., *Nucleic Acid Res.*, 1996, **24**, 2080-2086.
 Matsiota-Bernard P., Thierry D. et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1994, **9**, 23-27.
 Meunier J. R., Grimont P. A. D., *Res. Microbiol.*, 1993, **144**, 373-379.
 Österlund A., Engstrand L., *Scand. J. Infect. Dis.*, 1995, **27**, 119-121.
 Peruchio M., Welsh J. et al., *Methods in Enzymol.*, 1995, **254**, 275-290. Academic Press, New York.
 Reiss A. L., Freund L. et al., *Ann. Neurol.*, 1993, **34**, 95-107.
 Sarkar G. et al., *Genomics*, 1992, **13**, 441-443.
 Saunders N. A., *J. Hosp. Infection*, 1995, **29**, 169-176.
 Schneider-Stock R., Epplen J. T., *Behav. Genet.*, 1995, **25**, 475-482.
 Sheu Jin-Chuan et al., *Gastroenterology*, 1993, **105**, 1471-1476.
 Strachan T., Read A. P., *Genetica umana molecolare*, 1997, UTET, Torino.
 Taylor N. S., Fox J. G. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 918-923.
 Tokarskaya O. N., Petrosyan V. G. et al., *Electrophoresis*, 1995, **16**, 1766-1770.
 van Soelingen D., De Haas P. E. W. et al., *Methods in Enzymology*, 1994, **235**, 196-205. Academic Press, New York.
 Versalovic J., Kapur V. et al., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1995, **119**, 23-29.
 Vos P., Hogers R. et al., *Nucleic Acid Res.*, 1995, **23**, 4407-4414.
 Warren R., Hauman J. et al., *South Afr. Med. J.*, 1996, **86**, 45-49.
 Welsh J., Rampino N. et al., *Mutat. Res.*, 1995, **338**, 215-229.
 Woodburn M. A., Yousten A. A. et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, **45**, 212-217.
 Xia H. X., Windle H. J. et al., *Gut*, 1995, **37**, 341-34.

GUIDO MODIANO

GENETICA MEDICA E UMANA [v. GENETICA MEDICA, Agg. I, coll. *3338-3361; GENETICA MEDICA E UMANA, Agg. II, coll. **2433-2471; GENETICA UMANA, vol. VI, 2395-2432]

QUADRO SISTEMATICO

(Si consulti anche l'Indice Sistematico della Genetica del volume INDICI [pp. 113-116] e il quadro sistematico della voce GENETICA**)

ARGOMENTI

RIMANDI

Voci di inquadramento

GENETICA MEDICA* (*3338-3361); GENETICA MEDICA E UMANA** (**2433-2471) e questo stesso quadro sistematico; GENETICA UMANA (VI, 2395-2432) e relativo quadro sistematico

Parte generale

CARIOTIPO (III, 1088-1095); CITOGENETICA (IV, 2377-2380); v. anche GENETICA*, citogenetica (*3323-3338); CONSULENZA GENETICA** (**1381-1393); CROMOSOMA (VI, 1578-1598); CROMOSOMA* (*1947-1960); EREDITA' (VI, 9-15); GENETICA MEDICA*, reverse genetics (*3346-3357); GENOMA UMANO** (**2477-2485); IDENTIFICAZIONE (VIII, 1118-1144); IDENTIFICAZIONI* (*3580-3585); v. anche INGEGNERIA GENETICA*

ARGOMENTI

RIMANDI

CA* (*3819-3821); PATERNITA', RICERCA DELLA (XI, 1305-1327); PATERNITA', RICERCA DELLA* (*5717-5740); PCR* (*5740-5746); PCR**; POLIMORFISMI GENETICI (XII, 234-247); SONDE MOLECOLARI* (*6738-6800); SONDE MOLECOLARI**; PATERNITA', RICERCA DELLA (XI, 1305-1327); PATERNITA', RICERCA DELLA* (*5717-5740); PERINATALE PATOLOGIA, screening perinatale (XI, 1644-1655); POLIMORFISMI GENETICI (XII, 234-247); POLIMORFISMI GENETICI* (*5947-5956); PREDIETTIVA MEDICINA* (*6046-6050); PRENATALE DIAGNOSI (XII, 996-1002); PRENATALE DIAGNOSI* (*6054-5062); PRENATALE DIAGNOSI**; SCREENING* (*6529-6540); SONDE MOLECOLARI* (*6138-6200); SONDE MOLECOLARI**; TERAPIA GENICA* (*6979-6993); TERAPIA GENICA**; VILI CORIALI (XV, 2038-2044)

ANTIONCOGENI** (**460-474); ANTISENTO OLIGONUCLEOTIDI*, terapia antisenso (**498-506); CROMATINA SESSUALE (IV, 1534-1542); GEMELLI (VI, 2289-2312); v. anche GRAVIDANZA (VII, 884-888); GENETICA MEDICA*, reverse genetics e tumori ereditabili (*3353-3357); HLA (VII, 1022-1040); HLA* (*3550-3563); HLA** (**2607-2623); IMMUNITA' (VII, 1421-1424); IMMUNOGENETICA (VII, 1536-1537); IMMUNOGLOBULINE (VII, 1537-1558); IMMUNOGLOBULINE* (*3650-3667); INTELLIGENZA (VII, 2100-2104); INTESTINO TENUE E CRASSO*, genetica dei tumori (**2827-2828); ISTOCOMPATIBILITA' (VIII, 749-766); ISTOCOMPATIBILITA'* (*4209-4220); MAMMELLA*, genetica dei tumori (**3532-3536); MEIOSI (IX, 723-738); METASTASI* (*5040-5041); METASTASI** (**3650-3657); MITOSI (IX, 1802-1818); NUCLEICI ACIDI*, terapia anti-gene (**4067-4084); ONCOGENI E PROTONCOGENI** (**4184-4202); OVAIO*, genetica dei tumori (**4288-4289); POLIMONE*, genetica dei tumori; P53 GENE E PROTEINA*; RIPRODUZIONE (XIII, 1515-1522); SANGUIGNI GRUPPI (XIII, 1961-2022); SESSO E SESSUALITA' (XIV, 2-41) e relativo quadro sistematico; SESSO E SESSUALITA', geneti-

ARGOMENTI

RIMANDI

ca e determinazione del sesso (*6605-6610); SESSUALI CROMOSOMI** TRAPIANTI (XV, 232-245); TRAPIANTI* (*7200-7208) e relativo quadro sistematico; TUMORI*, *geni tumore-soppressori* (*7367-7369); *alterazioni cromosomiche e cancro* (*7371-7372); TUMORI*, *genetica nell'etiologia dei tumori*; v. anche GENETICA MEDICA E UMANA**, *genetica molecolare dei tumori* (**2450-2456)

Aggiornamento e/o inserimento di nuove malattie genetiche nei volumi dell'Aggiornamento I e dell'Aggiornamento II

(Per le altre malattie genetiche trattate nei voll. I-XV, cfr. *Quadro sistematico della voce GENETICA UMANA*, VI, coll. 2395-2396)

ACONDROPLASIA* (*53-58); ACONDROPLASIA** (*43-51); ADENOSINA*, *sindrome da deficit di ADA* (*109-110); ADRENOGENITALE SINDROME* (*127-129); ALCAPTONURIA* (*180-181); ALCAPTONURIA** (*142-143); ALPERS, MALATTIA DI** (*241-243); ALPORT, SINDROME DI* (*240-244); ALPORT, SINDROME DI** (*243-245); AMINOACIDURIE* (*283-286); ANGELMAN, SINDROME DI** (*320-321); ATASSIA EPISODICA** (*656-658); ATASSIA SPINO-FRIBEL-LARI** (*658-666); AVED** (*688-690); BARTH, SINDROME DI** (*712-714); BARDET-BIFDL, SINDROME DI** (*711-712); BECKWITZ, SINDROME DI** (*715-718); BLOOM, SINDROME DI* (*1083-1084); BURKITT, LINFOMA DI* (*1170-1172; v. anche LINFOMI**); CADASIL** (*821-824); CANAVAN, MORBO DI** (*852-854); CELIACHIA** (*1007-1014); CHIRATODERMIE CONGENITE PALMOPLANTARI** (*1062-1073); CISTINOSI** (*1219-1220); CISTINURIA** (*1221-1223); COREE* (*1864-1867); COREE** (*1396-1402); CRANIOSINOSTOSICHE SINDROMI** (*1414-1426); CRASH, SINDROME** (*1426-1427); DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI* (*2236-2245); DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI** (*1730-1649); DOWN, SINDROME DI** (*2285-2297); ... (*2830-2846); ... (*1833); ...

ARGOMENTI

RIMANDI

(*2604-2611); EPATOLINTICOLARE DEGENERAZIONE* (*2842-2843); EPATOLINTICOLARE DEGENERAZIONE** (*2032-2034); FANCONI, MALATTIA DI* (*2965-2968); FARRER, MALATTIA DI* (*2968-2969); GALATTOSEMIA* (*3285-3287); GANGLIOSIDOSI** (*2369-2375); GAUCHER, MALATTIA DI** (*2375-2378); GENODERMATOSI* (*3371-3377); GLICOGENOSI** (*2502-2522); HOLT-ORAM, SINDROME DI** (*2623-2626); IMMUNODEFICIENZE* (*3630-3634); IMMUNODEFICIENZE** (*2661-2673); IPERIKPIESSIA EREDITARIA** (*2860-2862); IPERILIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE* (*3954-3965); IPERILIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE** (*2862-2870); ITTIOSI** (*2990-3008); KNEIST, DISPLASIA DI* (*4250-4251); LEBER, MALATTIA DI* (*4495-4496); LEBER, MALATTIA DI** (*3122-3124); LESCH-NYHAN, SINDROME DI* (*4511-4513); LI-FRAUMENI, SINDROME DI* (*4619-4620); LINDAU, MALATTIA DI* (*4620); LISOSOMALI MALATTIE* (*4700-4703); MACHADO-JOSEPH, MALATTIA DI** (*3469-3471); MARFAN, SINDROME DI* (*4860); MARFAN, SINDROME DI** (*3562-3573); MIOCARDIOPATIE* (*5165-5179); v. anche MUSCOLO* (*5271-5272); MIOCARDIOPATIE** (*3708-3713); MITOCONDRI*, *malattie mitocondriali* (*5188-5196); MITOCONDRI**, *patologia* (*3727-3734); MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE E ENCEFALOMIOPATIE** (*1734-3751); MUCOPOLISACCARIDOSI** (*3836-3840); MUCOVISCIDOSI* (*5222-5237); MUCOVISCIDOSI** (*3840-3856); NEFROBLASTOMA* (*5283-5299); NEFROBLASTOMA** (*3887-3889); NEUROBLASTOMA* (*5375-5388); NEUROBLASTOMA** (*4010-4014); NOONAN, SINDROME DI** (*4056-4058); NORRIS, MALATTIA DI** (*4058-4059); ODORE DI PESCE, SINDROME DELL'** (*4147-4148); PARAPLEGIA SPANTICA FAMILIARE**, PORFIRIE**, PRADER-WILLI, SINDROME DI**, PSEUDOXANTOMA ELASTICO* (*6198-6200); Q T LUNGO, SINDROME DI*

ARGOMENTI

RIMANDI

(*6237-6244). Q-T LUNGO, SINDROME DI**; RETINA*, *genetica del retinoblastoma* (*6396-6397); RETINA*, *retinopatia pigmentosa* (*6398); RETINOBLASTOMA**; RETT, MORBO DI**; SCHINDLER, MALATTIA DI**; SHINGOLIPICOSI* (*6221-6222); SIMPSON-GOLABI-BEHMEL, SINDROME DI**; SMITH-LEMLI-OPITZ, SINDROME DI**; SONNO*, *insonnia familiare letale* (*6800-6802); SURRENALI GHIAIOLITE*, *adrenoleucodistrofia* (*6896-6900); TALASSEMI*, TRINUCLEOTIDI INSTABILI, PATOLOGIA DA**; TURCOI, SINDROME DI**; USHER, MALATTIA DI**; VAN BUCHHEM, MALATTIA DI* (*7496); WAARDENBURG, SINDROME DI**; WAGR, SINDROME**; WHIPPLE, MORBO DI* (*7597-7598); WILLIAMS, SINDROME DI* (*7598-7600); WILLIAMS, SINDROME DI**; WOLFRAM, SINDROME DI**; WOLF-HIRSCHHORN, SINDROME DI**; XERODERMA PIGMENTOSO**; X FRAGILE, SINDROME DELL'* (*7605-7613); X FRAGILE, SINDROME DELL'**; XYXY SINDROME**

SOMMARIO GENERALE

CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE EREDITARIE NELL'UOMO	col. 2437
GENETICA MOLECOLARE DEI TUMORI	col. 2450
DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE MALATTIE GENETICHE	col. 2457

CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE EREDITARIE NELL'UOMO

SOMMARIO

Introduzione (col. 2437). - **Disordini cromosomici** (col. 2438): *Anomalie numeriche*. - *Anomalie strutturali*. - *Imprinting*. - **Ereditarietà delle malattie autosomiche dominanti** (col. 2445). - **Ereditarietà delle malattie autosomiche recessive** (col. 2446). - **Ereditarietà delle malattie legate al cromosoma X** (col. 2447). - **Malattie multifattoriali** (col. 2448). - **Ereditarietà materna** (col. 2449).

Introduzione

Lo studio dei disordini ad etiologia genetica che colpiscono la specie umana, effettuato sia mediante l'analisi genetica formale che attraverso le più recenti tecniche di genetica molecolare (v. sotto, col. **2457), ha permesso nell'ultimo decennio notevoli progressi nella individuazione delle loro cause molecolari. Per molte di tali malattie si è resa così possibile la messa a punto di validi test diagnostici per l'analisi prenatale (v. PRENATALE DIAGNOSI [v.; v.*; v.**]) e presintomatica, premessa indispensabile ad una inequivoca predizione genetica.

Più in generale, anche laddove non si conosca il gene responsabile di una data malattia ereditaria, è sufficiente identificarne il modo di trasmissione per poter predire con quale probabilità quel dato carattere si ripresenterà nella progenie di determinati genitori e dunque per poterne stimare il rischio di ricorrenza, indispensabile per la consulenza genetica (v.**).

A monte di tutto ciò deve esserci tuttavia una chiara distinzione fra i diversi tipi di mutazioni che possono causare una malattia genetica, ed è a tale scopo che in questa sede proponiamo una classificazione di base delle malattie ereditarie nell'uomo, in aggiunta ad una sommaria descrizione di ciascun tipo di mutazione così identificato.

Come riportato in tab. I, la prima distinzione che si rende necessaria riguarda le malattie «nucleari», causate da anomalie al DNA nucleare o genomico, e le malattie «mitocondriali», causate da anomalie al DNA mitocondriale. Esse differiscono principalmente per il tipo di trasmissione che è «mendeliana» per le prime e cosiddetta «materna» per le seconde.

Tra le anomalie del DNA nucleare si distinguono le malattie cromosomiche da quelle geniche. Nelle *malattie cromosomiche* si hanno anomalie del cariotipo in termini di numero di cromosomi, di struttura dei cromosomi di origine paterna o materna oppure per entrambi i cromosomi di una data coppia di omologhi (*imprinting*). Al contrario nelle *malattie geniche* si ha la presenza di una o più mutazioni che, modificando la struttura fine di uno o più geni, causano l'insorgenza del corrispondente fenotipo malattia.

Si parla in particolare di *malattie geniche multifattoriali* o *poligeniche* quando più geni e/o le interazioni che essi stabiliscono con determinati fattori ambientali sono coinvolti nella loro insorgenza. Per questo motivo i modelli di trasmissione delle malattie poligeniche sono più complessi di quelli delle malattie causate da mutazioni a geni singoli (*malattie monofattoriali*). Quest'ultime si classificano a loro volta a seconda che la mutazione si trovi in un gene localizzato su un cromosoma autosomico (dal cromosoma 1 al cromosoma 22) o sul cromosoma X.

Infine è necessario distinguere tra *malattie dominanti*, in cui è sufficiente una copia mutata del corrispondente gene perché si manifesti il fenotipo malattia, e *malattie recessive*, in cui entrambe le copie del corrispondente gene, ciascuna localizzata in uno dei due omologhi del cromosoma interessato, devono essere mutate affinché si manifesti il fenotipo malattia.

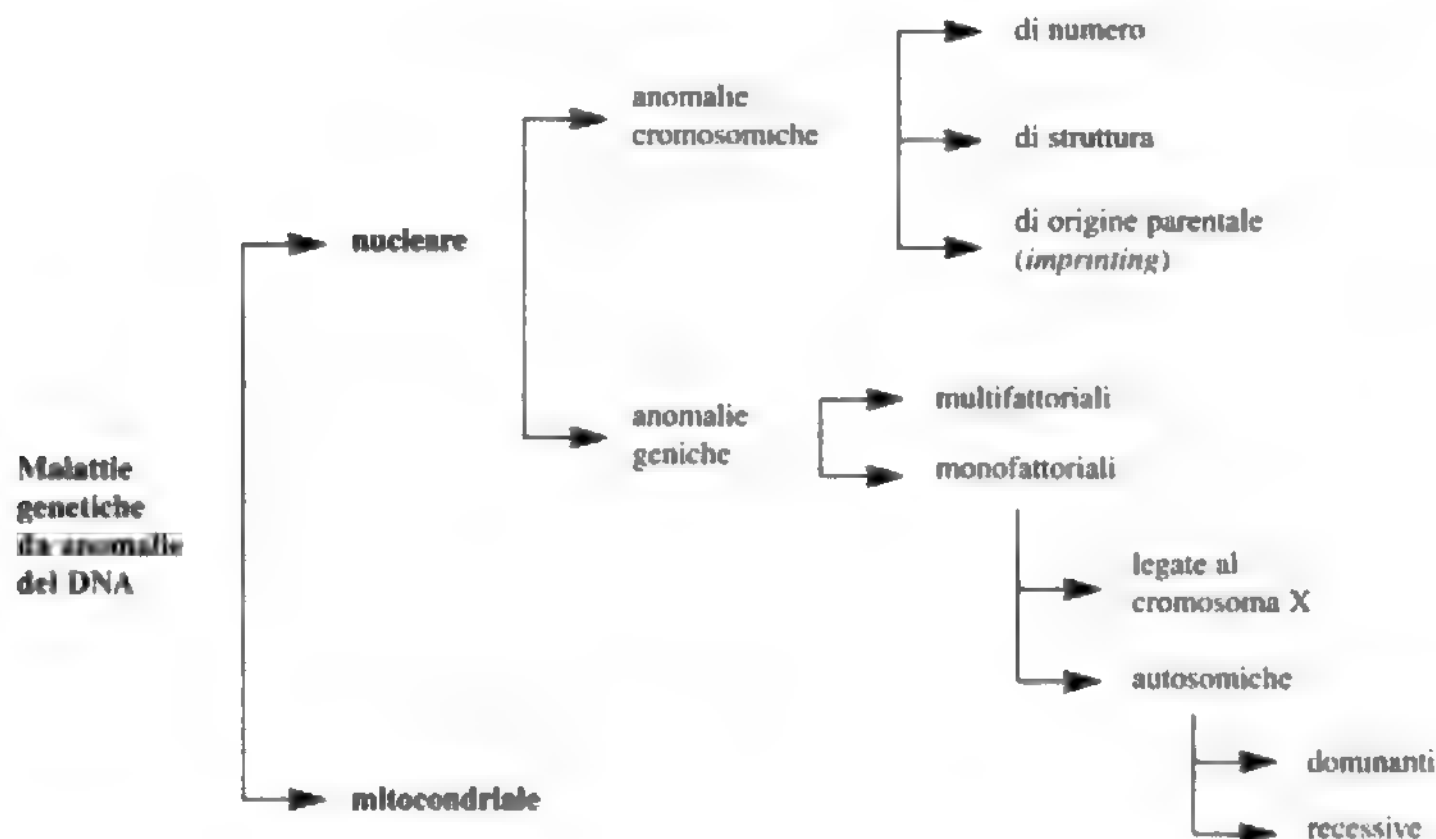
Segue una breve trattazione di ciascun tipo di malattia fin qui elencato, corredata da esempi per la cui dettagliata descrizione si rimanda alle corrispondenti voci dell'opera.

Disordini cromosomici

Il normale assetto cromosomico (o cariotipo [v.]; v. anche GENETICA*, *citogenetica*) della specie umana è costituito da 46 cromosomi, ossia da 22 coppie di cromosomi autosomici (omologhi) e da una coppia di cromosomi sessuali (XX oppure XY). Qualsiasi sua anomalia è riconducibile ad uno dei seguenti tipi di disordini cromosomici (v. CROMOSOMA): quelli in cui è alterato il numero dei cromosomi (*anomalie numeriche*) e quelli in cui è mutata la normale morfologia di uno o più cromosomi (*anomalie strutturali*). In entrambi i casi le conseguenze per l'individuo variano in base al cromosoma coinvolto e all'entità della variazione nel contenuto del DNA: maggiore è la quantità di DNA coinvolta nel riarrangiamento, maggiore risulterà il danno a livello fenotipico. Raramente quindi si riscontrano anomalie cromosomiche di grossa entità tra i nati vivi, mentre tali sbilanciamenti sono osservati più di

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE EREDITARIE

(Modificata da Romeo e Devoto, *Dal DNA alle malattie ereditarie*, 1993, Ambrosiana, Milano)



frequente negli aborti che spontaneamente avvengono nei primi mesi di gestazione.

Anomalie numeriche

Si distinguono in questo gruppo le poliploidie e le aneuploidie.

Con *poliploidia* si intende la presenza di un multiplo intero (superiore a due) di un assetto cromosomico aploide normale. Poiché nell'uomo quest'ultimo è costituito da 23 cromosomi, si possono in teoria osservare triploidie (corrispondenti alla presenza di 69 cromosomi), tetraploidie (corrispondenti alla presenza di 92 cromosomi), etc. Nell'uomo tuttavia le poliploidie sono sempre letali e solo in pochissimi casi la triploidia viene riscontrata nel nato vivo.

Con il termine *aneuploidia* si definisce un assetto cromosomico in cui il numero di cromosomi varia di un'unità in

più o in meno rispetto al normale. Si parla così di trisomia (v.*) quando il cariotipo dell'individuo mostra un cromosoma sovranumerario, ossia 47 cromosomi come ad esempio nella trisomia 21 (47,XX,+21 oppure 47,XY,+21), e di monosomia quando l'individuo ha 45 cromosomi, come ad es. nella sindrome di Turner, caratterizzata dalla presenza di un solo cromosoma sessuale, il cromosoma X. Le aneuploidie hanno una frequenza maggiore delle poliploidie e nella popolazione si riscontrano principalmente trisomie, originate per non-disgiunzione dei cromosomi metafasici sia durante la meiosi che nelle mitosi successive alla formazione dello zigote. Le monosomie hanno effetti fenotipici più gravi delle trisomie e non si ritrovano praticamente mai monosomie degli autosomi neanche tra gli aborti precoci.

La tab. II riassume le principali anomalie cromosomiche di numero riscontrate più frequentemente tra i nati vivi.

TAB. II. PRINCIPALI ANOMALIE CROMOSOMICHE DI NUMERO RISCONTRATE PIÙ FREQUENTEMENTE TRA I NATI VIVI

(Modificata da Romeo e Devoto, *Dal DNA alle malattie ereditarie*, 1993, Ambrosiana, Milano)

Cariotipo	Fenotipo	Frequenza approssimativa
45,X0	sindrome di Turner	1/2500 femmine
47,XXX	possibile oligofrenia ed anomalie della funzione ovarica	1/1000 femmine
47,XYY	sindrome di Klinefelter	1/700 maschi
47,XXXXY	variante della sindrome di Klinefelter	1/2500 maschi
47,XYY	per struttura ed occasionali anomalie comportamentali	1/800 maschi
47,+21	sindrome di Down	1/700
47,+18	sindrome di Edwards	1/5000
47,+13	sindrome di Patau	1/15000

Anomalie strutturali

In questo gruppo sono compresi tutti quei riarrangiamenti in cui la successione delle bande (e quindi dei geni) su uno o più cromosomi è cambiata oppure in cui la quantità globale di materiale genetico della cellula è diversa dal normale. Nel primo caso il cambiamento della struttura dei cromosomi viene detto bilanciato, mentre nel secondo caso è sbilanciato.

L'anomalia cromosomica può inoltre interessare un solo cromosoma o più cromosomi. Nel primo caso si possono osservare i seguenti tipi di aberrazioni strutturali (fig. 1, A):

1) *inversioni* in cui il segmento compreso tra due rotture all'interno dello stesso cromosoma subisce una rotazione di 180°. Si parla di inversioni pericentriche o paracentriche a seconda che il segmento invertito includa o non includa il centromero;

2) *delezioni*, causate da perdita terminale o interstiziale di un segmento di cromosoma, e dunque caratterizzate da monosomia parziale;

3) *uplicazioni* di segmenti cromosomici caratterizzate da trisomia parziale;

4) *cromosomi ad anello* in cui si ha circolarizzazione del cromosoma a seguito della perdita delle sue porzioni distali;

5) *isocromosomi* o cromosomi simmetrici formati da due braccia uguali, sia corte che lunghe.

Quando il riarrangiamento interessa due o più cromosomi si possono osservare inserzioni o traslocazioni (fig. 1, B). Nelle inserzioni si ha l'introduzione di un segmento cromosomico all'interno di un secondo cromosoma mentre nelle traslocazioni si ha scambio reciproco di segmenti tra cromosomi. Si hanno infine le traslocazioni Robertsoniane in cui due cromosomi acrocentrici (appartenenti quindi ai gruppi D o G) si uniscono per il centromero dopo aver perso il braccio corto. Sebbene in quest'ultimo caso il cariotipo risulti sbilanciato non si osserva alcun effetto fenotipico data la presenza sulle braccia corte dei cromosomi acrocentrici di solo DNA codificante per RNA ribosomiale (DNA ridondante).

È interessante osservare che la presenza dei riarrangiamenti strutturali descritti sebbene non predisponga ad alcun effetto fenotipico ha come conseguenza la perdita totale o parziale della fertilità, causata da anomalie nell'appaiamento e migrazione degli omologhi interessati dal riarrangiamento durante la meiosi. In conseguenza a tali anomalie si possono infatti generare gameti con frammenti cromosomici od interi cromosomi sia mancanti che sovrannumerari, e dunque zigoti non vitali in quanto portatori di

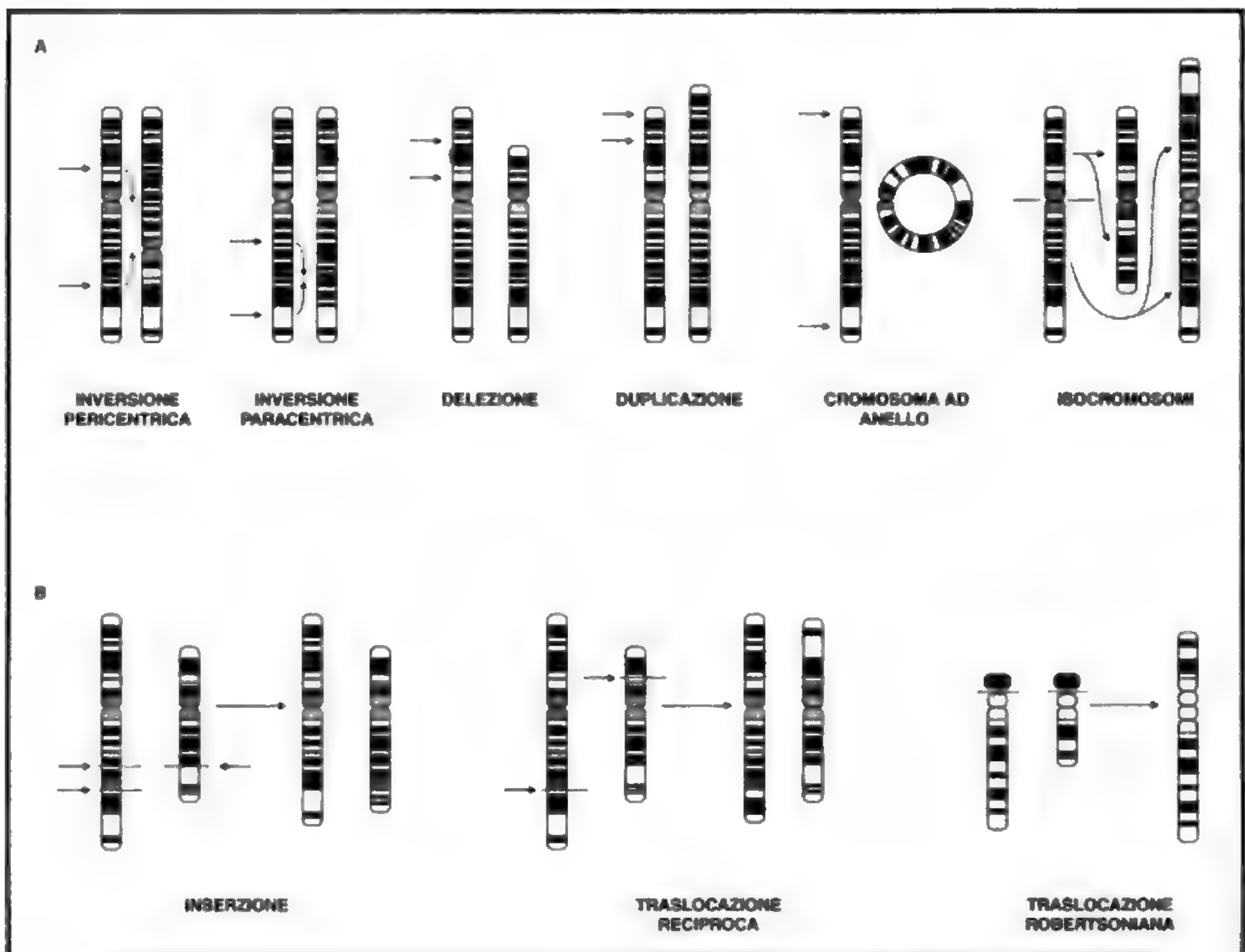


Fig. 1. Rappresentazione schematica delle più frequenti anomalie cromosomiche strutturali: quelle coinvolgenti un solo cromosoma (A) si distinguono da quelle coinvolgenti due cromosomi (B), come descritto nel testo. (Da Romeo e Devoto, 1993, modificata).

gravi sbilanciamenti. Per una più dettagliata descrizione delle conseguenze delle anomalie strutturali durante la gametogenesi si rimanda ai testi suggeriti in bibliografia.

Imprinting

Con questo termine si indica una modificazione del materiale genetico, necessaria alla sua successiva espressione differenziale, che avviene presumibilmente nelle prime fasi dello sviluppo embrionale e nella quale singole cellule esprimono l'allele paterno o quello materno, ma non entrambi. Non si conoscono ancora i dettagli molecolari di tale modificazione.

Numerose osservazioni hanno confermato l'esistenza di questo fenomeno sia nell'uomo che nel topo. Tra le più significative si ricordano i risultati di esperimenti di trapianto di pronuclei che hanno dimostrato come embrioni con patrimonio genetico diploide o interamente paterno (androgenici) o interamente materno (partenogenici) si sviluppino in modo diverso: i primi hanno un normale sviluppo della placenta ma non dell'embrione mentre per i secondi si verifica la situazione opposta. Si è così concluso che i due patrimoni aploidi paterno e materno sono entrambi necessari e complementari, contribuendo evidentemente in modo differente allo sviluppo dell'embrione e della placenta. Analoga dimostrazione risulta dall'osservazione del fenotipo associato ad alcune disomie uniparentali (entrambi i cromosomi di una data coppia derivano dallo stesso genitore mentre l'altro genitore non fornisce alcun cromosoma di quel tipo) o alle triploidie umane. In ag-

giunta alle specifiche malformazioni fetali, i triploidi dian- drici (due cromosomi di origine paterna ed uno di origine materna) ad esempio mostrano solitamente iperplasia del trofoblasto mentre nelle triploidie diageniche (due cromosomi di origine materna ed uno di origine paterna) si osserva solitamente una placenta fortemente sottosviluppata.

La dimostrazione più evidente del fenomeno dell'*imprinting* è tuttavia fornita dalla particolare espressione fenotipica di alcune alterazioni cromosomiche. Tra tutte ricorderemo il caso delle sindromi di Prader-Willi e di Angelman (v. PRADER-WILLI, SINDROME DI [v.; v.**]; ANGELMAN, SINDROME DI [v.**]), entrambe caratterizzate nella maggior parte dei casi da delezioni della regione 15q11-13. Tali delezioni, non sempre visibili citogeneticamente e comunque dimostrabili mediante uso di marcatori polimorfici del DNA, sono risultate quasi esclusivamente a carico del cromosoma 15 paterno nella sindrome di Prader-Willi e di quello materno nella sindrome di Angelman. Come riportato in fig. 2, nella sindrome di Prader-Willi è stata inoltre osservata disomia uniparentale materna del cromosoma 15 (sia isodisomia, ossia presenza di due copie dello stesso cromosoma materno, che eterodisomia, ossia presenza dei due cromosomi omologhi materni), mentre nella sindrome di Angelman è stato osservato almeno un caso di eterodisomia paterna. Come riportato in fig. 2, queste osservazioni possono essere ricondotte alla presenza nel segmento deletato di geni diversi, ciascuno responsabile per una delle due sindromi, ma non si può escludere che le differenze fenotipiche siano il risultato della diversa espressione di uno stesso gene.

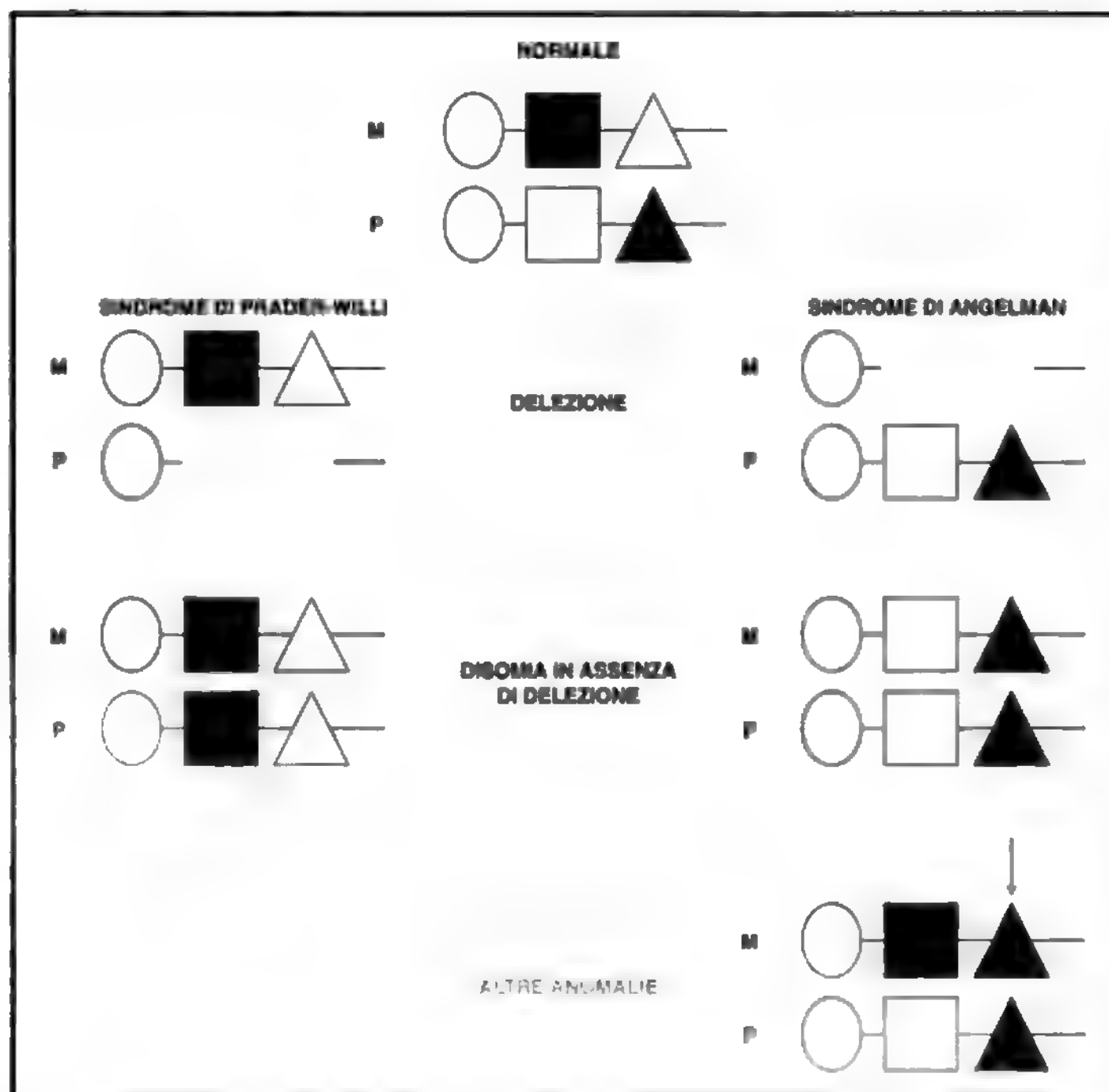
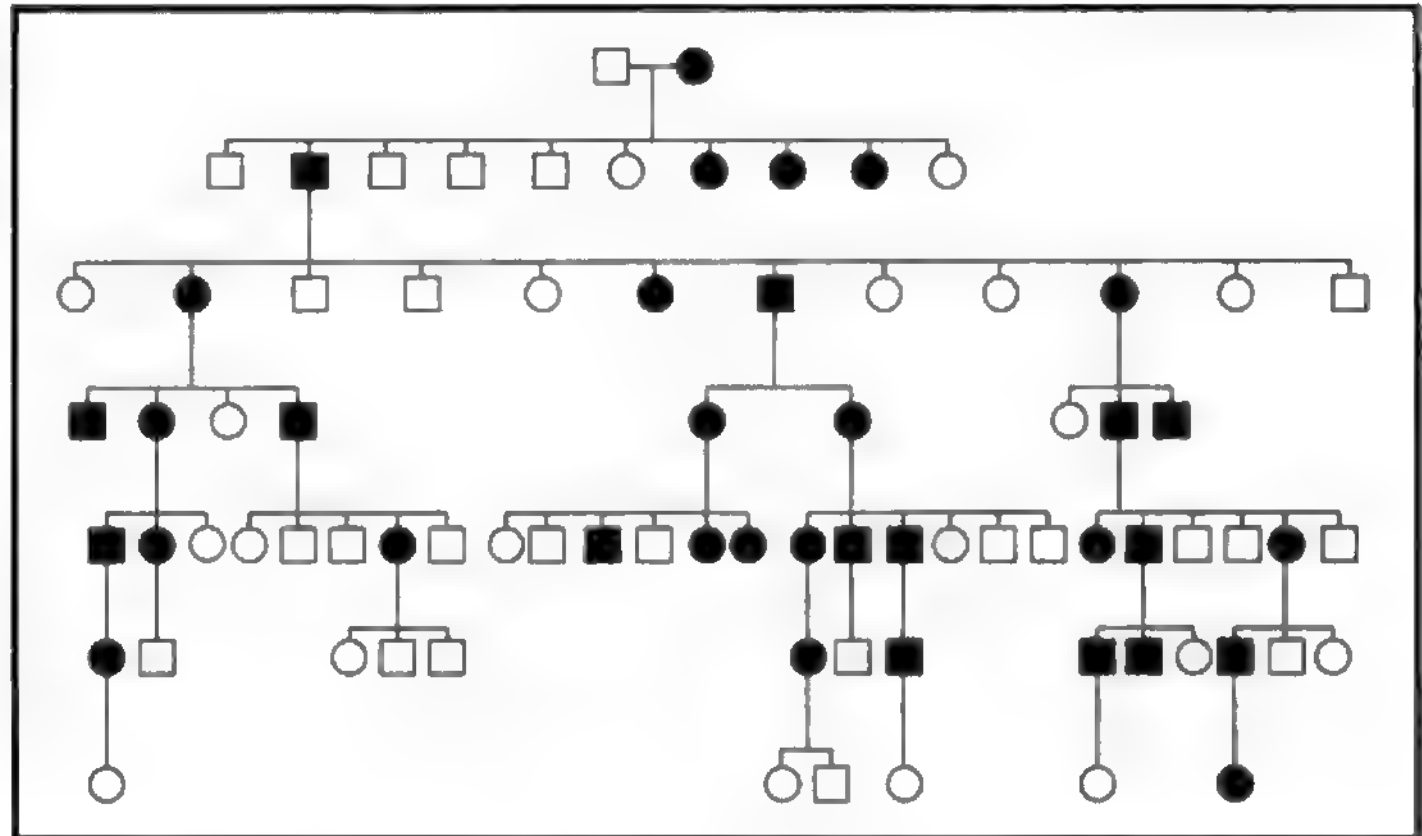


Fig. 2. L'*imprinting* spiega come le attività complementari di geni di origine paterna e materna possono dare origine a due sindromi diverse come la Prader-Willi (PWS) e l'Angelman (AS), spesso dovute a delezioni cromosomiche del tutto identiche. In base al modello più probabile i geni PWS e AS sono contigui, o comunque molto vicini sul braccio lungo del cromosoma 15. Normalmente il gene AS attivo (triangoli chiari) è quello di origine materna (M) mentre il gene PWS attivo (quadrati chiari) è quello di origine paterna (P). Al contrario dunque i geni AS di origine paterna e PWS di origine materna sono normalmente disattivi (rispettivamente triangoli e quadrati neri). Ogni volta che una qualsiasi anomalia cromosomica o subcromosomica (delezioni o disomie uniparentali) provoca la perdita dell'allele AS di origine materna e dell'allele PWS di origine paterna si ha rispettivamente lo sviluppo della sindrome di Angelman e della sindrome di Prader-Willi. È infine riportato il caso, osservato solo raramente, di riarrangiamenti intragenici o mutazioni inattivanti l'allele AS di origine materna. (Da Romeo e Devoto, 1993).

Fig. 3. Albero genealogico caratterizzato da ricorrenza di brachidattilia, un carattere autosomico dominante. Quadrati: maschi; cerchi: femmine; simboli chiari: normali; simboli neri: affetti. (Da Romeo e Devoto, 1993).



Un'altra importante osservazione a favore dell'*imprinting* riguarda l'espressione genica dipendente dal verso dell'incrocio. Esempi nell'uomo sono quelli della distrofia miotonica (v. *MIOTONICHE SINDROMI***) e della corea di Huntington (v. *COREE [v.; v.*; v.**]*): nella prima esiste una forma congenita esclusivamente trasmessa da madri affette, mentre nella seconda si osserva anticipazione nell'insorgenza dei sintomi solo in alcuni casi di trasmissione paterna.

Ereditarietà delle malattie autosomiche dominanti

Quando un carattere autosomico dominante è raro, come è nel caso di una malattia ereditaria, si ha ragione di ritenere che ogni individuo affetto sia un eterozigote per il gene in questione. Inoltre, sulla base dei rapporti di segregazione dettati dalla genetica «mendeliana» e come da albero genealogico riportato a titolo di esempio in fig. 3, ci attendiamo che:

- 1) il carattere venga trasmesso verticalmente da genitore affetto a figlio affetto;
- 2) i due sessi siano affetti in proporzioni uguali;
- 3) circa il 50% dei figli nati da genitori di cui uno affetto manifestino la stessa malattia;
- 4) la malattia sia trasmessa ugualmente dai maschi affetti e dalle femmine affette ai loro figli maschi e femmine.

In generale, quando favoriscono lo sviluppo di patologie gravi, i caratteri autosomici dominanti si manifestano solo durante o dopo l'età della riproduzione, ed è questo il motivo per cui alberi genealogici relativi ad alcune condizioni altamente invalidanti, quali ad esempio la corea di Huntington, presentano numerosi soggetti affetti.

Un altro fenomeno riscontrato occasionalmente nei caratteri dominanti è la penetranza incompleta, ove per penetranza si intende la percentuale degli eterozigoti che manifestano il fenotipo corrispondente all'allele dominante. In questi casi la trasmissione del carattere sembra saltare una generazione in corrispondenza di individui che, avendo qualche figlio affetto, devono essere eterozigoti (portatori obbligati) ma risultano fenotipicamente normali.

Inoltre anche quando il gene si manifesta in tutti gli eterozigoti (penetranza completa) il «grado di manifestazione» può essere diverso, variando da un quadro clinico completo a pochi sintomi talvolta difficilmente riconducibili al fenotipo malattia corrispondente. Si parla in questi casi di «espressività variabile».

Infine è interessante sottolineare come, esistendo esempi in genetica umana quali la teleangectasia emorragica ereditaria, l'acondroplasia, la sindrome di Ehlers-Danlos, l'epitelioma adenoido cistico etc., di una maggiore gravità fenotipica dell'omozigote rispetto all'eterozigote per condizioni definite dominanti, la definizione mendeliana di «dominante» (eterozigote simile all'omozigote) male si adatta a tali malattie che dunque dovrebbero essere più precisamente definite come *dominanti intermedie o parziali*.

Ereditarietà delle malattie autosomiche recessive

L'ereditarietà è definita recessiva quando l'eterozigote non differisce fenotipicamente dall'omozigote normale, mentre gli individui che manifestano il carattere o la malattia recessiva sono omozigoti per il gene corrispondente. Al contrario dell'eredità dominante, in cui quasi tutti gli incroci sono del tipo «eterozigote × omozigote normale», la maggioranza degli incroci osservati nelle malattie autosomiche recessive coinvolgono eterozigoti fenotipicamente normali, ossia portatori che rappresentano la «riserva» del gene-malattia nella popolazione (*carico genetico della popolazione*).

Sulla base di queste considerazioni, da un incrocio fra portatori di una malattia recessiva ci si attende che:

- 1) i genitori stessi ed i loro consanguinei non manifestino la malattia;
- 2) circa 1/4 della progenie nata da tale incrocio presenti la malattia indipendentemente dal sesso;
- 3) la frequenza dei matrimoni consanguinei fra i genitori che hanno figli affetti da una malattia autosomica recessiva sia più alta di quella che si riscontra nella popolazione generale, ossia tanto più alta quanto più la malattia è rara.

Tuttavia, come documentato dall'albero genealogico riportato a scopo esemplificativo in fig. 4, in cui ricorre una mutazione che determina una forma autosomica recessiva di albinismo, nel caso di caratteri autosomici recessivi non associati a fenotipi invalidanti è frequente osservare nella popolazione incroci tra «affetti» (ossia individui che manifestano il carattere recessivo) e normali oppure tra affetti e portatori. Nel primo caso tutta la progenie di tale incrocio sarà costituita da portatori fenotipicamente normali mentre

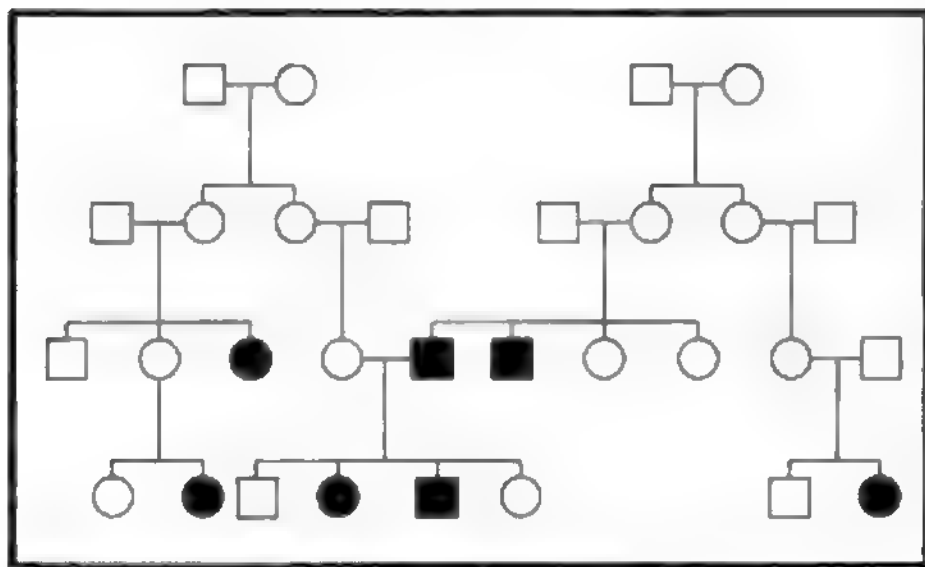


Fig. 4. Albero genealogico caratterizzato da ricorrenza di una forma autosomica recessiva di albinismo. Per la descrizione della simbologia cfr. legenda alla fig. 3. (Da Romeo e Devoto, 1993).

nel secondo il 50% della progenie sarà «affetto» e l'altro 50% «normale».

Infine ci si attende che tutti i figli nati da genitori entrambi affetti da un carattere o da una malattia rari siano anch'essi affetti dalla stessa anomalia. Alcuni matrimoni tra albinici hanno tuttavia prodotto figli con pigmentazione normale, a riprova del fatto che i genitori devono essere omozigoti per mutazioni diverse per l'albinismo e che nei figli ciascuno dei due difetti è complementato dal corrispondente gene normale ereditato dall'altro genitore. Pertanto nell'uomo deve esistere più di un *locus* responsabile per un identico fenotipo albino, per il quale dunque si parla di *eterogeneità genetica*.

Ereditarietà delle malattie legate al cromosoma X

Le caratteristiche principali dell'ereditarietà legata al cromosoma X possono essere facilmente derivate dalla modalità della determinazione del sesso e, in accordo con lo schema riportato in fig. 5, riassunte come segue nel caso di ereditarietà recessiva:

- 1) i maschi sono più frequentemente, o quasi esclusivamente affetti per certe rare malattie legate all'X;
- 2) tutte le loro figlie saranno fenotipicamente sane ma genotipicamente eterozigoti e dunque portatrici;
- 3) se non è avvenuta nessuna nuova mutazione e per-

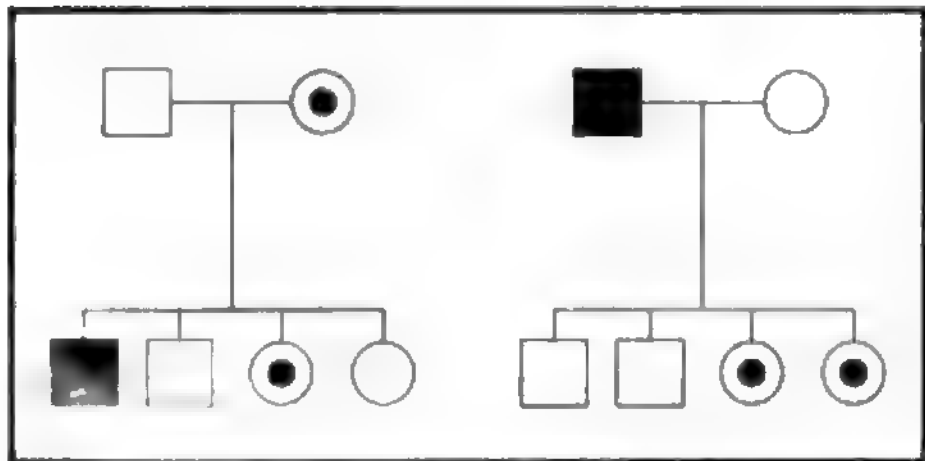


Fig. 5. Gli alberi genealogici riportati descrivono due dei possibili modi in cui può manifestarsi solitamente (a sinistra) o meno di frequente (a destra) l'ereditarietà recessiva legata al cromosoma X all'interno di un nucleo familiare. Simboli neri: affetti; cerchi con cerchietto nero: portatori; cerchi con cerchietto bianco: non portatori. (Da Romeo e Devoto, 1993).

tanto la madre del maschio affetto è eterozigote, allora metà delle sue sorelle sono portatrici eterozigoti;

4) tra i figli delle donne eterozigoti ci sarà un rapporto di 1:1 tra affetti e non affetti.

Fra le malattie recessive legate all'X, l'emofilia (v.; v.*; v.***) è senz'altro quella da più tempo nota in medicina. Sebbene siano famosi per questa anomalia alcuni vasti alberi genealogici come quello dei discendenti della regina Vittoria nelle case reali europee, in pratica quello che si ha occasione di osservare è costituito spesso da una sola fratria con fratelli affetti, o il paziente è anche il solo affetto in una famiglia per il resto sana. Questa situazione è dovuta alla ridotta capacità riproduttiva dei pazienti che porta alla eliminazione della maggior parte dei geni emofilici in una o in poche generazioni, dopo che sono stati prodotti per nuova mutazione. Ovviamente quasi tutti i pazienti emofilici sono maschi essendo molto improbabile osservare una femmina affetta, ossia omozigote per la mutazione che causa emofilia. Se infatti la probabilità di trovare un maschio affetto in una popolazione in equilibrio è uguale alla frequenza (q) con cui è distribuito nella stessa il cromosoma X che porta la mutazione, la probabilità di trovare una femmina omozigote (cioè portatrice di due cromosomi X mutati) sarà pari al quadrato della frequenza (q^2) di un singolo cromosoma X mutato.

Infine, una qualsiasi mutazione legata al cromosoma X si distribuisce nella popolazione per 2/3 nelle femmine, quasi sempre eterozigoti, e per 1/3 nei maschi, emizigoti e dunque affetti. Se tale mutazione è geneticamente letale, ossia in pratica incompatibile con la riproduzione, allora ad ogni generazione un terzo dei cromosomi X che portano la mutazione andrà perso e ciò porterebbe velocemente alla scomparsa della malattia corrispondente nella popolazione. Poiché invece anche queste malattie mantengono una frequenza costante da una generazione all'altra si conclude che in questi casi la frequenza di nuove mutazioni deve essere pari ad 1/3 della frequenza dello stesso gene mutato nella popolazione.

V. anche SESSUALI CROMOSOMI**; GENOMA UMANO**.

Malattie multifattoriali

Le malattie multifattoriali o poligeniche costituiscono un gruppo di malattie ereditarie caratterizzate da una notevole eterogeneità di cause genetiche che soltanto in minima parte cominciano ad essere identificate. Sono esempi di malattie poligeniche il labbro leporino, l'aterosclerosi, la lussazione congenita dell'anca, il diabete mellito, la stenosi ipertrofica del piloro, etc.

Per la comprensione della maggior parte di queste malattie al momento è solo possibile adottare modelli teorici che prevedono il concorso di più fattori, sia ambientali che ereditari, nell'insorgenza della malattia. Uno dei modelli che meglio sembra adattarsi ai rapporti di segregazione osservati per molte malattie poligeniche è il cosiddetto *multifattoriale a soglia*, basato sull'ipotesi che ognuna di queste malattie origini da una predisposizione ereditaria combinata con fattori ambientali sfavorevoli. Questi ultimi potrebbero agire sia nella vita fetale che dopo la nascita. Questo modello presuppone l'esistenza di un numero relativamente elevato di geni sfavorevoli, sebbene non necessariamente patologici, distribuiti a caso nella popolazione; quando si trovano in combinazione essi danno luogo ad un rischio (*effetto soglia*) per quell'individuo il cui patrimonio genetico comprende tutti o quasi tutti questi geni.

Poiché abbiamo supposto che un buon numero di geni indipendenti possono concorrere a determinare tale rischio, la loro distribuzione nella popolazione sarà approssimativamente simile a quella di una curva normale: la maggior

GENETICA MOLECOLARE DEI TUMORI

SOMMARIO

Introduzione (col. 2450). - **Instabilità genetica e predisposizione ereditaria allo sviluppo dei tumori** (col. 2450): *Instabilità di brevi frequenze ripetute in tandem (microsatelliti): il caso dei tumori colon-rettali*. - **Ruolo del controllo della progressione cellulare** (col. 2454).

Introduzione

Il miglioramento delle tecniche investigative, nonché la produzione e la comparazione di considerevoli quantità di dati, hanno permesso alla Genetica Medica di ottenere negli ultimi anni incoraggianti progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dello sviluppo e della trasmissione di numerose malattie ereditarie. Tra i settori nei quali l'incremento di conoscenze è stato più cospicuo vi è la genetica molecolare dei tumori.

Il cancro è essenzialmente una malattia genetica che si differenzia dalla maggioranza dei disordini ereditari per la presenza di un'ampia proporzione di casi sporadici, dovuti all'insorgere di difetti genetici (*mutazioni*) nelle cellule somatiche, rispetto ai casi familiari, in cui ricorrono *mutazioni nella linea germinale*.

Lo sviluppo di un tumore si compie a seguito dell'accumulo di un dato numero, variabile a seconda del tipo cellulare che si considera, di mutazioni che insorgono in una data sequenza nella progenie di una singola cellula. In particolare, in accordo con la teoria dell'evoluzione clonale dei tumori, schematicamente riportata in fig. 6, tale cellula progenitrice del tumore va incontro ad una mutazione che gli permette di dividersi in condizioni che normalmente bloccano la replicazione cellulare. La sua progenie sarà dunque costituita da cellule che porteranno lo stesso difetto genetico e manifesteranno la stessa crescita non programmata. Più tardi può accadere che una di queste cellule vada incontro ad un'altra mutazione che aumenta ulteriormente la sua abilità ad evitare la normale regolazione. Anche questa mutazione, come la prima, viene trasmessa alle cellule figlie che saranno progressivamente sempre più numerose in rapporto alle cellule normali dato il loro vantaggio riproduttivo derivante dalla capacità di non sottostare ad alcuna regolazione. Dalla ripetizione di questo processo accade infine che in una cellula, in cui si sono accumulate tutte le mutazioni avvenute dall'inizio della trasformazione neoplastica, insorga un ulteriore difetto genetico che la renderà capace di metastatizzare e colonizzare altri organi (Cavenee e White, 1995).

In base alla teoria appena descritta, la predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori si definisce dunque come quella condizione in cui un particolare difetto genetico, ricorrente in un albero genealogico, determina una riduzione del numero di mutazioni somatiche richieste per il compimento del processo canceroso o un aumento della frequenza di mutazioni.

Finora si è molto studiato il ruolo degli oncogeni (v. ONCOGENI E PROTONCOGENI**) e dei soppressori tumorali (v. ANTIONCOGENI**) nello sviluppo sia dei tumori ereditari che di quelli sporadici. Più di recente si sono accumulate evidenze circa l'esistenza di una diversa categoria di tumori il cui sviluppo è principalmente dovuto ad *instabilità genetica*.

Instabilità genetica e predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori

Sia nei casi di predisposizione ereditaria, in cui la mutazione da cui parte lo sviluppo tumorale è presente in tutte le cellule in quanto facente parte del genoma dell'individuo, che in quelli sporadici, in cui è necessaria una mutazione

parte delle persone avrà un numero modesto di essi, alcuni non ne avranno quasi nessuno e alcuni li avranno quasi tutti, cioè abbastanza da far loro superare la soglia di rischio. A questo punto lo sviluppo del fenotipo-malattia dipenderà unicamente dalla possibile presenza di fattori ambientali sfavorevoli, ossia favorevoli l'insorgere della malattia. Dunque solo alcuni, forse una minoranza, degli individui con un numero elevato di geni sfavorevoli svilupperà la malattia corrispondente, ma tutti gli individui con la malattia avranno un numero elevato di tali geni.

Ereditarietà materna

I mitocondri contengono un genoma (mtDNA) che si replica autonomamente da quello nucleare e in cui sono stati identificati 22 geni per tRNA, 2 geni per RNA ribosomale e 13 geni codificanti per altrettanti polipeptidi, costituenti essenziali dei complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale.

Dato il maggior contributo extranucleare o citoplasmatico che i gameti femminili portano alla formazione dello zigote, il corredo cromosomico completo di mitocondri di tutte le cellule di ciascun individuo deriva dalla madre. Da ciò deriva la trasmissione unicamente materna, e a tutti i suoi figli, dei caratteri codificati dall'mtDNA.

Oltre all'ereditarietà strettamente *materna*, l'elevato numero di copie per cellula, l'alta frequenza di mutazioni spontanee e la localizzazione citoplasmatica sono le principali caratteristiche dell'mtDNA che ne spiegano il comportamento sostanzialmente diverso dal DNA nucleare.

Il genotipo mitocondriale di ogni cellula è costituito da migliaia di molecole di mtDNA, data la presenza di copie multiple di mtDNA per mitocondrio e quella di centinaia di mitocondri per cellula. Durante la divisione mitotica i mtDNA vengono trasmessi alle cellule figlie secondo una distribuzione non allelica e casuale da cui consegue, nelle generazioni cellulari successive, la presenza di proporzioni ampiamente variabili di diverse popolazioni di mtDNA nelle cellule parentali (*eteroplasmia*). A differenza del genotipo nucleare, che è trasmesso immodificato durante la mitosi, questa segregazione mitotica aumenta enormemente la variabilità del genotipo mitocondriale. Inoltre in condizioni di eteroplasmia un nuovo fenotipo si manifesta solo quando la proporzione del mtDNA che lo determina raggiunge un valore critico (*effetto soglia*).

Segregazione mitotica ed effetto soglia sono alla base dell'espressività variabile e della penetranza incompleta di caratteri codificati dai geni mitocondriali nella specie umana. Ne sono esempi (per la cui dettagliata descrizione si rimanda alle specifiche voci dell'opera) la Mioclonia-Epilessia con «Ragged-Red Fibers» (MERRF) e la Neuroretinopatia Ereditaria di Leber (LHON) (v. MITOCONDRI [v.; v.*; v.**]; MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**).

Bibliografia

- Curtoni E. S., Dallapiccola D., De Marchi M. et al., *Genetica*, 1997, UTET, Torino.
 Erbe R. W., *Medical Genetics*, in Dale D. C., Federman D. D. eds., *Medicine*, Scientific American, 1994, February, New York, pp. 1-54.
 Romeo G., Devoto M., *Dal DNA alle malattie ereditarie*, 1993, Ambrosiana, Milano.
 Scriver C. R., Beaudet A. L., Valle D. eds., *The metabolic and molecular bases of the inherited disease*, 7 ed., 1995, McGraw-Hill, New York.
 Strachan T., Read A. P., *Genetica Umana Molecolare*, 1997, UTET, Torino.
 Willadr H. F., *Human Genetics*, in Leber P., Clayton D. A., Rubenstein E., *Introduction to Molecular Medicine*, 1994, Scientific American, New York.

ISABELLA CECCHERINI, MARCELLA DEVOTO E GIOVANNI ROMEO

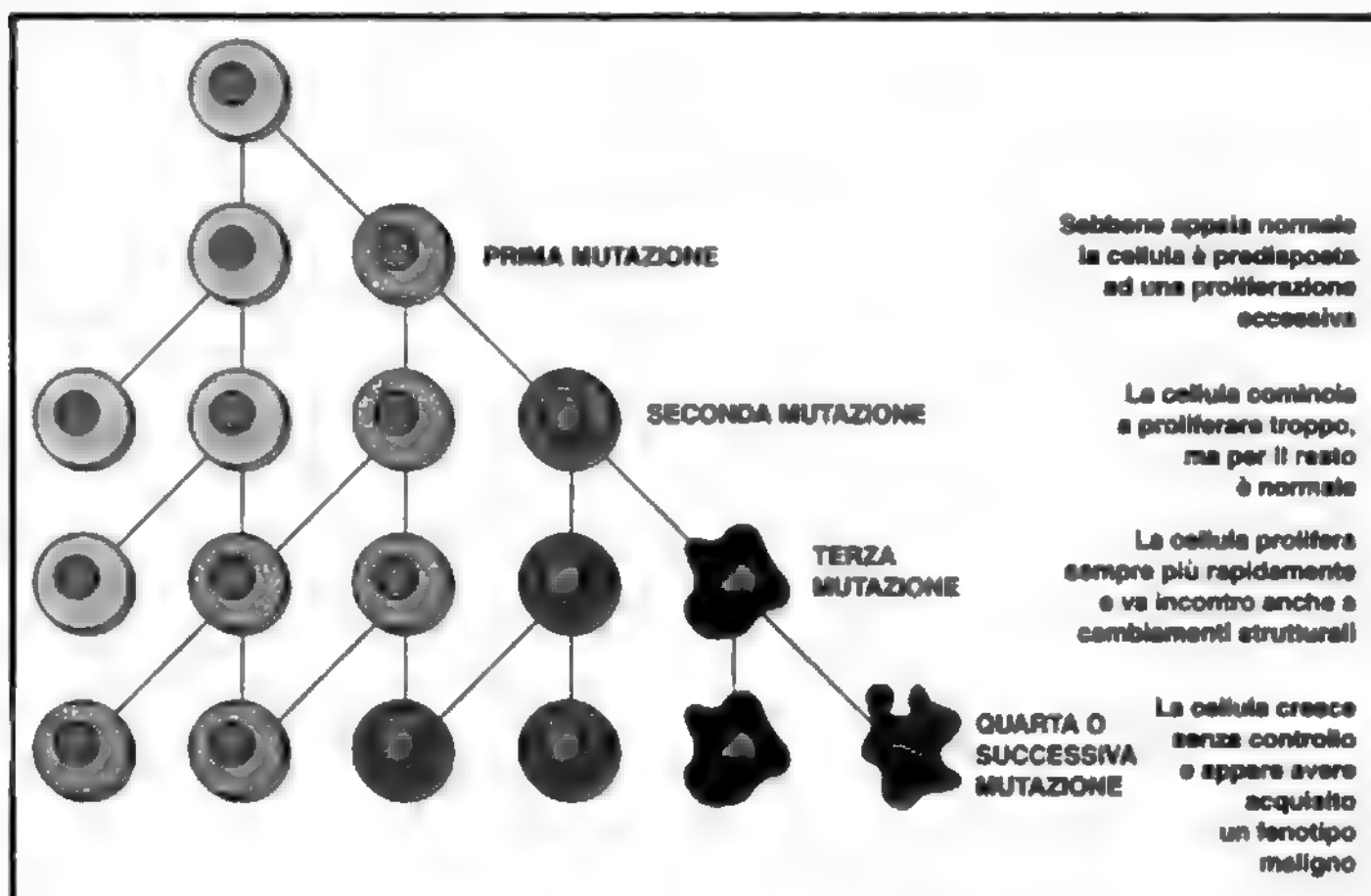


Fig. 6. La trasformazione di una cellula normale in cellula cancerosa avviene attraverso un processo noto come «evoluzione clonale». Dapprima una cellula figlia eredita o acquista una mutazione favorente la proliferazione e passa il difetto alla sua progenie e a tutte le generazioni future. Ad un certo punto una delle cellule discendenti acquista una seconda mutazione e più tardi una cellula appartenente alla discendenza di quest'ultima ne acquista una terza e così via. Alla fine alcune cellule avranno accumulato un numero tale di mutazioni specifiche da essere divenute maligne. (Da Cavenee e White, 1995, modificata).

somatica affinché il processo abbia inizio, l'insorgenza di mutazioni è facilitata dalla perdita di fedeltà nei processi che replicano, riparano e segregano il genoma durante il ciclo cellulare. L'alterazione di tali processi ha infatti come risultato l'instabilità genetica che, favorendo l'accumularsi di altre mutazioni provoca, in accordo con la teoria dell'espansione clonale dei tumori, una rapida evoluzione maligna delle cellule precancerose.

A conferma del ruolo cruciale che l'instabilità genetica svolge nel predisporre all'insorgenza di un tumore, si è osservato che:

a) portatori di mutazioni nei geni della riparazione del DNA di tipo *mismatch repair* ed *excision repair* sono predisposti allo sviluppo di tumori;

b) una serie di rare sindromi ereditarie quali anemia di Fanconi, sindrome di Bloom, sindrome di Werner e atassia teleangiectasia, oltre che da sensibilità ad agenti danneggianti il DNA e da una elevata frequenza di riarrangiamenti cromosomici, sono caratterizzate da predisposizione allo sviluppo di specifici tumori;

c) quando mutati, i geni che codificano componenti di controllo del ciclo cellulare aumentano l'instabilità genetica favorendo un'evoluzione cellulare in senso tumorale (Hartwell e Kastan, 1994).

Sia l'insorgenza di tumori sporadici che la predisposizione ereditaria allo sviluppo di specifici tumori sono dunque mediate da mutazioni in geni che normalmente garantiscono la stabilità genetica delle cellule del tessuto interessato, ossia in geni della riparazione del DNA, in geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, in geni operanti durante la replicazione del DNA, in geni codificanti componenti del fuso mitotico, etc.

L'identificazione di tali geni permetterà l'attuazione di protocolli idonei alla prevenzione ed al trattamento di tali tumori. Essa inoltre favorirà la comprensione dei meccanismi molecolari che, garantendo la stabilità del genoma, scongiurano un'evoluzione cellulare verso forme cancerose.

A scopo esemplare, nella pagina di seguito tratteremo il ruolo dell'instabilità genetica in alcuni casi di predisposizione ereditaria all'insorgenza di tumori nell'uomo.

Instabilità di brevi sequenze ripetute in tandem (microsatelliti): il caso dei tumori colon-rettali

Nei genomi eucariotici sono comunemente presenti sequenze ripetute. Esse variano nella lunghezza della unità di ripetizione, che può andare da poche unità ad alcune migliaia di paia di basi. Inoltre, ad ogni dato *locus* contenente una sequenza ripetuta esistono nella popolazione numerosi alleli, ciascuno caratterizzato da un diverso numero di ripetizioni in tandem. Tali sequenze di DNA ripetute sono anche dette microsatelliti e sono ampiamente usate per la tipizzazione genetica di individui, famiglie e popolazioni (v. GENOMA UMANO**).

In molti tipi di tumore è stata dimostrata la presenza di alleli di microsatelliti che non sono presenti nel DNA costitutivo (*germ-line*) dello stesso paziente. In totale l'8% di tutti i tumori esaminati mostrano questa anomalia che sembra dovuta ad un cambiamento nel numero di unità di ripetizione (Wooster *et al.*, 1994).

L'instabilità dei microsatelliti nel 13% dei tumori colon-rettali non poliposici (HNPCC dall'inglese *Hereditary Non Polyposis Colon Cancer*), sia familiari che sporadici finora esaminati, e la successiva stima di 100.000 mutazioni a questi *loci* polimorfici per cellula, suggeriscono che la predisposizione a HNPCC fosse associata ad una suscettibilità agli errori di replicazione (RER da *Replication Errors*). In particolare erano da tempo noti mutanti di lievito e di batteri caratterizzati da fenotipi «mutatori», ossia da instabilità genetica dovuta alla mancata correzione di errori introdotti nel genoma a seguito della replicazione. Fu dunque ipotizzato che anche nella specie umana le DNA-polimerasi potessero avere un alto livello di «scivoloni» o «slippage» su stampi contenenti semplici ripetizioni quali di-, tri- e tetra-nucleotidi, predisponenti a mutazioni *frame shift*, corrette poi dall'apparato di riparazione dei mancati appaiamenti (*mismatches*). Il gene HNPCC poteva dunque codificare per una proteina coinvolta nel garantire la corretta replicazione del DNA (cofattore della DNA-polimerasi o la DNA-polimerasi stessa) oppure coinvolta nella correzione dei *mismatches* (Jiricny, 1994).

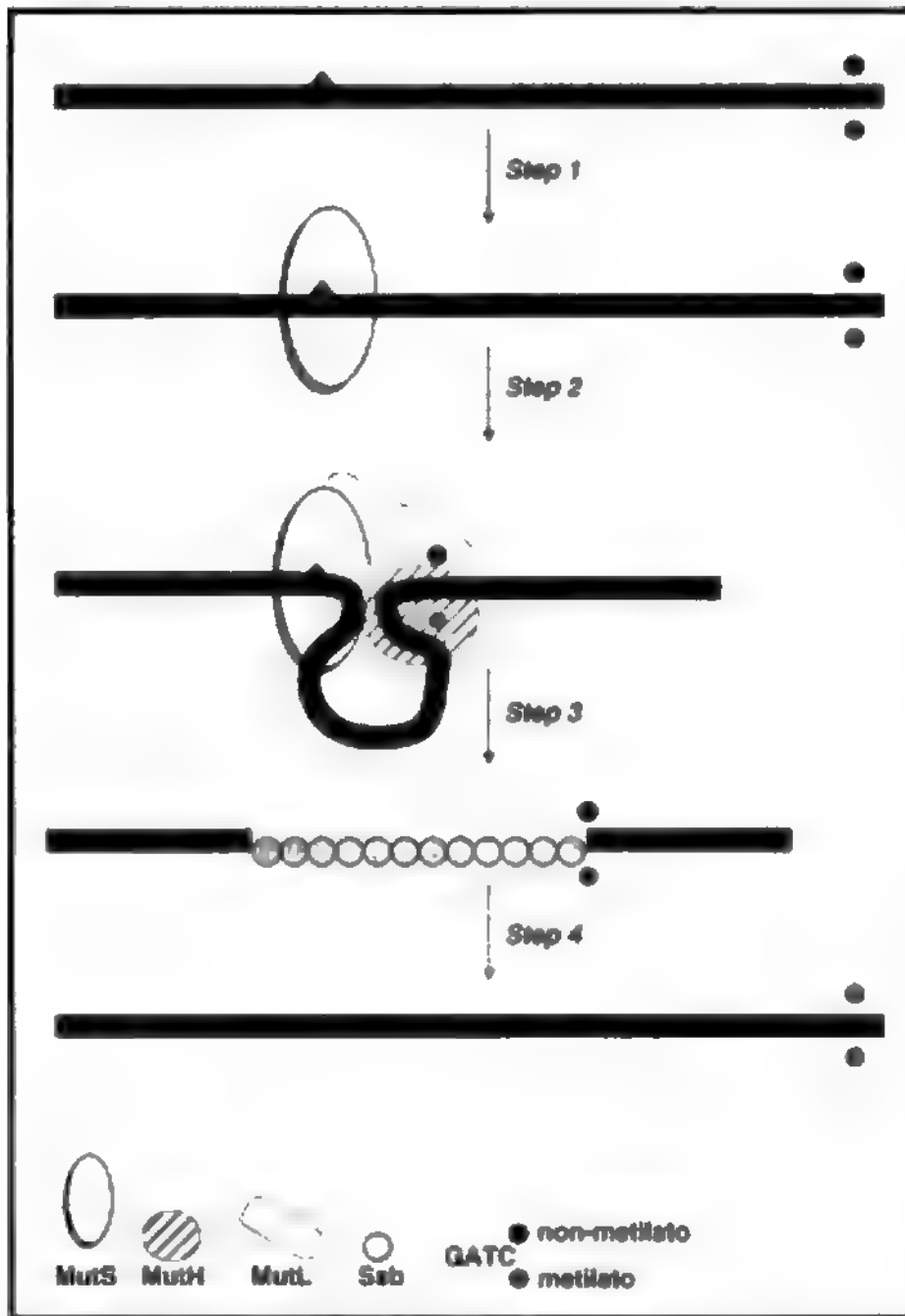


Fig. 7. Rappresentazione schematica del riparo dei mismatches in *E. coli*. Step 1: la proteina MutS riconosce il mancato appaiamento e vi si lega. Step 2: MutS recluta altri due polipeptidi, MutH (endonucleasi specifica per emielica non metilata) e MutL (stabilizza il complesso MutS e MutH). A questo punto si attiva l'attività endonucleasica di MutH che inizia l'escissione introducendo un taglio, al 5' di una palindroma GATC, nell'elica di nuova sintesi non ancora metilata. Da questo punto parte la degradazione dell'elica contenente la base non appaiata, mediata dalle esonucleasi ExoVII o ExoI a seconda che il taglio sia avvenuto rispettivamente al 5' o al 3' del mismatch. Step 3: la singola elica che rimane esposta è protetta dalla degradazione da specifiche proteine (Ssb da single-strand binding protein). Step 4: il gap è colmato dalla PolIII e chiuso dalla DNA ligasi. (Da Jiricny, 1994, modificata).

Grazie all'applicazione di un approccio di «reverse genetics» (v. GENETICA UMANA*) ad un dato numero di famiglie con ricorrenza di HNPCC, sono stati prima identificati almeno due loci (uno sul cromosoma 2 ed un altro sul cromosoma 3) cosegreganti con il fenotipo malattia e successivamente sono state individuate mutazioni germinali a ciascuno di quattro geni localizzati nelle porzioni cromosomiche suddette. In accordo con quanto ipotizzato, tali geni, identificati dalle sigle *MSH2*, *MLH1*, *PSM1* e *PSM2*, erano già noti quali omologhi umani di altrettanti geni di batteri o di lievito coinvolti nella riparazione dei mismatches del DNA, come mostrato in fig. 7 (Jiricny, 1994; Liu *et al.*, 1995); (v. anche INTESTINO TENUE E CRASSO**, col. **2833).

Mutazioni a questi geni sono risultate dunque responsabili di molti casi di suscettibilità ereditaria a tumori colon-rettali di tipo autosomico dominante. Ne consegue che l'eterozigotità per una mutazione ad uno qualunque dei suddetti quattro geni rappresenta un prerequisito per lo

sviluppo di un tumore colon-rettale, sebbene la variabilità nell'età di insorgenza (dall'adolescenza alla vecchiaia) suggerisce che una mutazione germinale non è sufficiente da sola per iniziare la cancerogenesi. Cellule eterozigoti da pazienti HNPCC non sono infatti deficienti nella riparazione dei mismatches, a conferma della necessità di un'altra alterata funzione dell'allele selvatico perché si produca una cellula con fenotipo RER. La recente dimostrazione della perdita di eterozigosi (LOH dall'inglese *Loss Of Heterozygosity*) nel tessuto tumorale al locus *MLH1*, indica che il meccanismo di iniziazione tumorale e/o progressione maligna in HNPCC (associato al gene *MLH1*) è compatibile con il modello detto dei *two hits* o dell'inattivazione di geni soppressori tumorali (o antioncogeni). È assai probabile che lo stesso avvenga agli altri tre loci (Hemminki *et al.*, 1994).

In conclusione, esiste un chiaro legame tra eterozigotità ad uno qualsiasi di quattro geni coinvolti nella riparazione degli appaiamenti errati del DNA e predisposizione a HNPCC. Tale legame è quello determinato dall'instabilità genetica che si crea per il non funzionamento o il mal funzionamento della riparazione del DNA che rende più probabile l'insorgenza di nuove mutazioni, predisponendo a trasformazione tumorale.

Tale fenomeno non è tuttavia ristretto ai soli tumori colon-rettali. Recenti evidenze indicano che una simile instabilità di microsatelliti è presente anche nei tumori della mammella, fegato, colon prossimale, stomaco, pancreas, cervice uterina ed ovaio. C'è dunque da attendersi il coinvolgimento anche in questi casi di geni che normalmente garantiscono la stabilità del genoma.

Uno degli studi tesi ad individuare questi altri possibili geni ha dimostrato varianti nucleotidiche della sequenza codificante il dominio ExoIII (3' → 5' esonucleasico) della DNA-polimerasi δ in linee cellulari derivanti da tumori colon-rettali caratterizzati da instabilità di microsatelliti. L'osservazione è in accordo con quanto già noto circa i fenotipi mutatori di *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* in cui mutazioni del dominio 3' → 5' esonucleasico (responsabile per la correzione degli eventuali errori appena introdotti dal dominio 5' → 3' sintetico) provocano un fenotipo RER, oltre a deficienza della riparazione dei mismatches e di conseguenza ad instabilità di microsatelliti. Questi ultimi effetti si spiegano assumendo che un difetto nell'attività di *proofreading* della DNA-polimerasi può portare all'accumulo di un numero tale di appaiamenti errati da provocare la saturazione dell'apparato di riparazione dei mismatches (da Costa *et al.*, 1995).

Ruolo del controllo della progressione cellulare

Il passaggio di cellule da uno stadio all'altro del ciclo cellulare è strettamente regolato da *checkpoints*, ossia da posizioni di controllo che assicurano l'ordine degli eventi nel ciclo cellulare, integrando la riparazione e la replicazione del DNA con le varie fasi della sua progressione. Tali *checkpoints* agiscono mediante la sintesi e la successiva degradazione di proteine denominate *cicline*. Inoltre una serie di reazioni di controllo (*feedbacks*) sia positive che negative contribuiscono a regolare la progressione del ciclo cellulare.

I controlli negativi, normalmente attivi per arrestare il ciclo durante il differenziamento, senescenza e morte cellulare programmata (apoptosi [v.**]), sono particolarmente importanti nel prevenire la cancerogenesi. L'arresto del ciclo infatti si può avere in circostanze in cui sia stata compromessa l'integrità del genoma, quali ad es. un danno cellulare successivo all'esposizione a mutageni chimici o fisici, ad inibitori della replicazione, ad inibitori del fuso

mitotico, etc.: il mancato arresto della proliferazione in questi casi rilascia cellule con genomi altamente instabili che possono evolvere in cellule cancerose. È per questo motivo che i tre componenti cellulari coinvolti nella trasmissione genetica (DNA, fibre e poli del fuso mitotico) sono sempre sotto stretta sorveglianza e che i relativi difetti risultano in forme di instabilità genetica quali riarrangiamenti cromosomici, aneuploidie e poliploidie, ossia anomalie che caratterizzano cellule precancerose e cancerose (Hartwell e Kastan, 1994).

Almeno due *checkpoints* sono in grado di rilevare eventuali danni al DNA, uno alla transizione G_1 -S e uno a quella G_2 -M.

A seguito di un danno al DNA aumentano i livelli della proteina p53 (v. ANTIONCOGENI**; P53 GENE E PROTEINA**) che in ultima analisi determina un arresto in G_1 oppure apoptosi. La perdita di questo controllo durante la transizione G_1 -S può portare a sopravvivenza inappropriata di cellule geneticamente danneggiate da cui consegue instabilità genetica ed un'evoluzione delle cellule verso la malignità. Ne è prova il fatto che la p53 è comunemente mutata in un'ampia varietà di tumori umani (Hartwell e Kastan, 1994; Marx, 1994).

Anche la transizione G_2 -M è suscettibile di blocco a seguito di un danno al DNA o in presenza di un DNA che non ha terminato la replicazione. Anche in questo caso esistono evidenze che difetti nella regolazione di questa transizione possono svolgere un ruolo nella cancerogenesi: a) cellule non neoplastiche da individui con predisposizione familiare al cancro mostrano una frequenza più alta della norma di rotture cromosomiche a seguito di irradiazione, espressione di un danno che arriva alla mitosi senza che sia stato riparato; b) infatti numerose linee cellulari derivate da tumori umani manifestano un ridotto ritardo in G_2 dopo danneggiamento del DNA; c) infine, un'espressione alterata di alcune cicline, tutte potenziali bersagli di *checkpoints* di controllo mitotico, è stata osservata in alcuni tumori umani (Hartwell e Kastan, 1994).

L'ataxia teleangiectasia (AT) è la sindrome umana (ampiamente trattata nella voce IMMUNODEFICIENZE [v. **]) che meglio di ogni altra fornisce prove alla relazione tra difetti nel controllo del ciclo cellulare, instabilità genetica e predisposizione al cancro. Si tratta di un disordine genetico a trasmissione autosomica recessiva caratterizzato da progressiva degenerazione del cervelletto, immunodeficienza, ritardo della crescita, invecchiamento precoce, instabilità cromosomica, sensibilità alle radiazioni ionizzanti e predisposizione allo sviluppo di tumori, specialmente linfocitici. Gli eterozigoti manifestano debolmente due delle caratteristiche della malattia: predisposizione all'insorgenza di tumori e radiosensibilità (Shiloh, 1995). Studi epidemiologici hanno infatti dimostrato che i portatori del gene *ATM* (dall'inglese *AT Mutated*) hanno una probabilità di 3-5 volte superiore di insorgenza di specifici tumori rispetto alla popolazione generale. In particolare il rischio relativo di cancro della mammella nelle portatrici AT è stato stimato essere 5,1 volte più alto di una popolazione di controllo. Lo stesso studio, effettuato da ricercatori americani, ha suggerito che nel loro paese l'8,8% delle donne affette da cancro al seno potrebbe essere portatore del gene *ATM* (Shiloh, 1995; Szabo e King, 1995).

Per quanto riguarda il fenotipo cellulare è da sottolineare una ipersensibilità delle cellule AT e, in misura minore, delle cellule in cultura derivanti da individui eterozigoti, alle radiazioni ionizzanti ed ai chimici radiomimetici. Inoltre le cellule AT difettano nei *checkpoints* del ciclo cellulare, normalmente attivi in fase G_1 , S e G_2 ed indotti, come descritto sopra, da un danno al DNA.

La presenza di un difetto della regolazione del ciclo cellulare è suggerita dalle seguenti osservazioni: a) cellule AT presentano una sintesi del DNA che è resistente alle radiazioni (RDS dall'inglese *Radio-resistant DNA Synthesis*), ossia sono caratterizzate da una riduzione nell'inibizione della sintesi semiconservativa del DNA che normalmente si instaura a seguito di irradiazione; b) cellule AT mancano dell'arresto in G_1 e del ritardo in G_2 , normalmente indotti da esposizione a radiazioni (Shiloh, 1995).

Come già riportato, l'arresto del ciclo cellulare indotto da radiazioni è mediato dall'azione della proteina p53 che, oltre a bloccare la progressione del ciclo cellulare, inibisce la sintesi del DNA ed attiva la sua riparazione. L'aumento dei livelli di p53, osservato di norma in cellule normali trattate con radiazioni ionizzanti, è ritardato in cellule AT. Cellule AT mostrano inoltre una maggiore quantità di apoptosi a seguito di esposizione a radiazioni ionizzanti o chimici radiomimetici. Dunque le cellule AT potrebbero avere una soglia più bassa per l'induzione di apoptosi da parte della p53 e la loro radiosensibilità potrebbe essere dovuta proprio all'induzione di apoptosi da parte di dosi normalmente non letali di radiazioni (Shiloh, 1995).

Queste osservazioni portarono all'ipotesi che il prodotto del gene *AT* poteva essere un componente della via di trasduzione del segnale generato da irradiazione, ossia da uno specifico danno al DNA, che prevede l'induzione di p53 e dunque l'attivazione sia dei *checkpoints* del ciclo cellulare che dei meccanismi di riparazione del DNA (Savitsky *et al.*, 1995).

Di recente il gene responsabile dell'AT è stato identificato e clonato. Esso comprende circa 200 kb contenenti un *open reading frame* (ORF) di 9168 nucleotidi (corrispondenti ad un prodotto proteico di 3056 aminoacidi). L'analisi della sequenza aminoacidica e la sua comparazione con le sequenze proteiche finora note ha permesso di inserire la proteina ATM tra i membri di una famiglia di proteine che condividono tutte la presenza di un dominio catalitico PI₃ (fosfatidil-inositolo) chinasi e sono coinvolte nel trattamento del danno al DNA, nel mantenimento della stabilità genomica e nel controllo appunto della progressione del ciclo cellulare (Savitsky *et al.*, 1995). È assai probabile che gli studi in corso sul ruolo della proteina ATM faranno luce su aspetti della regolazione del ciclo cellulare ancora non del tutto compresi (v. anche ANTIONCOGENI** coll. **470-471). Per l'azione dei geni *RB* e *p53* sul ciclo cellulare, v. ANTIONCOGENI** (coll. **463-465; figg. 3 e 4).

Per quanto concerne l'importanza della neovascolarizzazione per l'espansione dei tumori si rinvia alla voce ANGIOGENESI** (Folkman, 1993).

Per quanto concerne infine l'intervento delle telomerasi mediante i relativi geni (Cech in Nakamura *et al.*, 1997; Weinberg in Meyerson *et al.*, 1997) nel disattivare uno dei freni della moltiplicazione cellulare, si rinvia alle voci TUMORI** e TELOMERI E TELOMERASI**.

Bibliografia

- Bishop J. M., Weinberg R. A., *Molecular Oncology*, 1996, Scientific American, New York.
- Cavenee W. K., White R. L., *Scientific American*, March 1995, 50-57.
- da Costa L. T., Liu B., El-Deiry W. S. *et al.*, *Nature Genetics*, 1995, 9, 10-11.
- Folkman J., *Tumor angiogenesis*, in Mendelsohn *et al.*, *Molecular Basis of Cancer*, 1995, Saunders, Philadelphia.
- Hartwell L. H., Kastan M. B., *Science*, 1994, 266, 1821-1828.
- Hemminki A., Peltomäki P., Mecklin J.-P. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, 8, 405-410.
- Jiricny J., *Trend in Genetics*, 1994, 10, 164-168.
- Liu B., Nicolaides N. C., Markowitz S. *et al.*, *Nature Genetics*, 1995, 9, 48-55.
- Marx J., *Science*, 1994, 266, 1321-1322.
- Meyerson M. *et al.* (Weinberg R. A.), *Cell*, 1997, 90, 785-795.
- Nakamura I. M. *et al.* (Cech T.), *Science*, 1997, 277, 955.
- Savitsky K., Sfez S., Tagle D. A. *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 1995, 4, 2025-2032.

- Shiloh Y., *Eur. J. Hum. Genet.*, 1995, 3, 116-138
 Szabo C. L., King M.-C., *Human Molecular Genetics*, 1995, 4, 1811-1817.
 Wooster R., Cleton-Jansen A.-M., Mangion J. et al., *Nature Genetics*, 1994, 6, 152-156.

ISABELLA CECCHERINI, MARILIA DEVOTO E GIOVANNI ROMEO

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE MALATTIE GENETICHE

SOMMARIO

Introduzione (col. 2457). - **Malattie genetiche** (col. 2457). - **Diagnosi diretta di mutazione genica nel paziente** (col. 2458). - **Delezioni** (col. 2459). - **Inserzioni, duplicazioni ed espansioni** (col. 2460). - **Mutazioni puntiformi** (col. 2463). - **Analisi di associazione o linkage per la diagnosi indiretta di mutazione genica nella famiglia** (col. 2465). - **Sviluppi futuri della diagnosi molecolare delle malattie genetiche** (col. 2467). - **Kit diagnostici** (col. 2468).

Introduzione

Le moderne analisi molecolari hanno prodotto nuovi importanti sviluppi nella diagnosi delle malattie genetiche. Nel passato le diagnosi genetiche erano basate esclusivamente su criteri clinici o su test biochimici. I criteri clinici possono però essere di difficile interpretazione, e a volte comunque non utilizzabili in quanto le caratteristiche della malattia si sviluppano tardi nella vita dell'individuo. Anche i test biochimici possono dare risultati incerti, e spesso richiedono studi invasivi e costosi. Inoltre, i criteri clinici e i test biochimici hanno molti limiti per quanto riguarda la identificazione dei portatori e la diagnosi prenatale.

I metodi molecolari permettono di evitare molti di questi problemi. Questi metodi possono identificare senza ambiguità la presenza o l'assenza di una *mutazione genica* sia in un paziente che in un portatore clinicamente normale. Nelle malattie a espressione tardiva, la diagnosi molecolare può essere effettuata molto *prima della comparsa dei sintomi* clinici, e può permettere di distinguere fra malattie con fenotipo simile. In alcune patologie, la conoscenza di una mutazione specifica può fornire indicazioni prognostiche. Inoltre, la diagnosi molecolare è relativamente semplice, in quanto richiede solo un campione di DNA, che può essere ottenuto da qualsiasi tipo di cellule nucleate, da linfociti del sangue periferico come da cellule di sfaldamento dell'epitelio della mucosa orale. Non è solitamente necessaria la biopsia del tessuto affetto, e si possono usare le cellule del villo coriale o del liquido amniotico per la *diagnosi prenatale* (v. PRENATALE DIAGNOSI [v.; v.*; v.**]). Per alcune malattie, la specificità della diagnosi molecolare permette lo studio della popolazione generale per identificare i portatori. Il limite principale alla applicazione generale della diagnosi molecolare è dovuto alla eterogeneità delle mutazioni responsabili delle malattie ereditarie. Questa variabilità ostacola la preparazione di un test diagnostico molecolare che sia adatto a tutte le situazioni (Kingston 1994; Korf 1995; Bianchi et al., 1994).

Malattie genetiche

Su un totale di forse 70.000 geni che probabilmente compongono il genoma umano (v.**), sono note circa cinquemila diverse malattie genetiche mendeliane semplici, ereditate cioè in associazione a un gene-malattia secondo modalità ben definite: autosomica dominante, autosomica recessiva, o legate al sesso. Alcune malattie genetiche sono ereditate per via materna, in quanto sono dovute ad alterazioni del DNA mitocondriale (v. MITOCONDRI [v.*; v.**]).

Le malattie genetiche sono elencate nell'importante catalogo del McKusick (1997).

Circa 2800 geni, che rappresentano più della metà dei geni responsabili delle malattie genetiche note, sono stati mappati, cioè sono stati localizzati in una determinata posizione sui cromosomi umani.

Oltre alle suddette malattie genetiche semplici ereditate con modalità mendeliana, vanno ricordate le altre malattie nelle quali è utile, e in alcuni casi essenziale, la diagnosi molecolare, come le malattie cromosomiche, le malattie multifattoriali a ereditarietà complessa, e i tumori.

Diagnosi diretta di mutazione genica nel paziente

La diagnosi molecolare diretta delle malattie genetiche si può fare *quando il gene responsabile della malattia è stato identificato*. Si possono perciò studiare direttamente le mutazioni geniche nel singolo paziente, con la limitazione dettata dalla presenza, nella massima parte delle malattie genetiche, di diverse mutazioni dello stesso gene in pazienti diversi (eterogeneità allelica). Possono anche essere presenti più geni in grado di causare la stessa malattia (e si parla allora di eterogeneità di locus).

La *diagnosi diretta* può essere effettuata: 1) nel paziente; 2) prenatalmente; 3) nella fase preclinica di malattie ad espressione tardiva; 4) nella popolazione generale per la individuazione dei portatori.

Daremo qui di seguito qualche esempio significativo di diagnosi molecolare diretta di malattie genetiche. Tratteremo dapprima cambiamenti genetici (*mutazioni*) più grossolani, comportanti perdita o aggiunta di materiale genetico, e poi quelli più fini, consistenti nel cambiamento di un solo nucleotide nel gene responsabile della malattia. Indicheremo qui soprattutto i *metodi* di diagnosi molecolare più utilizzati per l'analisi di mutazioni geniche comuni.

Ricordiamo brevemente che, oltre ai metodi che saranno illustrati nei paragrafi seguenti, possono essere usati anche altri metodi di analisi del DNA che permettono di determinare la presenza di mutazioni geniche rare, o addirittura di identificare mutazioni geniche non ancora descritte nella letteratura scientifica (Pignatti et al., 1993). Questi ultimi metodi vengono solitamente usati per scopo di ricerca, tranne in alcuni casi, come per la determinazione di mutazioni in geni recentemente identificati (ad es., nel momento di stesura di questo contributo, il gene *PKD1* responsabile della maggior parte dei casi di rene policistico dell'adulto), o in geni con molte mutazioni diverse da caso a caso (ad es. nei geni *COL1A1* e *COL1A2* in *osteogenesis imperfecta* [v.**]). Ricordiamo qui sinteticamente alcuni di questi metodi: quelli basati sulla identificazione dell'appaiamento errato di basi nel DNA in presenza di mutazione (come l'analisi degli acidi nucleici eteroduplici, la elettroforesi in gradiente denaturante, il taglio chimico o enzimatico dell'appaiamento errato), il metodo della analisi del cambiamento di conformazione tridimensionale del DNA a filamento singolo, e infine il test di interruzione prematura della sintesi proteica *in vitro*.

Due metodi di base devono essere subito qui ricordati, per la loro generale importanza nella evidenziazione del DNA, e ne vedremo infatti varie applicazioni nei paragrafi seguenti: il metodo di Southern e la PCR.

1. Il metodo di Southern (v. BLOTTING*) consiste nella ibridizzazione di una sonda marcata con radioisotopi o composti fluorescinati a un breve tratto specifico del DNA del paziente, su una membrana. La sonda si legherà solo alla sequenza di DNA complementare, e non al resto del DNA presente sulla membrana. Essendo la sonda marcata, essa sarà poi facilmente identificata (v. SONDE MOLECOLARI [v.*; v.**]).

2. Il metodo della PCR consiste invece nella sintesi di nuovo DNA *in vitro*, localizzato in una regione specifica e breve, dovuto alla presenza di inneschi specifici (o *primers*) per la DNA-polimerasi. I *primers* sono brevi tratti nucleotidici.

tidici (ad es. 20 nucleotidi), che si ibridizzano solo in posizioni determinate del DNA umano. La posizione specifica è dettata dalla complementarità della sequenza delle basi nel DNA. La DNA-polimerasi sintetizza così nuovo DNA solo fra i due *primers*, andando avanti e indietro molto velocemente. In due ore, e 20 cicli di amplificazioni *in vitro*, si possono ottenere 2 milioni di copie del tratto di DNA amplificato. Il DNA è quindi sufficientemente abbondante da essere facilmente evidenziato con la semplice aggiunta di bromuro di etidio che si intercala fra le due eliche ed emette fluorescenza quando adeguatamente illuminato. Nella PCR perciò, a differenza del metodo di Southern, non è necessario l'uso della sonda, in quanto il DNA amplificato è già in quantità sufficiente per essere evidenziato direttamente. Questo rende la PCR (v.*; v.***) molto più rapida, e sensibile, del metodo di Southern.

Delezioni

Il cambiamento genetico più drammatico è la perdita di un gene intero, o di parte del gene. La perdita di grossi blocchi di DNA comprendenti centinaia di migliaia o milioni di coppie di basi, può portare alla delezione di molti geni. A volte queste delezioni sono grosse, e si possono osservare con la *analisi dei cromosomi* al microscopio. Spesso però le delezioni anche di più geni interessano solo piccoli tratti cromosomici, e si possono evidenziare con la ibridizzazione *in situ* con sonde fluorescenti (*FISH: Fluorescent in Situ Hybridization*) (fig. 1).

Per questo scopo, una sonda fluorescinata di DNA clonato è ibridizzato al DNA dei cromosomi su un vetrino per microscopia. La ibridizzazione molecolare DNA/DNA è specifica, e avviene solo dove è presente la sequenza complementare alla sonda. La regione del cromosoma che corrisponde alla sonda diviene fluorescente quando è illuminata con luce appropriata, a meno che la regione sia deleta.

Molte *sindromi da microdelezione* sono state scoperte con il metodo FISH, come le sindromi di Prader-Willi (v. PRADER-WILLI, SINDROME DI**) e di Angelman (v. ANGELMANN, SINDROME DI**) (i geni relativi sono localizzati sul

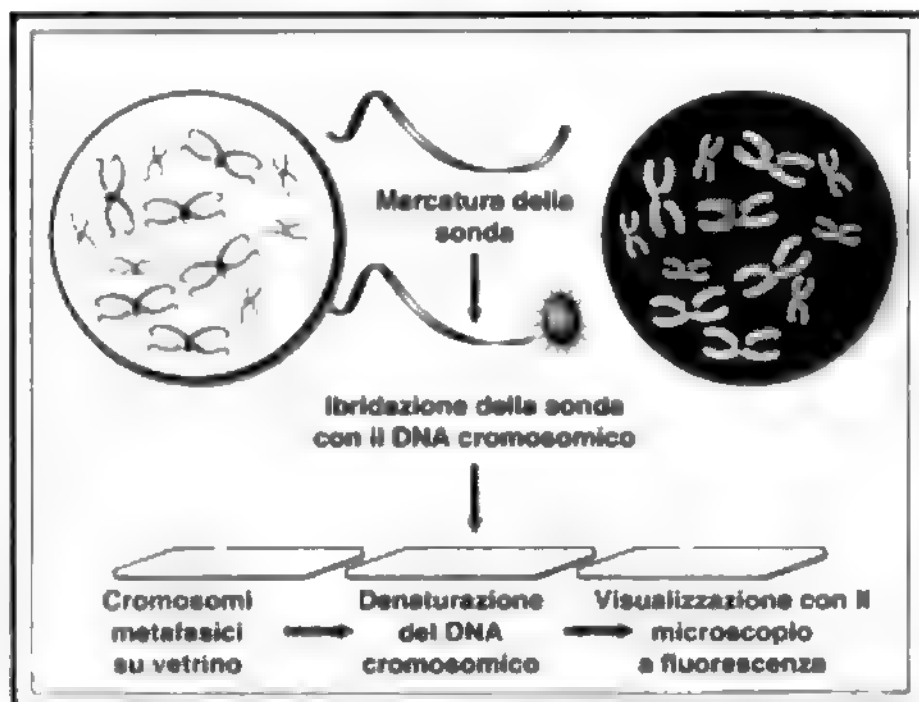


Fig. 1. Schema del metodo dell'ibridizzazione fluorescente *in situ* (*FISH: Fluorescent in Situ Hybridization*). I cromosomi metafasiici sono fissati su un vetrino per microscopia; il DNA cromosomico è denaturato in filamenti singoli e ibridizzato con una sonda di DNA clonato marcata con un marcatore fluorescente. Il gene corrispondente alla sonda viene identificato quando il preparato è illuminato con luce appropriata al microscopio. Se è presente una delezione di un gene, o di una copia del cromosoma mostrerà la ibridizzazione. (Da Korf, 1995, modificata).

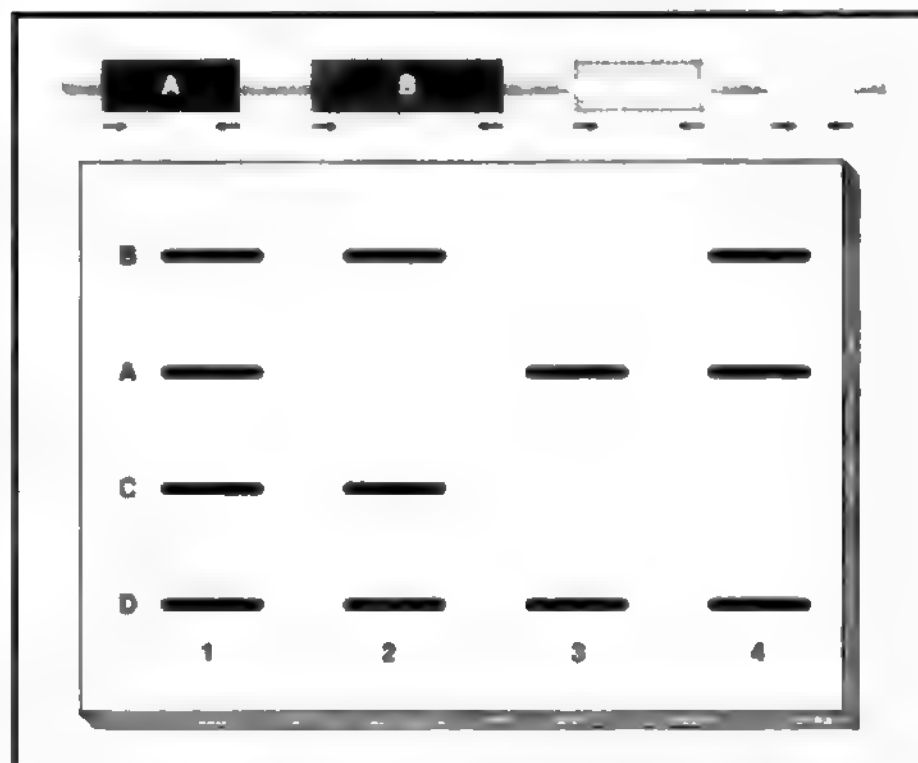


Fig. 2. Schema del metodo dell'analisi multipla di delezione. Gli esoni A, B, C e D del gene della distrofia muscolare di Duchenne sono amplificati *in vitro* simultaneamente mediante PCR nello stesso tubo di reazione. Le frecce indicano i *primers*. I prodotti di amplificazione sono separati in base al loro peso molecolare (i più grossi in alto) mediante elettroforesi su gel, e visualizzati mediante fluorescenza. Ogni esone è rappresentato da una banda sul gel. Se l'esone è deleta, manca la banda. La corsia 1 mostra un controllo senza delezione. Le corsie 2, 3, 4 mostrano la delezione dell'esone A, B e C, C, rispettivamente. (Da Korf, 1995, modificata).

cromosoma 15), le sindromi di DiGeorge e velo-cardio-facciale (cromosoma 22) e l'aniridia associata a tumore di Wilms (cromosoma 11). Queste ultime due sindromi sono dovute alla delezione simultanea di un gruppo di geni (sindrome da geni contigui), mentre le sindromi di Prader-Willi e di Angelman possono rappresentare la perdita di una copia di derivazione rispettivamente paterna o materna di un gene la cui espressione è inibita nella copia del gene residua, di derivazione rispettivamente materna o paterna (fenomeno dell'*imprinting* o marcatura genica selettiva che inibisce la espressione del gene marcato).

Delezioni più limitate, comprese all'interno di un gene, non sono invece solitamente visibili con l'analisi molecolare di cromosomi mediante FISH, ma sono invece identificabili con la analisi del DNA. Queste delezioni geniche sono caratterizzate dalla mancanza, o la minore dimensione, di una banda di DNA su gel. Questo si può vedere sia con il metodo di Southern, sia con la PCR. Le delezioni intrageniche sono comuni nel gene della distrofina, e causano la distrofia muscolare di Duchenne e quella di Becker. Sono facilmente identificabili nei maschi affetti, in quanto il gene della distrofina è localizzato sul cromosoma X, ed è perciò presente nel maschio in singola dose. La fig. 2 dà un esempio di diagnosi con PCR di distrofia di Duchenne (v. DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI**).

Inserzioni, duplicazioni ed espansioni

L'*inserzione* rappresenta un altro meccanismo grossolano di alterazione di un gene, e consiste nella introduzione di materiale genetico o nella ripetizione (duplicazione) di parti di un gene. Le inserzioni possono allungare il prodotto genico, o alterare la cornice di lettura del DNA, portando a una terminazione prematura della proteina corrispondente. Le analisi molecolari con il metodo di Southern o con la PCR possono evidenziare frammenti di DNA aberranti. Una delle mutazioni che provocano emofilia A è do-

vuta appunto alla inserzione di un elemento di DNA mobile nel genoma nel gene del fattore VIII della coagulazione. Una inserzione da noi identificata con PCR in un paziente con malattia di Sandhoff (v. GANGLIOSIDOSI [v.; v.**]) è mostrata nella fig. 3.

Una *duplicazione* del gene di una proteina della mielina (PMP-22) è causa della malattia di Charcot-Marie-Tooth, la più comune neuropatia periferica ereditaria, con trasmissione autosomica dominante (v. Distrofie e atrofie muscolari [v.; v. coll. 474-476; Agg. I, col. *2243]). È interessante notare che la delezione di questo stesso gene porta invece a un tipo diverso di neuropatia periferica demielinizzante, con paralisi da compressione del nervo.

Una nuova categoria di mutazioni geniche è stata descritta più recentemente: quella delle *espansioni*. La ripetizione di triplette nucleotidiche situate all'interno o in vicinanza di alcuni geni, al di là di un certo numero soglia, altera la funzione del gene, e porta a malattie genetiche come la distrofia miotonica, la sindrome del deficit mentale con X-fragile, la malattia di Huntington, ed altre malattie del sistema nervoso. Si tratta di *mutazioni instabili* (v. TRINUCLEOTIDI INSTABILI, MALATTIE DA**): la espansione avviene durante la trasmissione da genitore a figlio, e si spiega così l'aggravamento clinico e l'anticipazione della comparsa dei sintomi a una età più giovane comunemente riscontrati in generazioni successive di affetti in alcune di queste malattie. La gravità clinica della distrofia miotonica (v. MIOTONICHE SINDROMI**) e del deficit mentale con X-fragile (v. X-FRAGILE, SINDROME DELL' [v.*; v.**]) sono infatti proporzionali alla dimensione della

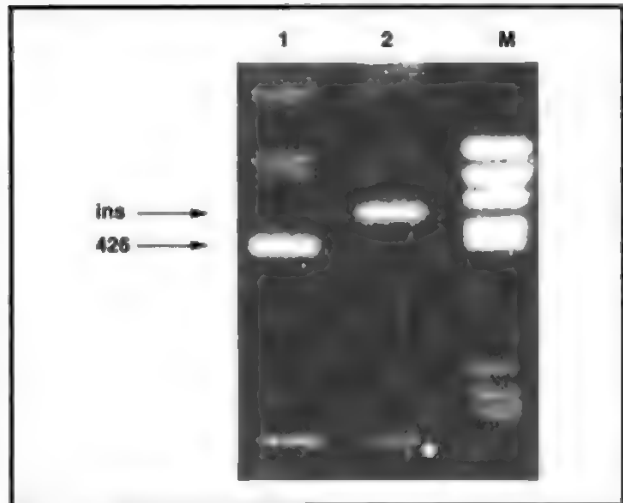


Fig. 3. Esempio di analisi di una inserzione. Dopo PCR sull'mRNA (*Reverse Transcription-PCR*) del gene della esosaminidasi B sintetizzato da colture di fibroblasti *in vitro*, il DNA amplificato è stato analizzato come in fig. 2. Si nota che nella corsia 2 il campione dell'affetto da malattia di Sandhoff (v. GANGLIOSIDOSI**) mostra una banda (ins) di dimensione maggiore del normale (426), dovuta alla inserzione di 48 coppie di basi. La inserzione è a sua volta dovuta a una mutazione puntiforme in un sito di *splicing* dell'introne 13. M = marcatori di peso molecolare del DNA (Da Gomez-Lira et al., 1995).

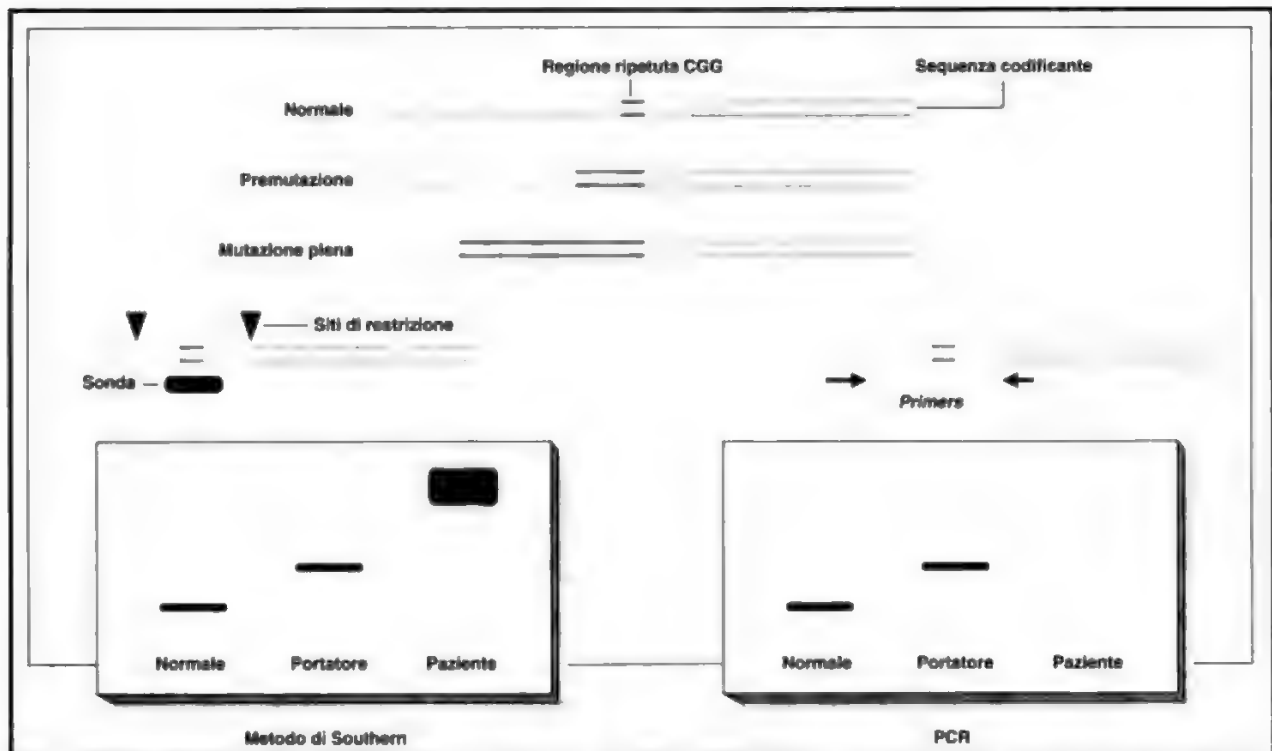


Fig. 4. Schema del metodo di analisi di espansione di tripletta. Nella sindrome dell'X fragile (v. X-FRAGILE, SINDROMI DI [v.*; v.**]) si ha una mutazione da ripetizione di tripletta CGG. Il numero di ripetizioni nel gene normale va da 5 a 50, da 50 a 200 nei portatori asintomatici, ed è superiore a 200 negli affetti. Il DNA è analizzato con il metodo di Southern (a sinistra), e con la PCR (a destra). Il soggetto normale ha una banda più piccola del portatore asintomatico, che a sua volta ha una banda più piccola dell'affetto. L'affetto ha una banda ad alto peso molecolare e più diffusa, dovuta alla instabilità della mutazione piena. L'allele della mutazione piena non può essere evidenziato con la PCR perché è troppo grande per essere amplificato con questo metodo. (Da Korf, 1995, modificata).

espansione. Per determinare la lunghezza delle regioni con le ripetizioni trinucleotidiche, si possono usare sia il metodo di Southern che la PCR, come indicato nella fig. 4. Le piccole espansioni si possono amplificare e misurare con la PCR. Per le grandi espansioni, non è possibile amplificare la regione trinucleotidica espansa, che deve perciò essere analizzata con il metodo di Southern.

Mutazioni puntiformi

La maggior parte delle mutazioni che causano malattie sono costituite da semplici sostituzioni di un nucleotide con un altro, e non portano perciò ad alterazione del numero di nucleotidi di un gene.

Diversi metodi di analisi molecolare sono utilizzati per la analisi sia di queste mutazioni, che di quelle dovute a inserzioni e delezioni di uno o pochi nucleotidi.

Il metodo più semplice utilizza la specificità di sequenza riconosciuta dagli enzimi di restrizione (*R-PCR* o *restriction-PCR*). Ognuno di questi enzimi, e sono centinaia, riconosce una sequenza specifica di DNA lunga da quattro a otto coppie di basi, e taglia il DNA solo in quella posizione (*sito di restrizione*). Una mutazione nel sito di restrizione impedirà all'enzima di tagliare in quel sito. Al contrario, una mutazione che determini la creazione di un nuovo sito di restrizione, porterà ad un taglio in una nuova posizione che normalmente non è tagliata. Per determinare la mutazione, il DNA è amplificato con PCR, il pro-

dotto è incubato con l'enzima di restrizione, e il DNA amplificato è sottoposto a elettroforesi. Se l'enzima taglia, sono presenti due frammenti, se non taglia, uno solo. Da queste osservazioni si deduce la presenza di una mutazione che distrugge oppure crea un sito di restrizione (fig. 5).

Se la mutazione non determina né la comparsa né la scomparsa di un sito naturale di restrizione noto, si può in alcuni casi crearne uno ad arte, usando inneschi mutati nella PCR (*RG-PCR* o *Restriction site Generating-PCR*; Gasparini *et al.*, 1992). Basta, a tal fine, alterare uno solo dei nucleotidi di uno dei due *primers*, e la reazione potrà avvenire comunque, inserendo un nuovo nucleotide in una posizione particolare, che permetterà poi di eseguire l'analisi di restrizione sul DNA amplificato *in vitro* (fig. 6).

Un altro metodo di analisi di mutazione, sempre basato sulla PCR, utilizza un *primer* specifico per la sequenza normale e un *primer* specifico per la sequenza mutata, ottenendo così amplificazione solo nel caso corrispondente (*ARMS*: *Amplification Refractory Mutation System*; o sistema di analisi di mutazione «refrattario» alla amplificazione). La sequenza normale sarà amplificata solo a partire dal *primer* normale, mentre la sequenza mutata solo dal *primer* mutato. Si usano entrambi i *primer* in reazioni separate, e la presenza della mutazione può così essere facilmente dimostrata dalla presenza o dalla assenza di DNA amplificato (fig. 7). Esistono già in commercio alcuni *kit* (v. sotto) basati su questa tecnica di amplificazione specifica per la diagnosi di alcune malattie genetiche più comuni, come ad es. la fibrosi cistica (v. *MUCOVISCIDOSI***).

Un ultimo modo molto usato di evidenziare mutazioni geniche consiste nell'uso di ibridazioni specifiche fra DNA amplificato *in vitro* con PCR e oligonucleotidi specifici rispettivamente per la sequenza mutata e per la sequenza normale (metodo *ASO*, degli oligonucleotidi alleli specifici). Questo metodo è anche chiamato più colloquialmente *dot-blot*, o ibridazione su goccia, in quanto il DNA individuale amplificato viene solitamente depositato sotto forma di una goccia sulla membrana, che lo assorbe. Si aggiun-

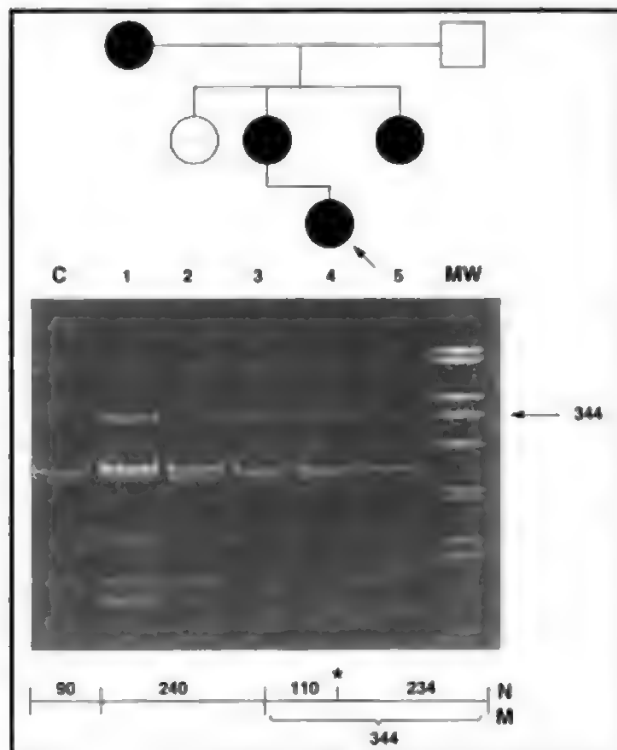


Fig. 5. Esempio di analisi di restrizione. In questa famiglia è presente la mutazione puntiforme (*V:V**), malattia autosomica dominante legata, in questa famiglia, al gene $\alpha 2$ del collagene di tipo I. La analisi di restrizione mostra la comparsa in tutti gli affetti (1, 3, 4, 5) di una banda di 344 coppie di basi di DNA. La banda è dovuta alla abolizione di un sito di restrizione per l'enzima di restrizione *Hae III* che normalmente produce due frammenti di 110 e 234 coppie di basi di DNA. I pazienti mostrano sia i frammenti di 110 e 234 coppie di basi, corrispondenti al gene normale, che quello di 344, corrispondente al gene mutato. (Da Mottes *et al.*, 1994).

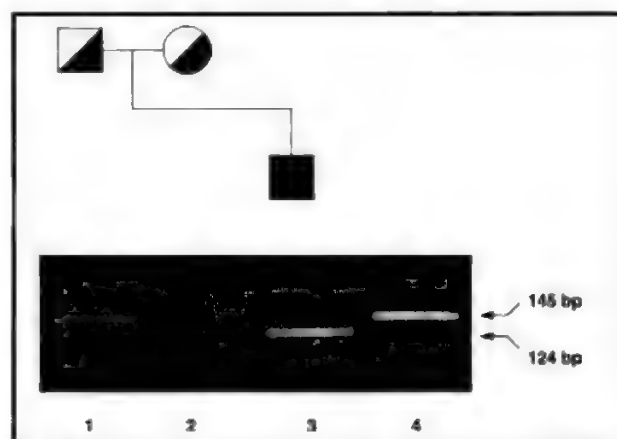


Fig. 6. Esempio di analisi con il metodo della modificazione di restrizione *in vitro* (*Restriction site Generating-PCR* o *RG-PCR*). In un caso di fibrosi cistica (v. *MUCOVISCIDOSI [v.: v.*; v.**]*) è stata identificata la mutazione genica, e studiata nella famiglia mediante PCR con *primer* modificato. Con questo *primer* modificato, si è generato un sito di restrizione per l'enzima di restrizione *Hae III* che taglia solo in presenza della mutazione puntiforme. L'allele normale è di 145 coppie di basi (bp) di DNA, come mostrato nel controllo in corsia 4. L'allele mutato è di 124 coppie di basi. Il frammento di 21 coppie di basi non si vede nella figura. Il figlio, in corsia 3, ha ereditato la stessa mutazione (frammento da 124 coppie di basi) sia dal padre che dalla madre. (Da Marigo *et al.*, 1995).

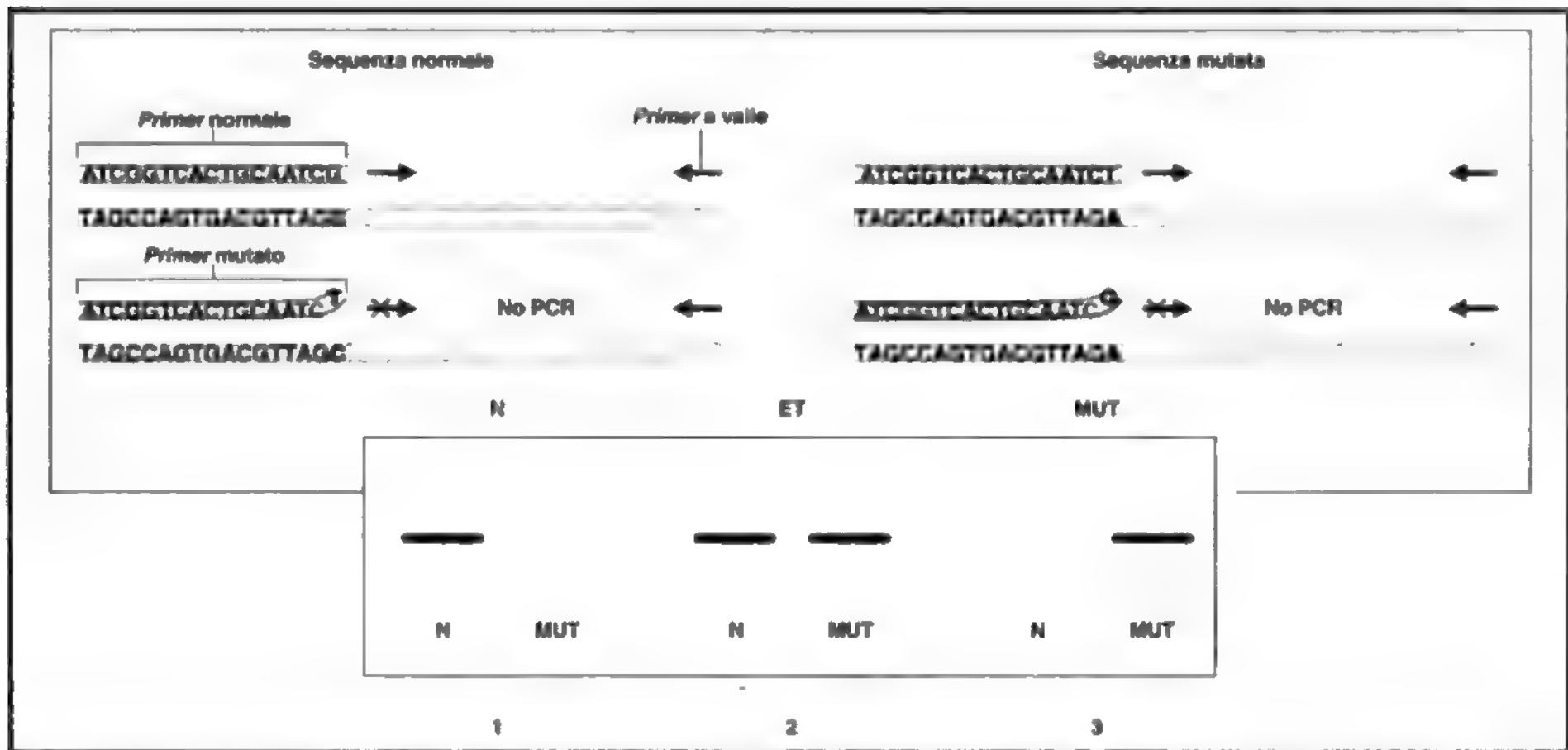


Fig. 7. Schema del metodo di analisi con primers specifici di PCR (Amplification Refractory Mutation System o ARMS). In questo esempio, la mutazione consiste nella sostituzione di C (citosina, nel normale) con A (adenina, nel mutato). Si sintetizzano due primers, uno complementare alla sequenza normale, uno alla sequenza mutata. Si fanno due reazioni di PCR separate, con un primer a valle comune. Nel caso di omozigote normale, N, corsie 1, si otterrà solo una banda di DNA amplificata con il primer normale. Al contrario, l'omozigote mutato, MUT, corsie 3, avrà solo una banda con il primer mutato. L'eterozigote, ET, corsie 2, mostrerà entrambe le bande di DNA. (Da Korf, 1995, modificata).

gono poi gli oligonucleotidi specifici: quello normale su una membrana, e quello mutato sull'altra, e si determina la presenza della mutazione a seconda del tipo di ibridizzazione molecolare (fig. 8).

La versione opposta di quest'ultimo metodo, in cui si usano membrane contenenti oligonucleotidi fissati stabilmente, e si aggiunge il DNA individuale amplificato *in vitro*, prende perciò il nome di *dot-blot* a rovescio o *reverse dot-blot*. Esistono già in commercio supporti solidi di questo tipo, con oligonucleotidi stabilmente legati per la analisi di diverse mutazioni geniche più comuni. Il *reverse dot-blot* è facilmente adattabile alla analisi automatizzata di mutazioni geniche particolarmente frequenti in una data popolazione, come ad esempio per la diagnosi genetica di fibrosi cistica nel nord-est d'Italia (Bonizzato *et al.*, 1995).

Analisi di associazione o linkage per la diagnosi indiretta di mutazione genica nella famiglia

Quanto detto finora presuppone la possibilità di identificare direttamente una mutazione patogena. Ci si può chiedere però se sia possibile fare diagnosi molecolare di malattia genetica anche quando non sia possibile identificare la mutazione vera e propria. La risposta è sì, se il gene è noto, oppure se solo la localizzazione del gene nel genoma umano è stata comunque determinata, mediante mappaggio genico. In questi casi, si può offrire una forma limitata di analisi genetica: la *analisi di linkage* (fig. 9).

Questa analisi si effettua determinando sequenze di DNA polimorfiche, che non sono esse stesse la causa diretta della patologia, ma hanno la caratteristica di essere strettamente associate al gene-malattia, o addirittura situate al suo interno. In questo modo le sequenze polimorfiche funzionano come marcatori nei diversi membri della famiglia, e servono per individuare la associazione fra la malattia e gli alleli polimorfici nella famiglia in esame. Se questo risulta possibile, si può allora seguire la ereditarietà della malattia nella famiglia, ed

eseguire diagnosi genetica. La tecnica si può usare solo se sono presenti più membri affetti nella famiglia, e richiede una analisi estesa di tutti i membri disponibili della famiglia, anche non affetti, allo scopo di trovare marcatori del DNA informativi, in grado cioè di identificare il gene-malattia. Questi marcatori informativi variano di famiglia in famiglia. Bisogna avere quindi a disposizione il maggior numero possibile di marcatori. L'analisi di *linkage* non si può quindi usare in famiglie che hanno un solo membro affetto, o nelle quali i parenti non siano disponibili al prelievo di sangue, o non desiderino comunque essere sottoposti a esame.

Questo metodo è limitato da potenziali problemi interpretativi ed errori che potrebbero essere dovuti a diversi motivi: a) la presenza di ricombinazione genetica fra marcatore e gene-malattia (si tratta di un fenomeno che avviene normalmente durante la produzione dei gameti materni e paterni, e la cui frequenza è proporzionale alla distanza fra marcatore e gene-malattia); b) la eterogeneità genetica (questo fenomeno è già stato ricordato sopra, e riguarda il caso in cui più geni possono essere responsabili della stessa malattia, in famiglie diverse. Si può così rimanere nella incertezza riguardo al quale sia il gene-malattia nella famiglia in esame); c) l'insicurezza sulle relazioni parentali biologiche fra i membri della famiglia. In questo caso, le relazioni di discendenza sono facilmente controllate con l'analisi dei marcatori del DNA. Ciononostante, e con tutti gli opportuni controlli e cautele, l'analisi di *linkage* è molto utile per la diagnosi molecolare di diverse malattie genetiche, ed è perciò molto usata sia come unico approccio obbligato nel caso in cui il gene sia stato mappato, ma sia ancora ignoto, sia come secondo approccio nel caso in cui non sia stato possibile, per qualsiasi motivo, identificare direttamente la mutazione genica nel paziente. L'analisi di *linkage* si usa ad es. per la distrofia muscolare di Duchenne, l'emofilia, la atrofia muscolare spinale, la fibrosi cistica, il rene policistico dell'adulto, l'*osteogenesis imperfecta*.

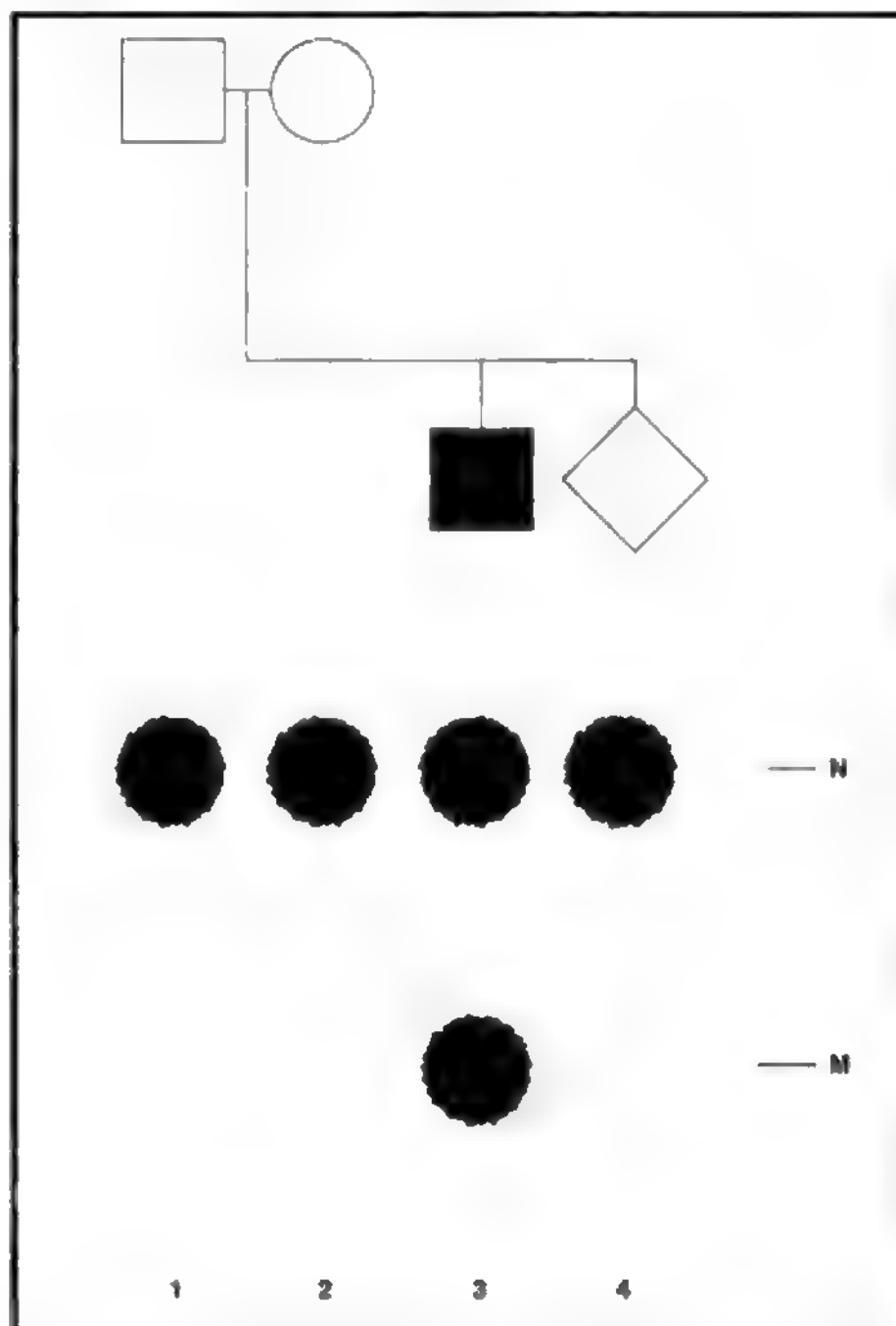


Fig. 8. Esempio di analisi *dot-blot*. È riportata una diagnosi prenatale di *osteogenesis imperfecta*. Il DNA è stato amplificato con PCR dai membri della famiglia. Sulla base della conoscenza della mutazione puntiforme individuata con taglio chimico del DNA nel gene *COL1A2* del paziente, sono stati sintetizzati oligonucleotidi specifici per la sequenza normale e per la sequenza mutata. Gli oligonucleotidi sono stati marcati con un radioisotopo ed ibridizzati sul filtro contenente repliche del DNA di ciascuno dei quattro soggetti indicati. Si vede che la mutazione è presente solo nell'affetto, il campione numero 3. Si tratta quindi di una nuova mutazione genica, assente nei genitori. Il feto non ha ereditato la mutazione. (Da Gomez-Lira et al., 1994).

L'uso di marcatori ipervariabili del DNA, oggi localizzati in grande quantità su tutto il genoma umano, permette una analisi di *linkage* a scopo diagnostico sempre più informativa ed accurata.

Sviluppi futuri della diagnosi molecolare delle malattie genetiche

Abbiamo esposto brevemente l'importanza della diagnosi molecolare di mutazione genica in malattie ereditarie. Rivoltando ora un momento lo sguardo ai possibili sviluppi futuri è facile prevedere che le analisi diagnostiche genetiche molecolari continueranno ad aumentare di importanza man mano che *more genes*, cause di malattia saranno individuati. Si prevede infatti che entro l'anno 2005, tutti i geni umani saranno identificati.

Nuove tecnologie sono inoltre in corso di sviluppo che permetteranno la analisi simultanea del genotipo di una persona per molti geni-malattia contemporaneamente (*analisi multiplex*). Analisi del DNA simili a quelle qui esposte,

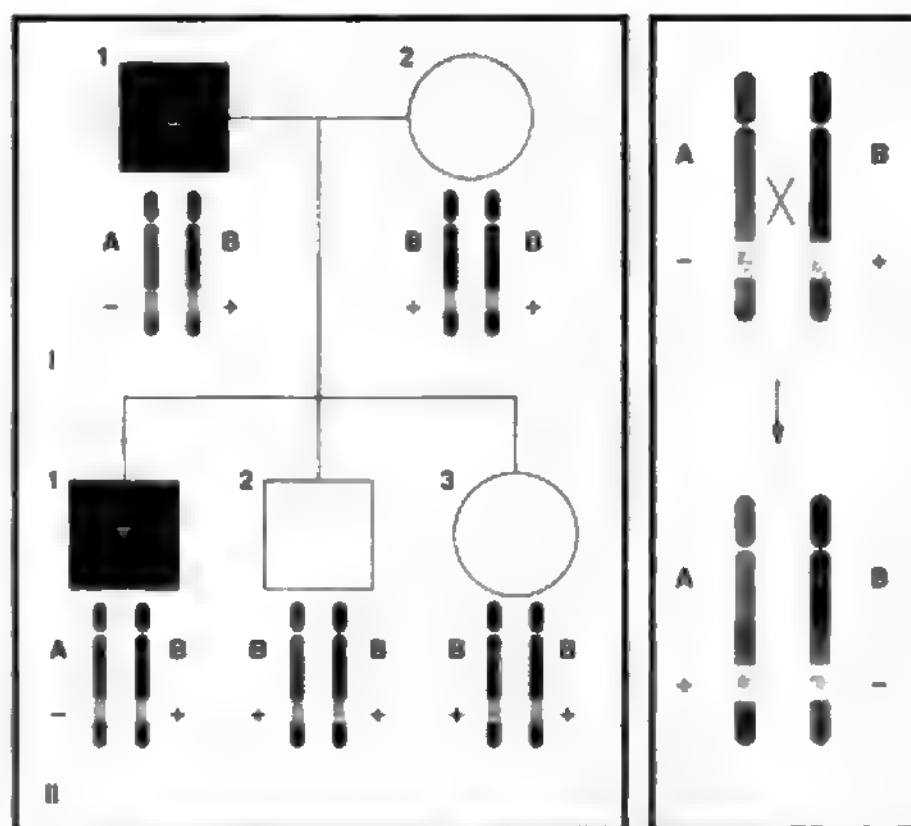


Fig. 9. Schema dell'analisi di *linkage* per scopo diagnostico. Il padre e il primo figlio sono affetti da una malattia autosomica dominante (ad es. il rene policistico dell'adulto). Il padre è eterozigote per un gene marcatore e ha gli alleli A e B. Il figlio affetto ha ereditato l'allele A, mentre i due figli sani hanno ereditato l'allele B. Si conclude perciò che l'allele A identifica, in questa famiglia, il gene-malattia (con le avvertenze riportate nel testo). (Da Korf, 1995).

forse sempre più miniaturizzate su substrati solidi diversi, e associate alla analisi computerizzata dei risultati, permetteranno certamente maggiore velocità di esame, e risparmi nei costi economici del singolo esame.

Le analisi indicheranno non solo geni responsabili di malattie genetiche, che sono molte, ma singolarmente rare, ma anche di quei geni che contribuiscono alla *susceptibilità a malattie comuni*, come il cancro, l'arteriosclerosi, l'ipertensione, l'osteoporosi, le malattie ostruttive polmonari (Pignatti et al., 1995; Martinati et al., 1996). L'incisività della medicina preventiva sarà così aumentata grandemente, e i principi della genetica e i metodi di diagnosi molecolare saranno integrati nella pratica medica quotidiana.

Saranno probabilmente presto disponibili così tanti esami genetici molecolari, che sarà compito non facile del legislatore decidere quali esami offrire alla popolazione nell'ambito del Sistema Sanitario Nazionale.

Kit diagnostici

Si è sopra accennato ai *kit* diagnostici per l'analisi multipla di mutazioni genetiche. Si tratta di sistemi che permettono un risparmio di tempo e di materiale, una semplificazione delle operazioni, e la possibile automatizzazione parziale o totale.

Alcuni *kit* per malattie genetiche sono già in commercio ed altri sono in sviluppo. Illustriamo qui di seguito tre esempi di analisi del gene della fibrosi cistica (v. MCCOVISCOSI***) con metodi *multiplex*. Sono tutti *kit* basati sulla PCR (v. sopra).

La fig. 10 mostra un esempio di un *kit* commerciale che utilizza il metodo ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) (v. sopra in fig. 7 per la illustrazione del metodo). La fig. 10 illustra l'analisi contemporanea di 7 diverse mutazioni genetiche in sei diversi pazienti. La presenza di una banda colorata in entrambe le corsie indica la presenza della mutazione allo stato eterozigote.

Il secondo esempio, riportato in fig. 11, utilizza invece il

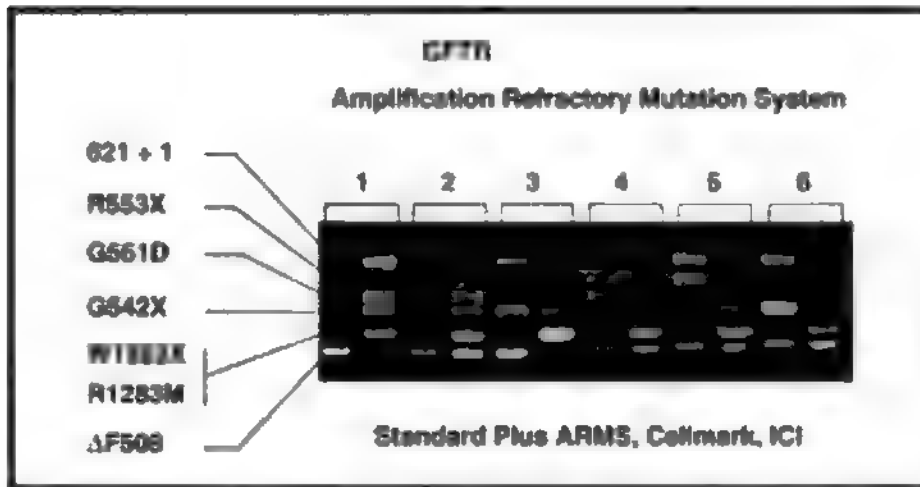


Fig. 10. Analisi multipla di mutazioni del gene *CFTR* con ARMS in sei pazienti affetti da fibrosi cistica. Gel di agarosio. Campioni: 1: ha le mutazioni 621 + 1 e W1282X; 2: ΔF508 (e presumibilmente un'altra mutazione, qui non indicata). In questa malattia recessiva sono infatti già note circa 600 diverse mutazioni nel gene *CFTR*; 3: G542X (e altra mutazione); 4: G551D e ΔF508; 5: R553X e ΔF508; 6: G542X e ΔF508. Ulteriori analisi hanno indicato che i pazienti 2 e 3 hanno entrambi la mutazione N1303K.

metodo del *reverse blot* (v. col. *2465 per una spiegazione del metodo). Anche in questo caso, sono analizzate 7 mutazioni genetiche, in parte diverse dalle precedenti. La presenza di una banda in corrispondenza della sigla indica la presenza della mutazione. Le altre bande rappresentano il controllo normale.

Il terzo esempio, mostrato in fig. 12, riporta un *kit* in via di sviluppo, che usa lo stesso metodo precedente del *reverse blot*. I pallini colorati indicano la presenza della mutazione o della sequenza normale, a seconda della posizione sulla striscetta. La stessa ditta ha in corso di sviluppo un nuovo *kit multiplex* simile a quello qui riprodotto, in grado di evidenziare ben 57 diverse mutazioni genetiche. Altri *kit* per analisi genetiche multiple con metodi simili a quelli qui

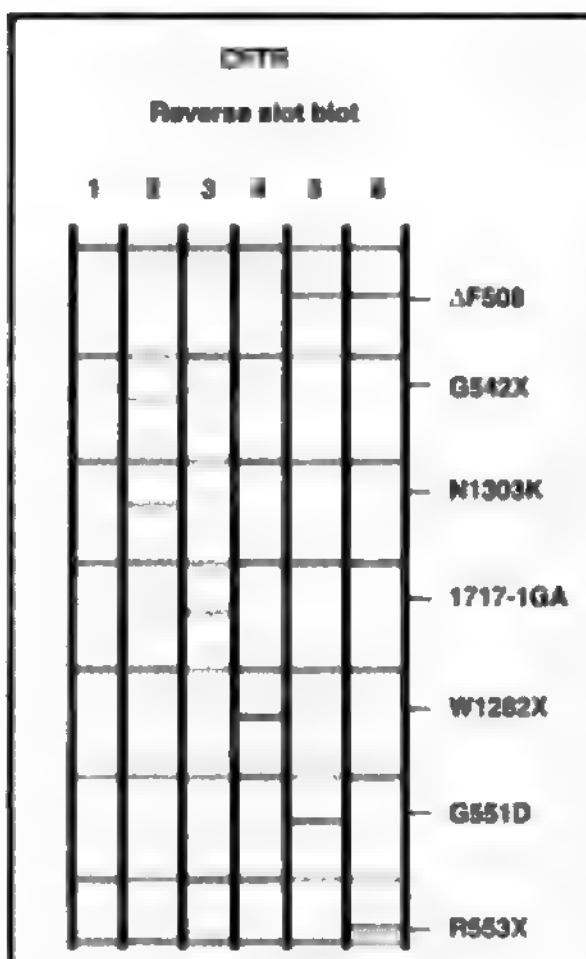


Fig. 11. Analisi multipla di mutazioni del gene *CFTR* con il metodo *reverse dot blot* in 5 (2-6) pazienti affetti da fibrosi cistica. Striscette di cellulosa. Il campione 1 deriva da un soggetto normale, e non mostra mutazioni. 2: G542X e N1303K. 3: 1717-1GA (e altra mutazione). 4: W1282X (e altra mutazione). 5: ΔF508 e G551D. 6: ΔF508 e R553X. La seconda mutazione del paziente 3 è ignota, il paziente 4 ha la mutazione 621 + 1GT. (INVO-LIPA CF2, Immunogenetics, Belgio).

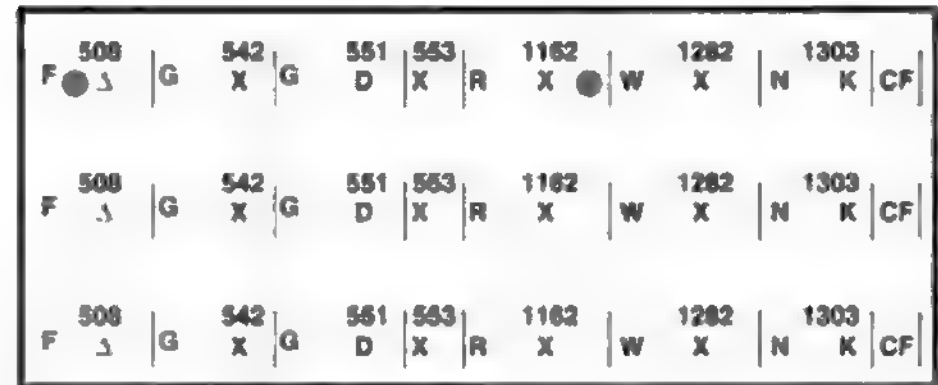


Fig. 12. Analisi multipla di mutazioni del gene *CFTR* con il metodo *reverse dot blot* in tre pazienti affetti da fibrosi cistica. Striscette di cellulosa. La striscetta superiore indica la presenza della mutazione R1162X allo stato omozigote (è infatti assente il pallino blu in R). Questo indica che entrambi i geni del paziente portano la mutazione). Striscetta in mezzo: ΔF508 e R1162X. Striscetta inferiore: W1282X (e altra mutazione da determinare). (Gentilmente fornito dal dr. Saiki, Roche Molecular Systems, Alameda, California, USA).

descritti, o con altri metodi, comunque automatizzabili, sono in corso di sviluppo da parte di altre ditte.

Vorrei infine ricordare solo un altro metodo di analisi multipla di mutazioni geniche in corso di sviluppo che ha destato grandissime aspettative: la «chip di DNA». Si tratta di una piastrina al silicio di circa un centimetro di lato, sulla quale si possono immobilizzare attualmente fino a centinaia di migliaia di oligonucleotidi per l'analisi di centinaia o migliaia di mutazioni. Segue una ibridizzazione con l'acido nucleico da esaminare, una detezione del segnale mediante microscopio laser confocale, e una analisi computerizzata. Una *chip* di DNA per l'analisi di un gene del virus HIV (Kozal *et al.*, 1996) è già in commercio. Sono in corso di sviluppo *chip* per analisi di mutazioni nell'esone 11 del gene *BRCA1* in pazienti con tumori della mammella e dell'ovaio (Hacia *et al.*, 1996). Questi metodi permetteranno presto l'analisi di una quantità sempre maggiore di mutazioni geniche in malattie genetiche classiche, e la determinazione di molteplici fattori di rischio genetico per malattie comuni, come ad es. le malattie cardiovascolari, che rappresentano oggi la prima causa di morte in Italia.

Bibliografia

- Bianchi U., Cicero R., De Leo G., Pignatti P. F., Scali V., *Genetica*, 1994, Monduzzi Ed., Bologna.
- Bonizzato A., Bisceglia L., Marigo C., Nicolis E., Bombieri C., Castellani C., Borgo G., Zelante L., Mastella G., Cabrini G., Gasparini P., Pignatti P. F., *Hum. Genet.*, 1995, **95**, 397.
- Gasparini P., Bonizzato A., Dognini M., Pignatti P. F., *Mol. Cell. Probes*, 1992, **6**, 1.
- Gomez-Lira M., Sangalli A., Pignatti P. F., Digilio M. C., Giannotti A., Carnevale E., Mottes M., *J. Med. Genet.*, 1994, **31**, 965.
- Gomez-Lira M., Perusi C., Brutti N., Farnetani M. A., Margollicci M. A., Rizzuto N., Salviati A., *Human Mutation*, 1995, **6**, 260.
- Hacia J. G. *et al.*, *Nature Genetics*, 1996, **14**(4), 442-477.
- Kingston H. M., *ABC of clinical genetics*, 1994, 2 ed., British Medical Journal Publishing Group, London.
- Korf B., *New Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 1218 e 1499.
- Kozal M. J. *et al.*, *Nature Medicine*, 1996, **2**(7), 753-766.
- Marigo C., Bombieri C., Bisceglia L., Zelante L., Gasparini P., Pignatti P. F., *Mol. Cell. Probes*, 1995, **9**, 139.
- Martinati L. C., Trabetti E., Casartelli A., Boner A. L., Pignatti P. F., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1996, **153**, 1682.
- McKusick V., *Mendelian inheritance in man, a catalog of human genes and genetic disorders*, 1998, 12 ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- McPherson R. A., *Molecular Basis of Genetic Disease and Molecular Methods*, in McPherson R. A. ed., *Clinics in Laboratory Medicine-Genetic Testing*, 1995, **15**(4), 779-794, Saunders, Philadelphia.
- McPherson R. A. ed., *Clinics in Laboratory Medicine Genetic Testing*, 1995, **15**(4), 749-999.
- Mottes M., Sangalli A., Valli M., Forlino A., Gomez-Lira M., Antoniazzi F., Constantinou-Deltas C. D., Cetta G., Pignatti P. F., *Hum. Genet.*, 1994, **93**, 681.

- Pignatti P. F., Turco A., Mottes M., Peissel B., Trabetti E., Marigo C., *Applicazioni della PCR nelle malattie genetiche*, in *Applicazioni diagnostiche della PCR*, Albertini A., Bombardieri E., Bonini F., Salvatore F. eds., 1993, BM Biomedica, Milano.
- Pignatti P. F., *I metodi di analisi genetica molecolare umana e applicazioni diagnostiche*, in Bianchi U., Cicero R., De Leo G., Pignatti P. F., Scali V., Sichel G. eds., *Genetica*, 1994, Monduzzi Editore, Bologna.
- Pignatti P. F., Bombieri C., Marigo C., Benetazzo M., Luisetti M., *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4, 635.
- Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7 ed., 1995, McGraw-Hill, New York.
- Strachan T., Read A. P., *Genetica Umana Molecolare*, 1997, UTET, Torino.
- Willard H. F., *Human Genetics*, in Leder P., Clayton D. A., Rubenstein E., *Introduction to Molecular Medicine*, 1994, Scientific American, New York.

PIER FRANCO PIGNATTI

GENI DISCONTINUI

1. discontinuous genes.

SOMMARIO

Discontinuità dei geni dovuta agli introni (col. 2471). - **Funzioni specifiche degli introni (col. 2472).** - **Funzione evolutiva degli introni (col. 2475).** - **Introni, grandezza del genoma ed evoluzione (col. 2476).**

Discontinuità dei geni dovuta agli introni

Fino al 1976 si dava per scontato che, come nei procarioti, anche negli eucarioti la sequenza aminoacidica di una proteina fosse codificata da una ininterrotta sequenza di basi nel DNA. Così è risultata veramente inaspettata la scoperta, fatta in quell'anno, che la maggior parte dei geni degli organismi eucariotici contiene lunghe regioni non codificanti (Chambon, 1981; Witkowski, 1988). Tali sequenze, denominate *introni*, interrompono la continuità della regione codificante che risulta così costituita da più *esoni* (fig. 1). Il numero di introni varia da un gene all'altro. Ci sono geni che non hanno introni, per esempio i geni per gli istoni, geni che ne contengono uno o pochi, per esempio, ciascun gene per le globine ne contiene due, e, infine, geni che ne contengono anche molte decine, come il gene per il collagene che ne contiene 54. Anche la lunghezza degli introni è molto variabile, da un minimo di qualche decina di basi fino a centinaia di migliaia di basi. Introni possono essere presenti non solo nei geni che codificano per gli RNA messaggeri e quindi per proteine, ma anche nei geni che codificano per altri tipi di RNA, come l'RNA ribosomiale e gli RNA transfer.

La trascrizione da parte della *RNA-polimerasi* di un gene contenente introni non produce direttamente un RNA ma-

turo che possa essere utilizzato così com'è, ma delle molecole di RNA più lunghe (*trascritti primari*, o *pre-mRNA* nel caso di geni codificanti proteine), in cui la regione codificante è interrotta dalle sequenze non codificanti corrispondenti agli introni. Successivamente, una serie di tagli e ricuciture risultano nella escissione dal trascritto primario delle sequenze introniche e nella formazione dell'RNA maturo mediante ricongiunzione delle sequenze esoniche. Questo processamento o maturazione dell'RNA (in inglese *splicing* [v.**]) avviene nel nucleo della cellula subito dopo la trascrizione. Esistono diversi meccanismi di processamento dei trascritti primari, alcuni relativamente semplici e altri molto complessi, a seconda degli organismi, delle cellule e dei particolari geni considerati. (Per un approfondimento di questi meccanismi v. *SPLICING***). Qui tratteremo invece delle funzioni e della origine evolutiva degli introni.

È stato osservato che in genere le sequenze di basi degli introni si modificano rapidamente durante l'evoluzione, molto più di quanto accada per gli esoni. Una possibile spiegazione è che gli introni, non avendo funzione codificante, non siano sotto pressione selettiva. Questo porterebbe a concludere però che la loro presenza sia del tutto inutile e quindi non spiegabile in termini evolutivi. Col passare del tempo invece ci si è resi conto che le regioni introniche possono avere importanti funzioni. Solo in alcuni casi si tratta di funzioni specifiche per la cellula o per l'organismo, per lo più regolative dell'attività dei geni che li contengono. Per molti introni, per i quali non sono state identificate funzioni specifiche, è stato proposto un importante ruolo nell'evoluzione.

Funzioni specifiche degli introni

Sono state descritte numerose situazioni in cui un introne che divide un gene che codifica per una proteina, contiene una sequenza che a sua volta codifica per una proteina diversa, cioè un altro gene. Uno dei primi casi identificati è stato quello del gene *GART* in *Drosophila*, che codifica per un enzima importante per la biosintesi delle purine (Heinikoff *et al.*, 1986). All'interno del suo lungo primo introne si trova un altro gene, relativamente corto, che codifica per una proteina della cuticola.

In alcuni casi il gene ospitato in un introne non codifica per un RNA messaggero e quindi per una proteina, ma per un RNA che svolge una sua funzione come tale. È il caso di numerosi piccoli RNA che vanno a localizzarsi nel nucleolo e che hanno, in questo organello, una funzione nella sintesi dei ribosomi. Le sequenze che codificano per questi piccoli RNA si trovano negli introni dei geni che codificano per alcune proteine, pure esse coinvolte nella sintesi e funzione dei ribosomi (Maxwell e Fournier, 1995). Quindi anche in

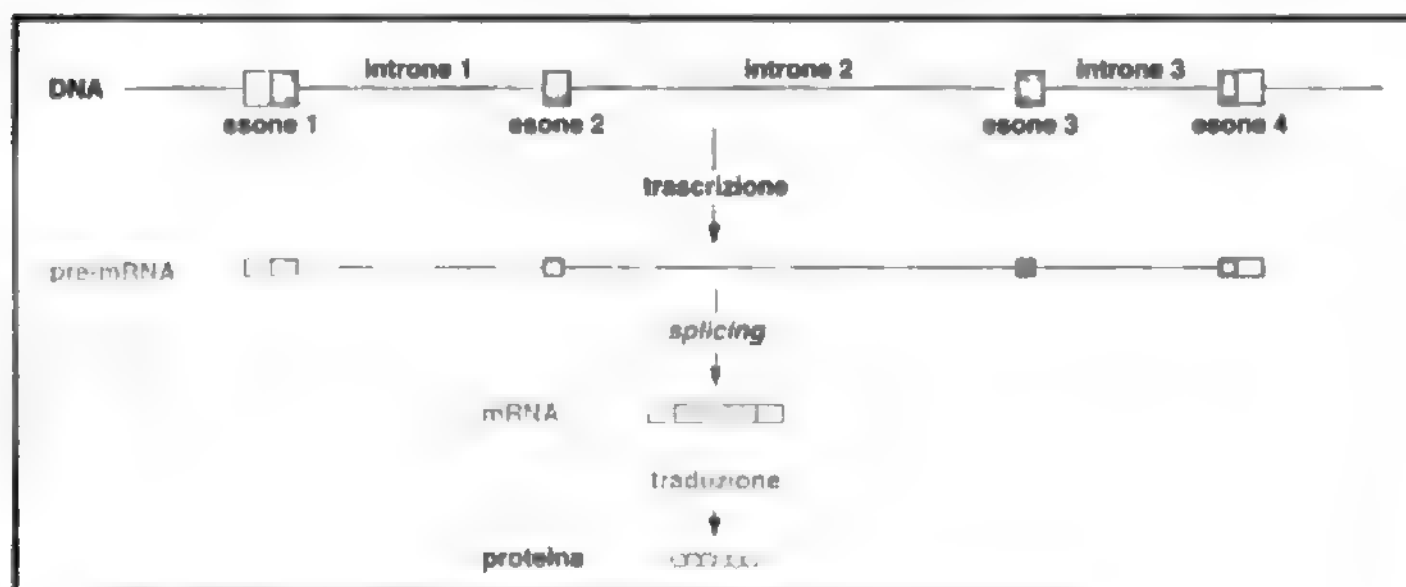
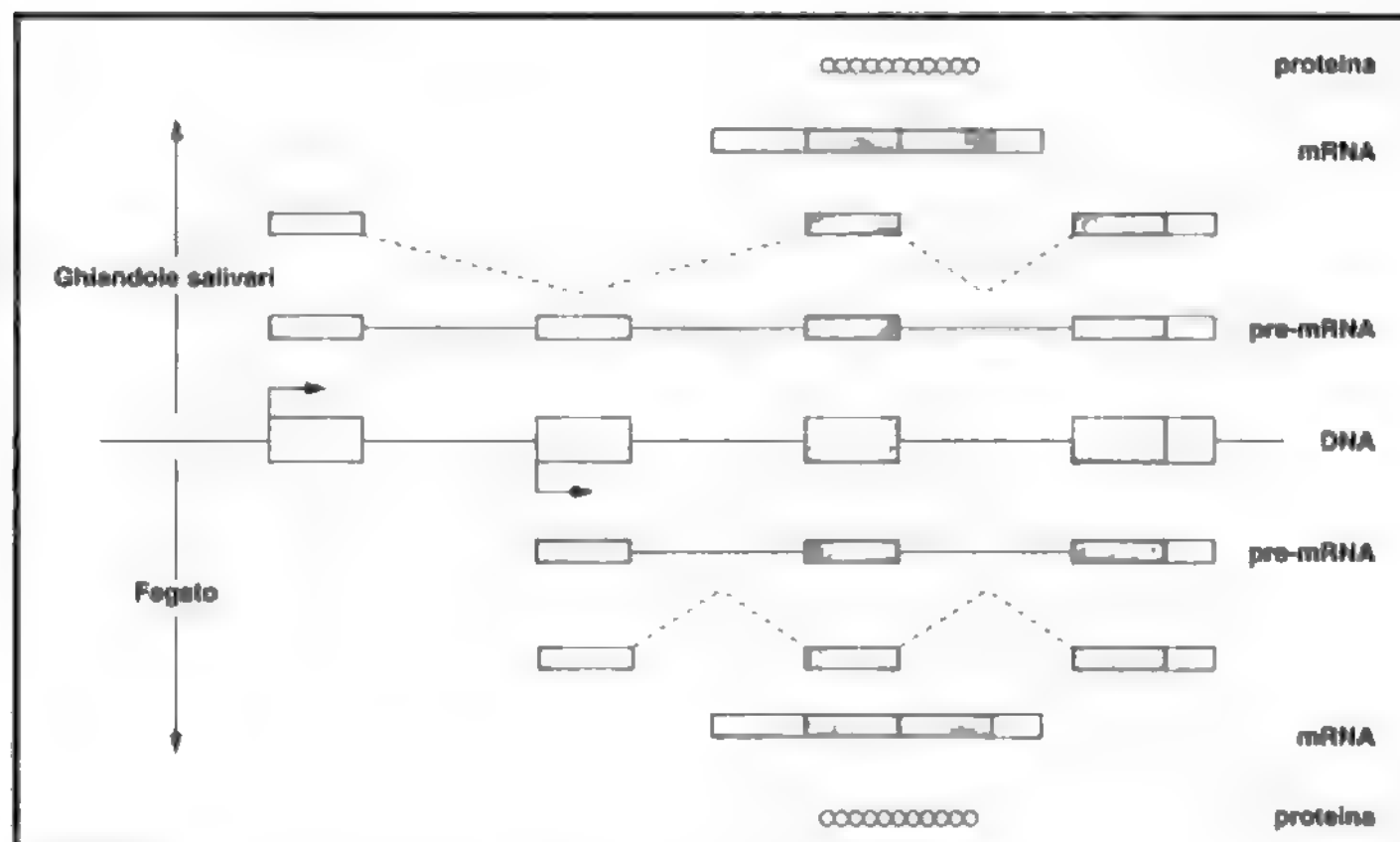


Fig. 1. I geni eucariotici sono spesso interrotti da regioni non codificanti (*introni*) che separano le regioni codificanti (*esoni*). Dopo la trascrizione, le sequenze *introniche* vengono rimosse dal trascritto primario (*pre-mRNA*) mediante un meccanismo di *splicing*, e così viene prodotto l'RNA messaggero maturo (*mRNA*). Successivamente l'*mRNA* è trasferito dal nucleo al citoplasma per essere tradotto in proteina dall'apparato di sintesi proteica.

Fig. 2. Il gene (DNA) per l'enzima α -amilasi del ratto ha due promotori attivi, rispettivamente, nelle cellule delle ghiandole salivari e del fegato. I due trascritti primari vengono maturati in modo da produrre due mRNA differenti nella regione iniziale non tradotta, ma identici nella regione tradotta e che producono quindi la stessa proteina nei due tipi cellulari.



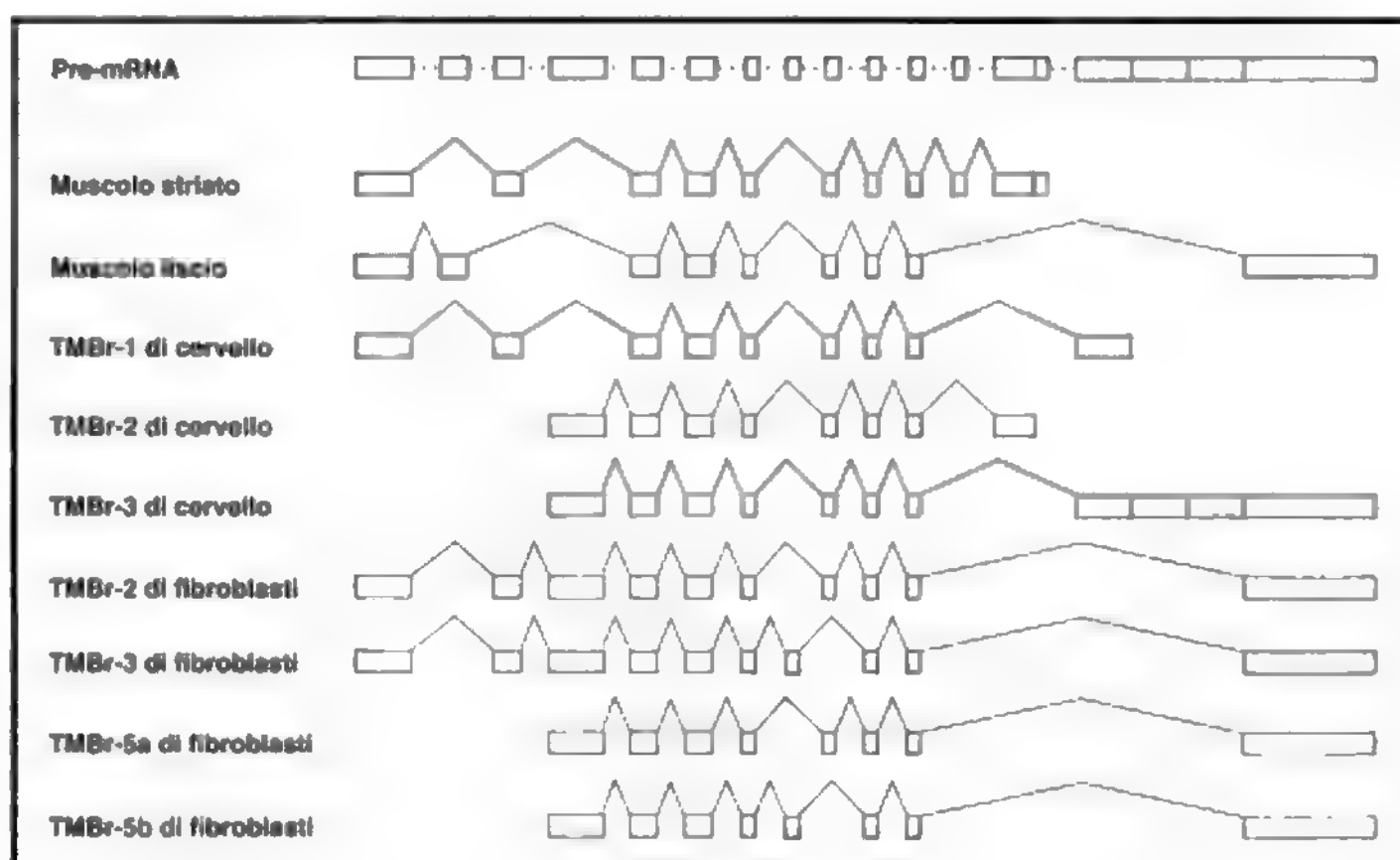
questo caso la particolare organizzazione genomica con geni ospiti negli introni di altri geni, ha un ruolo di regolazione.

Più frequenti sono i casi in cui mediante vie alternative di processamento (*splicing* alternativo [v.**]) una regione genomica porta alla formazione di due o più mRNA in parte uguali e in parte diversi. In questa situazione una sequenza che è intronica rispetto alla formazione di un RNA sarà invece esonica rispetto alla formazione di un RNA alternativo. Gli mRNA così prodotti possono codificare proteine identiche ma sotto diverso controllo, o proteine più o meno diverse tra loro. Un bell'esempio della prima situazione è dato dalla α -amilasi, un enzima sintetizzato nelle ghiandole salivari e nel fegato. Nel ratto, a monte dell'unico gene per questo enzima, vi sono due promotori, uno attivato specificamente nelle ghiandole salivari, l'altro nel fegato (fig. 2). I due pre-mRNA vengono poi maturati in modo da dare origine a due mRNA che, pur diversi nella

regione iniziale non codificante, sono identici nella regione codificante e porteranno quindi alla sintesi della stessa proteina nei due differenti organi (Sierra *et al.*, 1986). È chiaro che una organizzazione genica esoni/introni è necessaria per permettere questo tipo di controllo.

Più spesso, fenomeni di *splicing* alternativo permettono di ottenere da un unico trascritto primario due o più RNA messaggeri maturi che codificano per varianti della stessa proteina. Un esempio che può mostrare quanto possa essere complessa la situazione, è dato dal gene per la α -tropomiosina, una proteina coinvolta in processi di contrazione e movimento cellulare. Di questa proteina ne esistono una decina di tipi che assolvono a specifici compiti in diversi tipi di cellule dell'organismo, nel muscolo striato, nel muscolo liscio, nel cervello e nei fibroblasti. Ci si sarebbe potuto aspettare la presenza di vari geni, uno per ciascuna forma di α -tropomiosina. Al contrario è stato trovato un solo gene, costituito da quattordici esoni (fig. 3). Il trascritto

Fig. 3. Il gene per la α -tropomiosina è costituito da numerosi esoni e introni. Gli introni, indicati nel pre-mRNA con linea tratteggiata, sono stati per semplicità disegnati tutti uguali; in realtà sono di lunghezza variabile e, in genere, più lunghi di come indicato. Il pre-mRNA è uguale nei vari tipi cellulari dove è espresso ma, come indicato, viene maturato in maniera diversa in modo da produrre proteine con porzioni comuni e porzioni diverse. TMBr) Tropomiosina di cervello.



primario è uguale in tutti i suddetti tipi cellulari ma, mediante *splicing* alternativi, viene maturato diversamente in modo da produrre proteine identiche in parte della loro struttura, ma differenti in altre regioni (Lees-Miller *et al.*, 1990).

Situazioni analoghe di *splicing* alternativi in relazione al controllo della attività genica sono molto frequenti (Smith *et al.*, 1989).

Funzione evolutiva degli introni

Il grande numero di introni nel genoma degli eucarioti superiori e la loro lunghezza spesso enorme non sembrano giustificati in ogni caso da specifiche funzioni del tipo di quelle descritte che rendono conto, per quanto ne sappiamo, solo di una minima parte di essi. Così verso la fine degli anni '70, poco dopo la loro scoperta, è stato proposto da W. Gilbert che gli *introni* abbiano un ruolo importante nella produzione di geni per nuove proteine nel corso dell'evoluzione (Gilbert, 1985).

L'osservazione di Gilbert parte dalla constatazione che, considerando la struttura e la funzione delle proteine attuali, possiamo spesso distinguervi più di una regione, o dominio, strutturale e funzionale. Magari un dominio lega un certo substrato, un'altro dominio lo modifica, un terzo lega un qualche ligando regolatore e così via. Un modo per produrre evolutivamente nuove proteine, senza dovere ripartire da zero, è sicuramente quello di ricombinare geni diversi riarrangiando frammenti di DNA, come avviene ad esempio nelle traslocazioni, duplicazioni e inversioni. Si può ottenere così una nuova proteina, uguale in parte a una e in parte a un'altra proteina preesistenti. Data però la struttura a domini funzionali delle proteine, risulterebbe vantaggioso un meccanismo che impedisse, o per lo meno diminuisse, la probabilità che le ricombinazioni risultino nella rottura dei domini, e che favorisse invece la ricombinazione di domini strutturali e funzionali interi. Poiché i fenomeni di «rottura e scambio» tra molecole di DNA avvengono per lo più in maniera casuale lungo le due molecole, risulta evidente che la presenza di lunghi *introni* possa svolgere questo ruolo se il loro posizionamento all'interno dei geni fosse non casuale ma tale da separare tra loro le regioni che codificano per i vari domini. Pur non essendo facile dimostrare direttamente questa ipotesi di «rimescolamento degli *esoni*» («*exon shuffling*»), essa sembra confermata dall'osservazione che molto spesso gli *introni* si

trovano localizzati nei geni in modo da non rompere le regioni che codificano per i vari domini proteici, ma piuttosto in modo da separarle una dall'altra (Gilbert e Glynias, 1993). Che questo sia uno dei meccanismi di evoluzione di nuove proteine è suggerito anche dal fatto che spesso proteine diverse hanno alcuni domini in comune. Certi domini strutturali e funzionali sono ripetuti più volte nella stessa proteina o in proteine diverse (fig. 4), come se l'evoluzione preferisse creare del nuovo, non partendo da zero, ma da pezzi prefabbricati e ricombinandoli tra loro.

Per quanto riguarda l'origine evolutiva degli *introni*, l'ipotesi di «rimescolamento degli *esoni*» porta a pensare che gli *introni* non sarebbero comparsi tardivamente durante la storia evolutiva sulla Terra, ma sarebbero stati presenti fin da tempi molto precoci (Darnell e Doolittle, 1986). La vita non sarebbe iniziata con geni per proteine complesse, ma con sequenze codificanti per piccoli domini funzionali (quindi *esoni*) che ricombinandosi e mescolandosi tra loro avrebbero permesso non solo l'inizio ma anche una continua evoluzione di nuove proteine.

Bisogna dire che non tutti gli AA. sono d'accordo su questa visione della funzione degli *introni* e su questa ipotesi che l'organizzazione *esonintronica* sia una caratteristica precoce della evoluzione, poi andata persa negli organismi che non la hanno come i procarioti. Infatti, ci sono anche evidenze contrarie, che gli *introni* siano un'acquisizione evolutivamente tarda e che tutt'ora ne entrerebbero occasionalmente di nuovi (Logsdon *et al.*, 1994). Non si può escludere che ambedue le ipotesi siano in parte valide.

Introni, grandezza del genoma ed evoluzione

Quanto abbiamo detto rende conto in parte di una osservazione che va sotto il nome di «paradosso del valore C» (quantità di DNA per genoma aploide). È noto che la quantità di DNA che costituisce il genoma di una specie ha poca relazione con la complessità dell'organismo anche se, grosso modo, una cellula di un animale superiore ha in genere cento volte più DNA di una cellula di una muffa e questa, grosso modo, 10 volte più di una cellula batterica. Si hanno molti esempi di organismi tra loro filogeneticamente molto vicini e di apparente simile complessità strutturale e funzionale, che presentano però considerevoli differenze di quantità di DNA per genoma. Se andiamo a considerare questi genomi a livello di sequenza di basi del DNA, vediamo che ciò che conferisce questa variabilità della quan-



Fig. 4. Rappresentazione schematica di alcune proteine umane che presentano domini strutturali in comune. Domini diversi sono indicati con simboli diversi.

tità di DNA per genoma è soprattutto la lunghezza delle sequenze non codificanti che separano un gene dall'altro e la lunghezza degli *introni*. La tendenza in alcune specie all'allungamento di queste regioni genomiche apparentemente inutili, e la tendenza all'accorciamento in altre specie, riflette probabilmente dei vantaggi selettivi per una condizione o per l'altra. Particolarmente interessante è il caso del pesce delle acque giapponesi *Fugu rubripes*, che tra i Vertebrati finora analizzati rappresenta la specie che contiene la minore quantità di DNA per genoma, circa un ottavo del genoma umano. Il genoma del *Fugu*, confrontato con quello degli altri Vertebrati e in particolare dell'uomo, presenta sostanzialmente lo stesso numero di *introni* che si trovano negli altri Vertebrati ma molto più corti, ridotti in genere a poche decine di basi (Brenner *et al.*, 1993). Si potrebbe pensare che questo genoma compatto sia in relazione alla situazione evolutiva di questa specie molto specializzata, ben adattata a un suo ambiente stabile, e quindi evolutivamente quasi immobile. Il confronto tra i geni di questa specie e quelli di Vertebrati a più alto contenuto di DNA come l'uomo, permette di identificare quali sequenze introniche abbiano una funzione specifica e quali siano invece dispensabili.

Bibliografia

- Brenner S., Elgar G., Sandford R. *et al.*, *Nature*, 1993, **366**, 265.
 Chambon, P., *Sci. Am.*, 1981, **244**, 60.
 Darnell J. E., Doolittle W. F., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, **83**, 1271.
 Henikoff S., Keene M. A., Fechtel K., Friston J. W., *Cell*, 1986, **44**, 33.
 Gilbert W., *Science*, 1985, **228**, 823.
 Gilbert W., Glynias M., *Gene*, 1993, **135**, 137.
 Lees-Miller J. P., Goodwin L. O., Helfman D. M., *Mol. Cell. Biol.*, 1990, **10**, 1729.
 Maxwell E. S., Fournier M. J., *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, **35**, 897.
 Logsdon J. M., Palmer J. D., Stoltzfus A. *et al.*, *Nature*, 1994, **369**, 526.
 Sierra F., Pittet A.-C., Schibler U., *Mol. Cell. Biol.*, 1986, **6**, 406.
 Smith C. W. J., Patton G., Nadal-Ginard B., *Ann. Rev. Gen.*, 1989, **23**, 527.
 Witkowski J. A., *Trends Biochem. Sci.*, 1988, **13**, 110.

FRANCESCO AMALDI

GENOMA UMANO

1. *human genome*.

SOMMARIO

Il Progetto Genoma Umano: i primi 6 anni (col. 2477). - **Mappa genetica** (col. 2478). - **Mappa fisica** (col. 2484). - **Identificazione di geni: le EST** (col. 2486). - **Sequenziamento del DNA** (col. 2489). - **Banche dati** (col. 2490). - **Ricadute nel campo della salute** (col. 2490).

Il Progetto Genoma Umano: i primi 6 anni

Alla metà degli anni '80 l'eccezionale sviluppo delle tecniche del DNA ricombinante (v. CLONE E CLONAZIONE*; INGEGNERIA GENETICA [v.; v.*]; GENETICA**, col. **2405), ma soprattutto l'enorme quantità di informazioni che si cominciavano ad ottenere dalla conoscenza della sequenza del DNA hanno suggerito ad un gruppo di biologi e genetisti che era giunto il tempo per la ricerca biomedica di fare il grande salto qualitativo e passare dai piccoli progetti fatti da tanti piccoli gruppi all'ambizioso progetto di sequenziare tutto il genoma umano [g. u.]. Parafrasando quello che era avvenuto precedentemente nel campo della fisica, era giunto il tempo anche in campo biomedico di passare alla «Big Science».

Questa proposta ha immediatamente scatenato discussioni accesiissime con fazioni entusiasticamente favorevoli al progetto e fazioni altrettanto decisamente contrarie. A mano a mano però, mentre il progetto si delineava meglio nei suoi scopi, le polemiche si sono affievolite e nel 1990

negli USA è stato approvato il Progetto Genoma Umano, finanziato in parte dall'NIH (National Institute of Health) e in parte dal DOE (USA Department of Energy), con un finanziamento quinquennale (US Human Genome Project, 1990). Come direttore, l'NIH nominò uno dei promotori del Progetto Genoma, il premio Nobel Jim Watson, lo scopritore insieme a Francis Crick della struttura del DNA (v. NUCLEICI ACIDI [v.; v.*]). Jim Watson fu sostituito tre anni dopo dall'attuale direttore, Francis Collins.

Lo scopo del progetto è quello di sequenziare tutto il g. u. ed identificare tutti i geni umani. La prevedibile ricaduta è che la conoscenza di tutti i geni umani faciliterà l'identificazione dei geni responsabili di malattie e lo studio delle loro interazioni. Inoltre, la disponibilità della sequenza completa del g. u. porterà a ricercare e identificare nuovi elementi del DNA, elementi di controllo dell'espressione genica, della replicazione del DNA e quant'altro.

Tuttavia, le previsioni di tempi e costi di un progetto del genere misero ben presto in chiaro che non era possibile partire subito con la sequenza perché le tecniche erano ancora troppo rudimentali e costose e l'analisi della sequenza veniva ancora praticamente fatta ad occhio. Il progetto comprendeva quindi sin dall'inizio la costruzione di mappe fisiche e genetiche del g. u. per le quali la tecnologia era molto più avanzata e la cui fattibilità era quindi più alta. In questa prima fase del progetto si sarebbe preparato il materiale da sequenziare mentre contemporaneamente si sarebbero dovute sviluppare sia nuove metodologie di sequenza più efficienti e meno costose sia *computers* e *software* per l'immagazzinamento e l'analisi dell'enorme quantità di sequenze che sarebbero state prodotte. Il progetto genoma fu iniziato negli USA, con un finanziamento quinquennale del NIH/DOE (v. sopra), ma progetti più o meno grandi partirono in tutto il mondo, anche in Italia, nell'ambito del CNR. L'Unione Europea finanziò un progetto Genoma Umano dal 1991, nell'ambito del programma Biomed 1. In Europa, il maggior contributo venne dall'AFM, l'Association Française des Myopathies, che tramite la raccolta fondi televisiva Telethon, poté fondare l'Istituto Génethon, a Ivry alla periferia di Parigi, e finanziare i gruppi che diedero tra i maggiori contributi alla costruzione della mappa fisica e soprattutto della mappa genetica.

Nella fig. 1 vengono sintetizzate le principali strategie e approcci scientifici utilizzati nel Progetto Genoma Umano.

Mappa genetica

La costruzione della *mappa genetica dell'uomo* è una delle parti del Progetto Genoma che si può dire conclusa, nelle sue linee essenziali. La *mappa genetica*, a differenza della *mappa fisica* che stabilisce le distanze in numero di basi, ci permette di conoscere le distanze in unità di misura genetiche (o in unità di ricombinazione) e quindi di localizzare qualsiasi *locus* in base alla sua trasmissione nelle generazioni successive in associazione più o meno stretta con altri *loci*.

Nel Vol. 380 della rivista *Nature*, del 14 marzo 1996 (Dib *et al.*, 1996), è stata pubblicata l'ultima versione della mappa genetica sviluppata in Francia dal gruppo di Jean Weissenbach a Génethon. Questa mappa, basata su 5264 marcatori genetici altamente informativi, copre tutto il g. u. che risulta di 3699 cM (centiMorgan).

La svolta fondamentale per arrivare a questo risultato è stata la scoperta, avvenuta circa venti anni fa, di marcatori genetici evidenziabili direttamente a livello del DNA e fenotipicamente neutri e il suggerimento di D. Botstein *et al.* (1980) che le variazioni di sequenza del DNA potevano diventare una sorgente di variabilità genetica da utilizzare nello studio dell'eredità. A partire dalla scoperta delle RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*: muta-

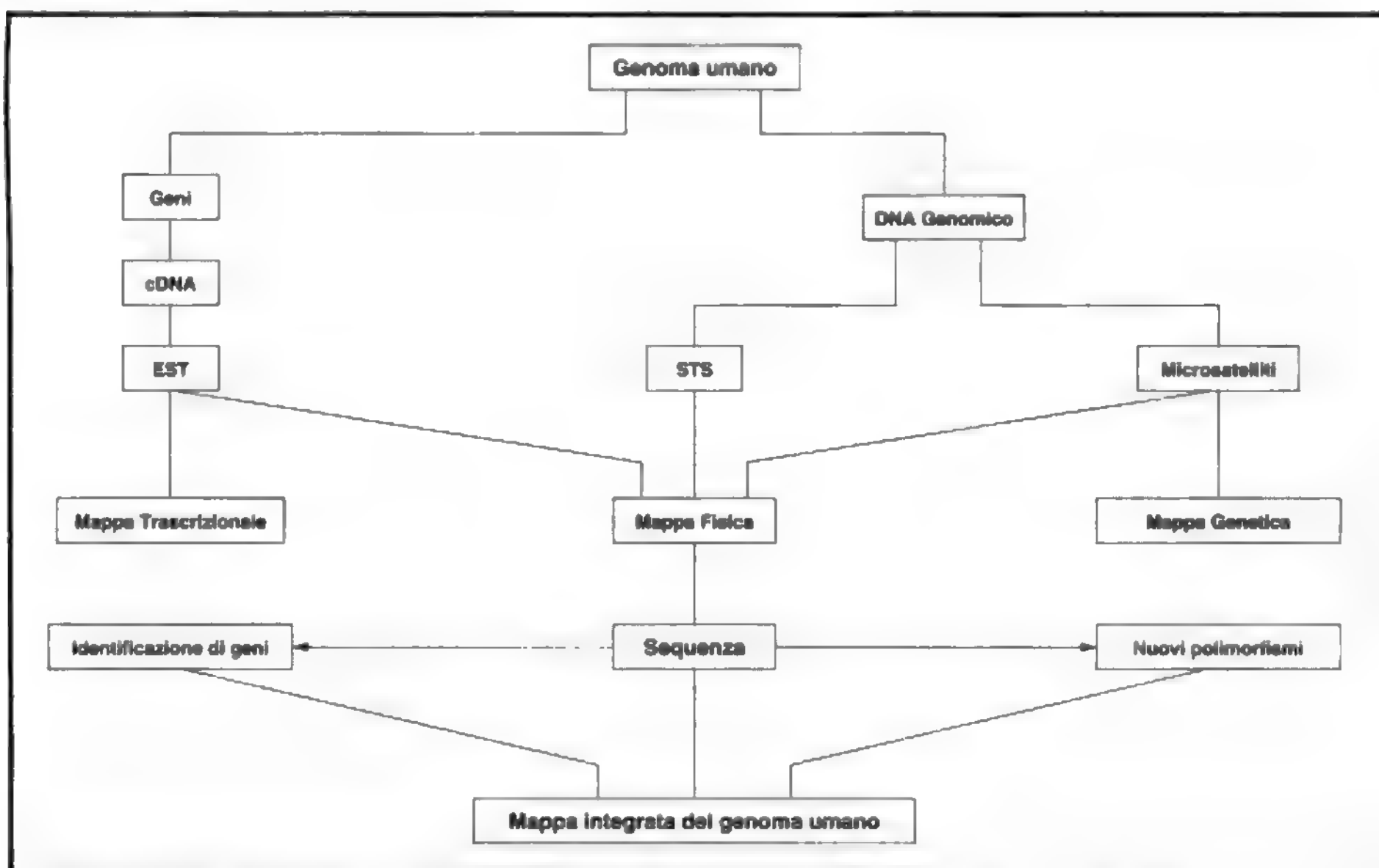


Fig. 1. Schema delle principali strategie utilizzate nel Progetto Genoma Umano. EST: *Expressed Sequence Tags*. STS: *Sequence Tags Sites* (v. testo).

zioni in siti di riconoscimento per enzimi di restrizione che causavano la comparsa/scomparsa nel DNA genomico di specifici siti di restrizione, evidenziabili con una sonda di DNA; v. POLIMORFISMI GENETICI [v.; v.*]; SONDE MOLECOLARI [v.*; v.**]) sono stati trovati molti altri marcatori di questo tipo che sono cioè evidenziabili a livello di DNA, e che presentano una distribuzione in prima approssimazione uniforme lungo i cromosomi e non dovrebbero essere selezionati o selezionabili, in quanto non cadono in regioni codificanti. Questi marcatori hanno fatto salire di diversi ordini di grandezza il numero dei marcatori genetici utilizzabili e hanno reso la costruzione di mappe genetiche informative una realtà.

Il difetto delle RFLP, di essere per lo più poco informative, è stato superato dalla scoperta di polimorfismi associati a microsatelliti (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). I *microsatelliti*, ripetizioni più o meno lunghe di sequenze semplici, hanno infatti il grande vantaggio di presentare nelle popolazioni diversi alleli di lunghezza e quindi un livello di eterozigotità anche molto alto. I polimorfismi più informativi e che alla fine sono stati i più usati sono quelli associati a variazioni di lunghezza di corte ripetizioni di due o quattro basi. Di questi la più frequente nel genoma dei mammiferi (circa 100.000 copie/genoma aploide) è la ripetizione del dinucleotide AC/ TG che è anche la più frequentemente polimorfica.

Le mappe genetiche più recenti sono basate essenzialmente su di- e tetra-nucleotidi. La ricerca dei microsatelliti viene fatta con relativa facilità, mediante l'uso di sequenze di genoteche [v.**] di corti frammenti di DNA contenenti la ripetizione e identificati mediante ibridazione. Dalla sequenza nucleotidica del DNA fiancheggiante la ri-

petizione vengono disegnati oligonucleotidi sintetici capaci di funzionare da «primer» (innesci) nella reazione di amplificazione per PCR [v.*; v.**] della ripetizione. I frammenti di PCR vengono analizzati in gel di acrilamide denaturanti (simili a quelli usati per la sequenza del DNA) capaci di distinguere differenze di lunghezza anche di una sola ripetizione (due o quattro basi). L'analisi genetica viene fatta sui DNA di un gruppo di famiglie selezionate. Queste famiglie, molto grandi, sono state collezionate a questo scopo in Francia al CEPH (Centre du Polymorphism Humain) e sono utilizzate da tutti i gruppi che si occupano di analisi genetica. In questo modo, i dati genetici di laboratori diversi sono direttamente paragonabili.

Un secondo vantaggio dei microsatelliti per l'analisi genetica, è la possibilità di automazione di tutte le procedure di analisi (Gyapay *et al.*, 1994). Le reazioni di PCR possono essere preparate da un robot e il DNA può essere marcato con fluorocromi in modo che i gel possano essere letti da un laser e analizzati da software associati al gel di sequenza. In questo modo è stato possibile ad alcuni gruppi, come appunto il gruppo di G  n  thon, di aumentare di diversi ordini di grandezza il numero di marcatori analizzabili. Nel giro di 4-5 anni, nel 1992, il gruppo di G  n  thon ha prodotto la prima mappa genetica basata su 814 microsatelliti (Wessimbach *et al.*, 1992). In seguito con lo sviluppo di altri marcatori ne    stata pubblicata una seconda che ne conteneva altri 2014 (Gyapay *et al.*, 1994) e infine la mappa finale pubblicata nel 1996 (Dib. *et al.*, 1996). L'evoluzione delle metodologie e le possibilit   di automazione sono state tali che contemporaneamente    stata costruita, utilizzando lo stesso tipo di marcatori, anche la mappa genetica del topo (Dietrich *et al.*, 1995) e il mammifero modello la cui genetica    pi   avanzata.

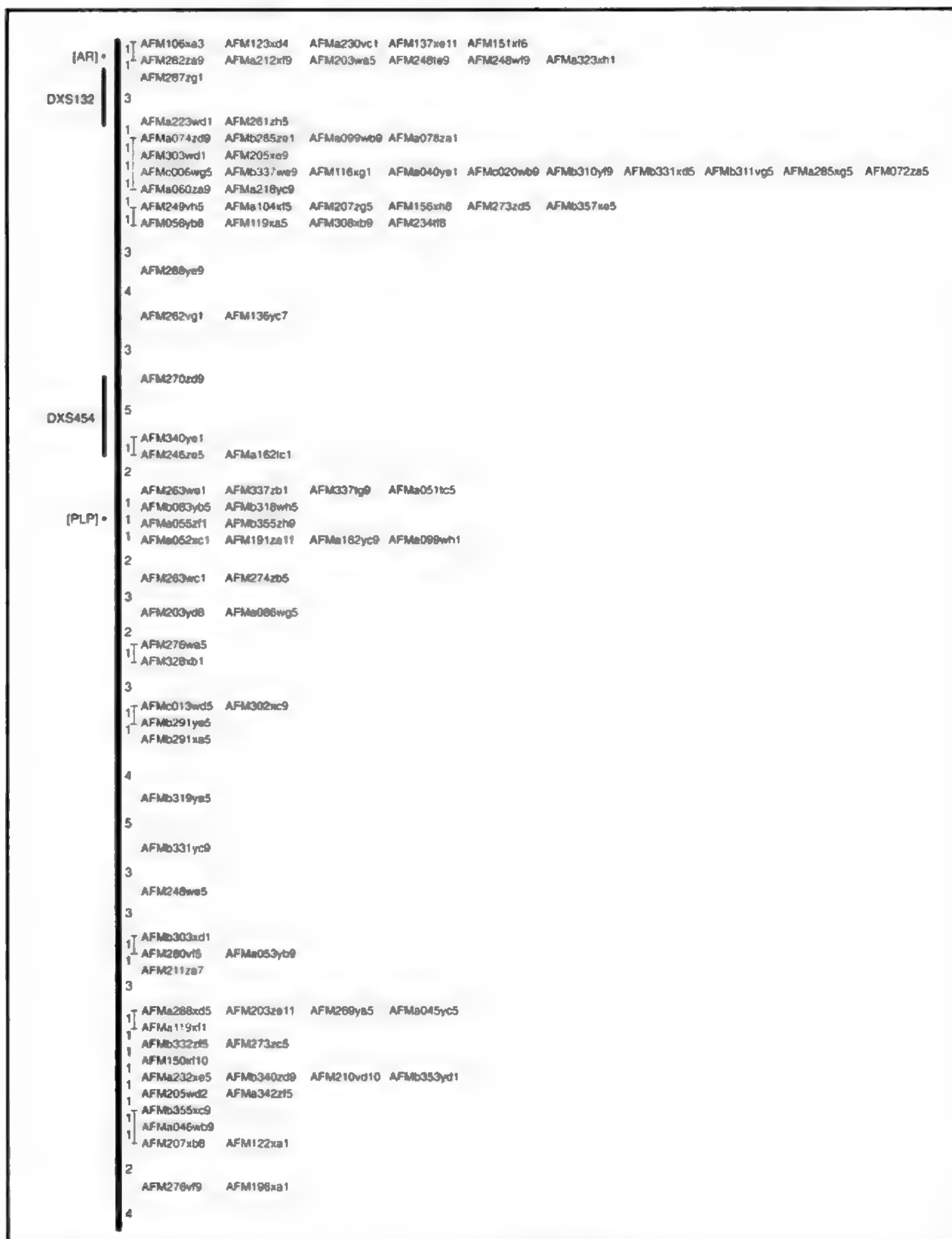


Fig. 2. Esempio di mappa genetica di una parte del cromosoma X umano. Sulla sinistra sono alcuni marcatori noti, sulla destra i marcatori sviluppati da Genethon. I numeri rappresentano le distanze in cM. (Da Dib et al., *Nature*, 1996, **380**, 154; extended reprint [tab. 1, A 126, <http://www.genethon.fr>]).

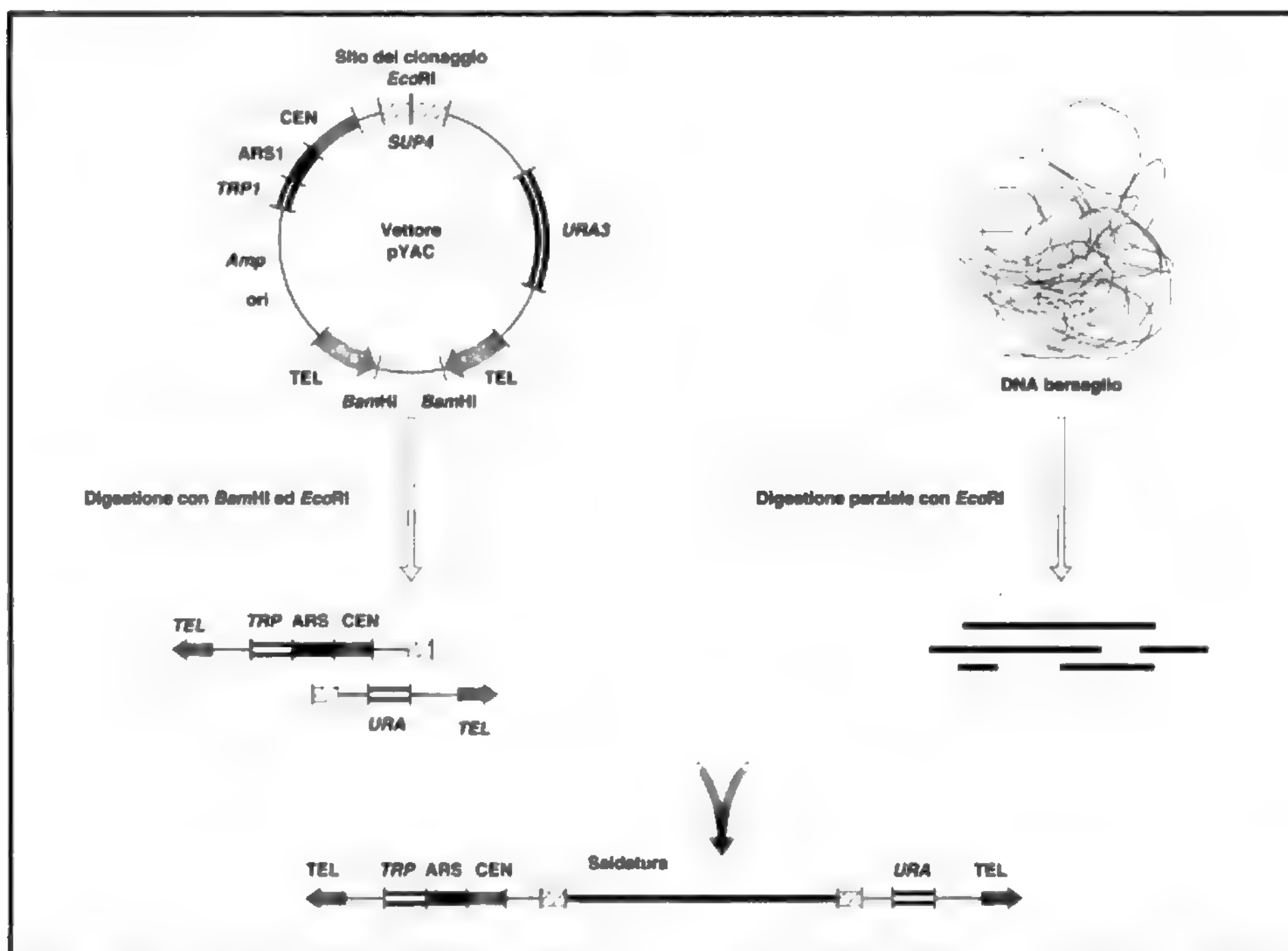


Fig. 3. Clonaggio in YAC. Le sequenze di DNA del vettore includono: CEN: sequenza centromerica; TEL: sequenze telomeriche; ARS1: origine di replicazione; Amp: gene che conferisce resistenza all'ampicillina; ori: origine di replicazione per la propagazione in *E. coli*. Il vettore è utilizzato in una cellula ospite di lievito specializzata, AB1380, che è di colore rosso perché porta una mutazione *ochre* in un gene, *ade-2*, coinvolto nel metabolismo dell'adenina, la quale determina l'accumulo di un pigmento rosso. Nelle cellule ospiti è prevista anche la presenza degli alleli recessivi *trp1* e *ura3*, che possono essere complementati dagli alleli corrispondenti *TRP1* e *URA3*. (Da T. Strachan e A. P. Read, 1997).

Quali sono quindi i problemi rimasti aperti? Prima di tutto c'è l'integrazione delle mappe genetiche più nuove costruite in maniera uniforme e basate sullo studio dell'eredità di marcatori in un gruppo ben determinato di famiglie, con gli altri marcatori genetici usati in precedenza o in parallelo (polimorfismi legati a geni, RFLP e altri microsatelliti). Questa integrazione in parte è stata fatta (Dib *et al.*, 1996) con metodi genetici e sicuramente potrà essere completata a livello della mappa fisica a cui si possono aggiungere più facilmente i diversi tipi di marcatori (v. sotto). Il problema maggiore è quello del topo dove le mutazioni collezionate negli anni e che potrebbero servire come modelli per malattie genetiche umane devono ancora venire integrate alla mappa genetica. Purtroppo, la mappa fisica del topo non è ancora a uno stadio molto avanzato.

Il secondo punto da ricordare è che la distribuzione dei marcatori genetici non è completamente uniforme: i 5264 marcatori sono distribuiti in 2500 posizioni con un intervallo medio tra loci di 1,6 cM. Il 59% della mappa è coperta da marcatori posti ad un intervallo di 2 cM e il 92% da intervalli fino a 5 cM. Solo l'1% contiene pochi marcatori con intervalli superiori a 10 cM. In alcuni casi quindi potrà essere necessario identificare altri marcatori localizzati in

specifiche regioni del genoma per un'analisi più accurata di una particolare regione di interesse.

Mappa fisica

Dopo un primo periodo durante il quale sono state prese in considerazione diverse strategie, la costruzione della mappa fisica del g. u. si è sviluppata anche più velocemente del previsto e la prima mappa di un intero cromosoma, quella del cromosoma Y, è stata pubblicata nel 1992 (Foote *et al.*, 1992). Una mappa di tutto il genoma e mappe dettagliate di alcuni cromosomi sono state pubblicate in *Nature* nel 1995 (The Genome Directory, 1995; v. anche Genome Maps, 1997).

La costruzione della mappa fisica del g. u. è basata sulle cosiddette STS (*Sequence Tags Sites*) e sulle genoteche in YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*).

Le STS sono corte sequenze di DNA uniche da cui sono ricavati oligonucleotidi sintetici da usare come *primers* per reazioni di PCR; la presenza di una STS su un particolare regione di DNA è rivelata dalla presenza di un frammento specificamente amplificabile con una coppia di *primers* (Olson *et al.*, 1989). Il vantaggio dell'uso delle STS è che si tratta di marcatori facilmente utilizzabili in tutti i laboratori, e conservabili nelle Banche Dati.

Gli YAC sono vettori bifunzionali capaci di propagazione sia in *Escherichia coli* che nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Burke *et al.*, 1987). Mentre in *E. coli* si propagano in maniera tradizionale come qualsiasi altro plasmide circolare, in *S. cerevisiae* sono capaci di propagarsi come un cromosoma lineare soprannumerario. Sono infatti costruiti in modo da contenere tutti gli elementi necessari per la propagazione di un cromosoma di lievito (telomeri, un centromero e un'origine di replicazione) oltre a marcatori selezionabili in lievito (URA e TRP) e siti di clonaggio e di linearizzazione. Il sito di clonaggio contiene inoltre un marcatore che rivela la presenza di un inserto di DNA al sito di clonaggio. Nel caso più usato, si tratta di un gene soppressore che, quando inattivato, rende il lievito incapace di utilizzare l'adenina. Crescendo in presenza di adenina le cellule accumulano un precursore di colore rosso che rende le colonie ricombinanti appunto rosse e facilmente identificabili. Una schema di un vettore YAC (pYAC) è mostrato nella fig. 3. Poiché i cromosomi artificiali in lievito sono tanto più stabili tanto più grande è il frammento di DNA clonato, è possibile clonare in questo sistema frammenti di DNA da 100 kb in su. Il limite superiore dipende quasi solo dalla qualità del DNA genomico che si riesce ad ottenere e che naturalmente deve essere ad altissimo peso molecolare: questa non è proprio una cosa facile da ottenere. Tuttavia anche in questo campo le tecniche sono andate rapidamente migliorando e la grandezza degli inserti delle genoteche in YAC è progressivamente aumentato dai 150-200 kb della prima genoteca costruita a St. Louis (USA) da Maynard Olson (1989) a circa una megabase nell'ultima genoteca costruita al CEPH, la cosiddetta *MegaYAC Library* (The Genome Directory, 1995).

Un problema, associato alle caratteristiche stesse di questo sistema è quello dei *coclonaggi*: regioni di DNA provenienti da cromosomi diversi sono infatti spesso presenti in uno stesso YAC. Poiché la loro presenza sembra per lo più dovuta a selezione in lievito di cloni grandi e alla difficoltà di preparare DNA ad alto peso molecolare, non si è potuto eliminare tali regioni. Tuttavia, mentre i coclonaggi sono stati un grave problema per alcuni dei metodi di mappaggio come il *fingerprinting* (v. GENETICA**, *DNA fingerprinting*) o le varie tecniche basate sull'ibridazione di interi YAC o prodotti di interi YAC, l'analisi degli YAC per contenuto in STS rivela facilmente e inequivocabilmente le porzioni in comune tra due YAC e le parti coclonate.

La mappa pubblicata nel supplemento a *Nature* del 28 settembre 1995 (The Genome Directory, 1995) si basa essenzialmente sulle Genoteche in YAC costruite al CEPH da D. Cohen e collaboratori, e analizzate per *fingerprinting*, ibridazione con prodotti di Alu-PCR preparati da interi YAC, e soprattutto contenuto in STS.

Mappe più dettagliate sono state presentate per alcuni cromosomi (3, 12, 16, 21 [fig. 4], e 22). Poiché i microsatelliti della mappa genetica sono praticamente delle STS, in queste mappe sono stati integrati anche tutti i marcatori genetici della mappa di G  n  thon e altri, contribuendo quindi all'integrazione tra la mappa genetica e la mappa fisica.

Come sono state costruite queste mappe? Le STS sono state preparate fondamentalmente come descritto precedentemente per i marcatori genetici. I cloni di una genoteca di corti frammenti di DNA genomico (in media 500 b.p. [base pair], paio di basi) non ripetuto sono stati sequenziati. Dalla sequenza vengono ricavate delle coppie di *primer* capaci di amplificare corti frammenti genomici (200-300 b.p.), unici. Le reazioni di PCR sono utilizzate per identificare gli YAC contenenti le STS da *pools* di DNA di YAC. Una genoteca in YAC    costituita infatti tipicamente da circa 35.000 cloni indipendenti ordinati in piastre *microtiter*:

i DNA degli YAC sono preparati da *pools* organizzati in diversi livelli in modo tale da identificare il clone contenente ciascuna STS con un numero minimo di reazioni di PCR, in genere una quarantina. Anche in questo caso l'uso della PCR ha permesso una forte automazione del processo e l'identificazione e l'analisi di un grandissimo numero di STS e di YAC. La mappa completa contiene circa l'80% del g. u., clonato in YAC e ordinato in 225 contigui (The Genome Directory, 1995).

L'obiettivo finale    quello di ottenere una mappa fisica costituita da poco pi  di 23 contigui di cloni (tanti sono infatti i cromosomi umani), contenente STS spaziate di solo 100 kb, cio  circa 30.000 STS. Questo obiettivo richieder  quindi lo sviluppo di ancora molte STS: si pu  calcolare infatti che per arrivare ad ordinare una tale densit  di marcatori sar  necessario svilupparne almeno 10 volte di pi . A questo completamento della mappa   stato tuttavia almeno in parte ovviato mediante l'uso delle EST come marcatori (v. sotto).   probabile inoltre che una mappa completa non potr  essere costruita utilizzando un solo vettore e in un solo organismo, gli YAC e il lievito: ci sono infatti regioni del genoma pi  difficili da clonare e che potrebbero non essere clonabili in lievito. Oltre alle ormai classiche genoteche cromosoma-specifiche in cosmidi, sono quindi in via di sviluppo e in parte gi  disponibili genoteche che utilizzano vettori di *E. coli* capaci di clonare frammenti di diverse centinaia di kb (100-300 kb). Tali vettori, detti PAC (*P1 Artificial Chromosomes*; Gingrich *et al.*, 1996) e BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*; Kim *et al.*, 1994) sono basati su particolari elementi extracromosomali di *E. coli*, ingegnerizzati per funzionare da vettori per la costruzione di genoteche. Si spera possano aiutare a chiudere i «buchi» che rimarranno nella mappa basata esclusivamente in YAC. L'ulteriore vantaggio di questi nuovi vettori   la possibilit  di usarli direttamente per il sequenziamento (v. sotto).

Identificazione di geni: le EST

Uno degli scopi del Progetto Genoma Umano, e forse il principale,   quello di identificare tutti i geni umani. Una strategia di identificazione di geni che ha avuto un grandissimo successo   stata proposta da Craig Venter (Adams *et al.*, 1991), allora all'NIH. Il sequenziamento parziale, a partire dalle estremit  di cloni di cDNA orientati, estratti in modo completamente randomizzato da genoteche di cDNA normalizzate (Soares *et al.*, 1994), fornisce delle corte sequenze nucleotidiche capaci di identificare univocamente i trascritti corrispondenti. Queste sequenze, denominate EST (*Expressed Sequence Tags*), rappresentano un metodo estremamente rapido e preciso di identificazione di geni e una risorsa fondamentale per il mappaggio dei geni e per l'identificazione dei geni da grandi sequenze di DNA genomico. Questa   stata veramente una strategia vincente. Prima del 1991 e dello sviluppo delle EST esistevano dati di sequenza su circa 3000 geni umani. Nel gennaio del 1995, c'erano nelle banche dati circa 5100 geni umani (*GenBank release 86*) e pi  di 25.000 EST (*dbEST release 3.0*). Oggi (novembre 1996) ci sono pi  di 450.000 EST umane in dbEST (Schuler *et al.*, 1996). Due gruppi si sono principalmente dedicati allo sviluppo di EST. Il gruppo di C. Venter ha sequenziato pi  di 200.000 cloni da pi  di 300 genoteche di cDNA preparate da diversi tessuti, linee cellulari e stadi di sviluppo. Lo stesso ha fatto il gruppo della Washington University di St. Louis, MS. Mentre il gruppo di C. Venter ha cercato di brevettare le sequenze di cDNA prima di renderle pubbliche, depositandole in GenBank, il gruppo della Washington University ha avuto un finanziamento dalla Merck, una multinazio-

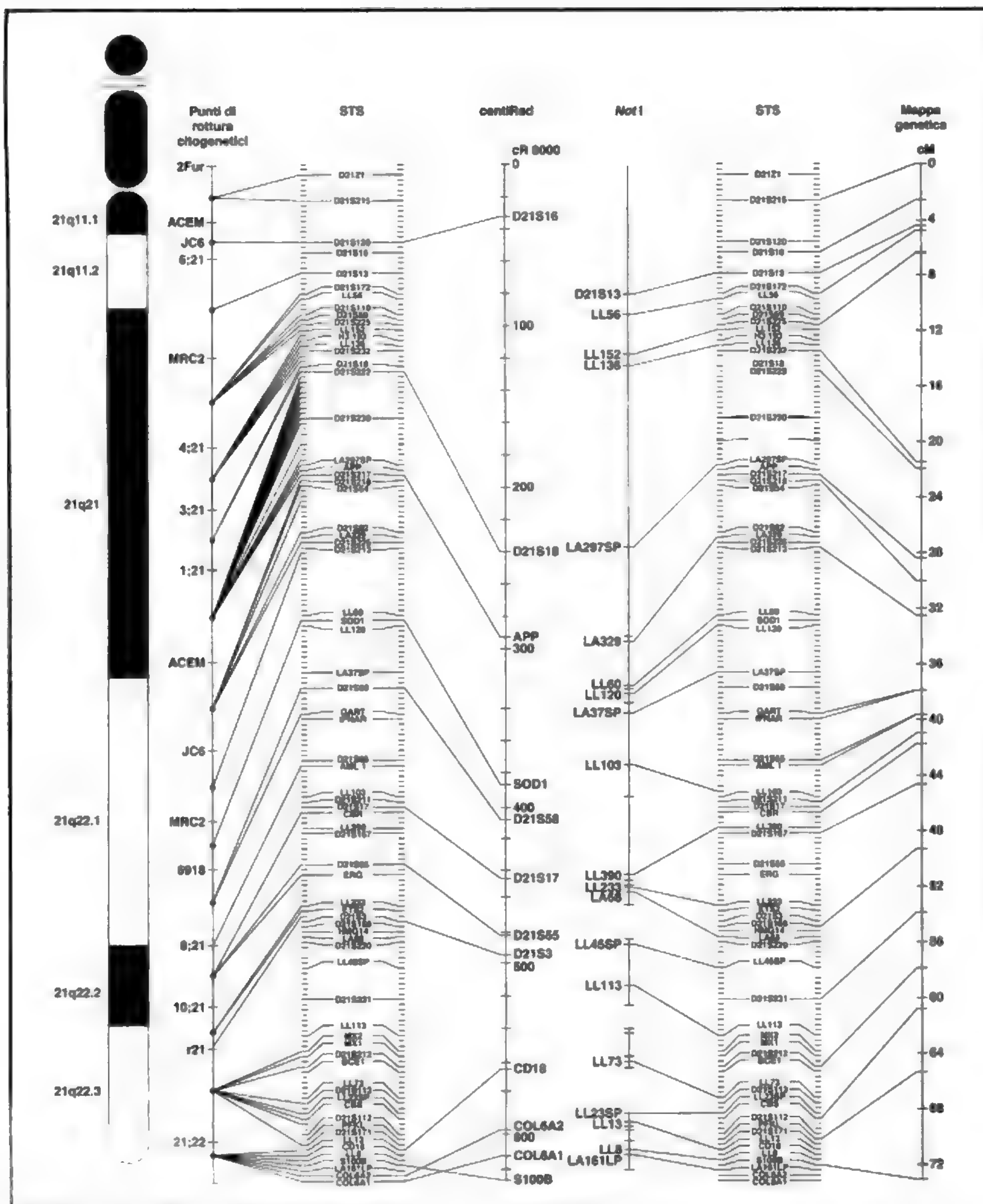


Fig. 4. Mappa genetica di un cromosoma 21. Vicino alla mappa citogenetica standard (sulla sinistra) ci sono le posizioni dei punti di rottura citogenetici. Il cromosoma 21 osservato in traslocazioni del cromosoma 21 (6:21, 4:21, 3:21, 2:21; etc.). La mappa STS (Sequencing Tag Site) è riportata due volte per facilitare i confronti con le altre mappe, che comprendono la mappa di restrizione Not I basata su PFG (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (LL56, LL152, LL136, 1993) e la mappa degli ibridi di restrizione Not I basata su PFG (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (LL56, LL152, LL136, 1993) e la mappa degli ibridi di restrizione Not I basata su PFG (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (LL56, LL152, LL136, 1993). Sulla destra è riportata la mappa genetica (cM). (Riprodotta in Strachan e Read, per gentile concessione da Nature, 1992, vol. 359, pag. 385. Copyright Macmillan Macmillan Limited)

nale chimico-farmaceutica, per immettere le EST direttamente in GenBank.

L'analisi delle sequenze contenute in dbEST non solo sta dando un quadro generale del numero totale dei geni umani ma permette un'analisi funzionale e comparata delle sequenze dei cDNA che si sta rivelando uno strumento fondamentale per l'identificazione di nuovi geni e di geni malattia. Sulla scia dei risultati ottenuti con le EST umane, un lavoro analogo è iniziato quindi anche per il topo e per altri organismi modello.

Il mappaggio delle EST è il passaggio successivo è in corso. Poiché le EST sono praticamente delle STS, le stesse metodologie usate per le STS possono essere utilizzate per localizzare le EST sulla mappa fisica (Schuler *et al.*, 1996). Il mappaggio delle EST avviene sia sulla mappa fisica in YAC, come descritto sopra, che mediante pannelli di DNA preparati dai cosiddetti «ibridi da radiazione» (Schuler *et al.*, 1996; Gyapay *et al.*, 1996). Questi DNA sono stati preparati a partire da una linea cellulare umana irradiata, in modo da frammentare il DNA in pezzi di 4-10 Mb. Le cellule irradiate sono state ibridate con una linea cellulare di roditore (topo o criceto) e poco meno di 100 cloni ibridi indipendenti sono stati isolati e cresciuti. Da tutti è stato preparato il DNA. Ciascuno di questi cloni contiene un alto numero di frammenti di DNA umano (dal 32% al 15% del genoma/clon). provenienti in modo assolutamente casuale da cromosomi diversi o da porzioni diverse dello stesso cromosoma. Mappando tutte le STS che fanno parte della mappa fisica del genoma umano su questi DNA, è stato possibile ricostruire l'ordine delle STS nella mappa fisica del genoma e di stabilirne la distanza in un unità di misura arbitraria, il centiRad (cRad). Infatti tanto più due STS sono vicine nel genoma tanto più alta è la probabilità di trovarle sempre insieme negli ibridi; tanto più sono lontane tanto più grande è la probabilità di trovarle in ibridi diversi. Il vantaggio rispetto alla mappa fisica in YAC è che la mappa per ibridi da radiazione dovrebbe contenere tutto il genoma e non avere buchi. Le due mappe dovrebbero essere completamente sovrapponibili.

Nella fig. 4 è riportato l'esempio di una mappa fisica integrata relativa al cromosoma 21.

Sequenziamento del DNA

Nonostante il sequenziamento fosse l'area del Progetto Genoma Umano nella quale sarebbero stati necessari i maggiori avanzamenti tecnologici, per ora, le metodologie di sequenza del DNA non hanno avuto progressi spettacolari né sono stati sviluppati metodi di sequenza totalmente innovativi (Guyer e Collins, 1995). È probabile che la prima sequenza di tutti i 3 miliardi di basi del g. u., prevista per il 2001, sarà fatta ancora con la tecnica tradizionale basata sulla sintesi di DNA in presenza di nucleotidi modificati (dideossinucleotiditri-fosfati) ed analisi dei prodotti in gel ultrasottili di acrilamide denaturanti. In questi anni sono state però introdotte moltissime modifiche e miglioramenti sia per quanto riguarda l'enzimologia delle reazioni di sequenziamento che per quanto riguarda i gel e i metodi di lettura: con queste modifiche la produttività di tutto il sistema è grandemente aumentata (almeno 3-4 volte). È infatti possibile fare più gel al giorno, i gel possono contenere un numero molto maggiore di campioni e si possono leggere più basi per corsa. Inoltre, l'uso dei nuovi vettori batterici in cui si possono clonare da 100 a 300 kb e l'introduzione di modifiche nelle strategie di sequenza permettono di non ripetere troppe volte la stessa sequenza, come accade nella tipica strategia di «shotgun» in cui la stessa regione è sequenziata almeno 5-10 volte. Ad es., nella strategia «classica» di «shotgun sequencing», tutti i subcloni di una

regione genomica, ottenuti in modo completamente casuale, vengono sequenziati contemporaneamente e la sequenza è ricostruita al computer in base a confronti di sequenza e ricerca delle regioni di sovrapposizione. Metodi alternativi prevedono il sequenziamento casuale di solo un numero limitato di cloni e il completamento della sequenza con sequenze ordinate, basate anche sull'uso di primer specifici. Il costo per la sintesi di oligonucleotidi sintetici sta infatti diminuendo moltissimo, parallelamente alla possibilità di sintetizzarne quantitativi molto piccoli.

Tutte queste modifiche non solo hanno aumentato l'efficienza del processo ma tendono a far diminuire grandemente il costo del sequenziamento, calcolato per base sequenziata. Tale costo era di 2-3 dollari a base ed è stato calcolato in 0,5 dollari a base per il sequenziamento del nematode *Caenorhabditis elegans*, uno dei sistemi modello il cui sequenziamento è quasi completato.

Il costo atteso per il sequenziamento di tutto il genoma umano dovrebbe scendere ulteriormente fino a 10 cents/base con un costo totale di 300-500 milioni di dollari per la sequenza di tutti i 3 miliardi di basi determinata con un'accuratezza del 99,9% (Nature, 1995, 375, 93-95).

Con il completamento delle prime mappe, fisica e genetica, e con i progressi nella costruzione della mappa trascrizionale del g. u. il sequenziamento è ora diventato lo scopo primario del Progetto Genoma Umano (Rowen *et al.*, 1997). È possibile che nei prossimi 5 anni siano introdotte altre modifiche tecniche anche radicali, come cambiamenti nei substrati dei gel, metodologie basate su spettrometria di massa e sull'ibridazione con corti oligonucleotidi.

Data la situazione sperimentale e il livello di organizzazione necessario, è prevedibile che la sequenza verrà fatta in un piccolo numero di centri in USA e in Europa, anche se non è escluso che alcune regioni relativamente più piccole (1-5 Mb) saranno fatte anche da altri laboratori che si dedicano al sequenziamento.

Parallelamente si continuano a sviluppare programmi per l'immagazzinamento e l'analisi delle sequenze e soprattutto per la ricerca di geni in grandi regioni sequenziate (Guyer e Collins, 1995). Tali programmi continuano a essere prodotti e a cambiare parallelamente alla comparsa di nuove risorse e nuovi materiali.

Banche dati

Sono state create tutta una serie di banche dati che hanno lo scopo di permettere un facile accesso ai dati continuamente prodotti di laboratori impegnati in queste ricerche. Una ricerca in Internet potrà fornire un grandissimo numero di indirizzi da cui accedere ai diversi tipi di informazione.

Nella tab. I sono riportate alcune delle banche dati dove sono conservate le informazioni ottenute nel corso del progetto Genoma e gli indirizzi Internet per accedervi.

Ricadute nel campo della salute

La grande quantità di informazioni e di risorse prodotte dal Progetto Genoma Umano ha avuto una importante ricaduta nel campo biomedico, portando all'identificazione di un gran numero di geni responsabili di malattie ereditarie. Nuovi geni malattia sono pubblicati ogni mese mentre fino a qualche anno fa si parlava di qualche gene all'anno.

Molti geni sono stati identificati negli ultimi anni utilizzando la tecnica del *clonaggio posizionale* (v.**) che permette di isolare geni indipendentemente dalla conoscenza della loro funzione (Guyer e Collins, 1995) in base alla loro localizzazione cromosomica. La costruzione di mappe genetiche sempre più dettagliate ha grandemente facilitato la localizzazione cromosomica di molte malattie genetiche a

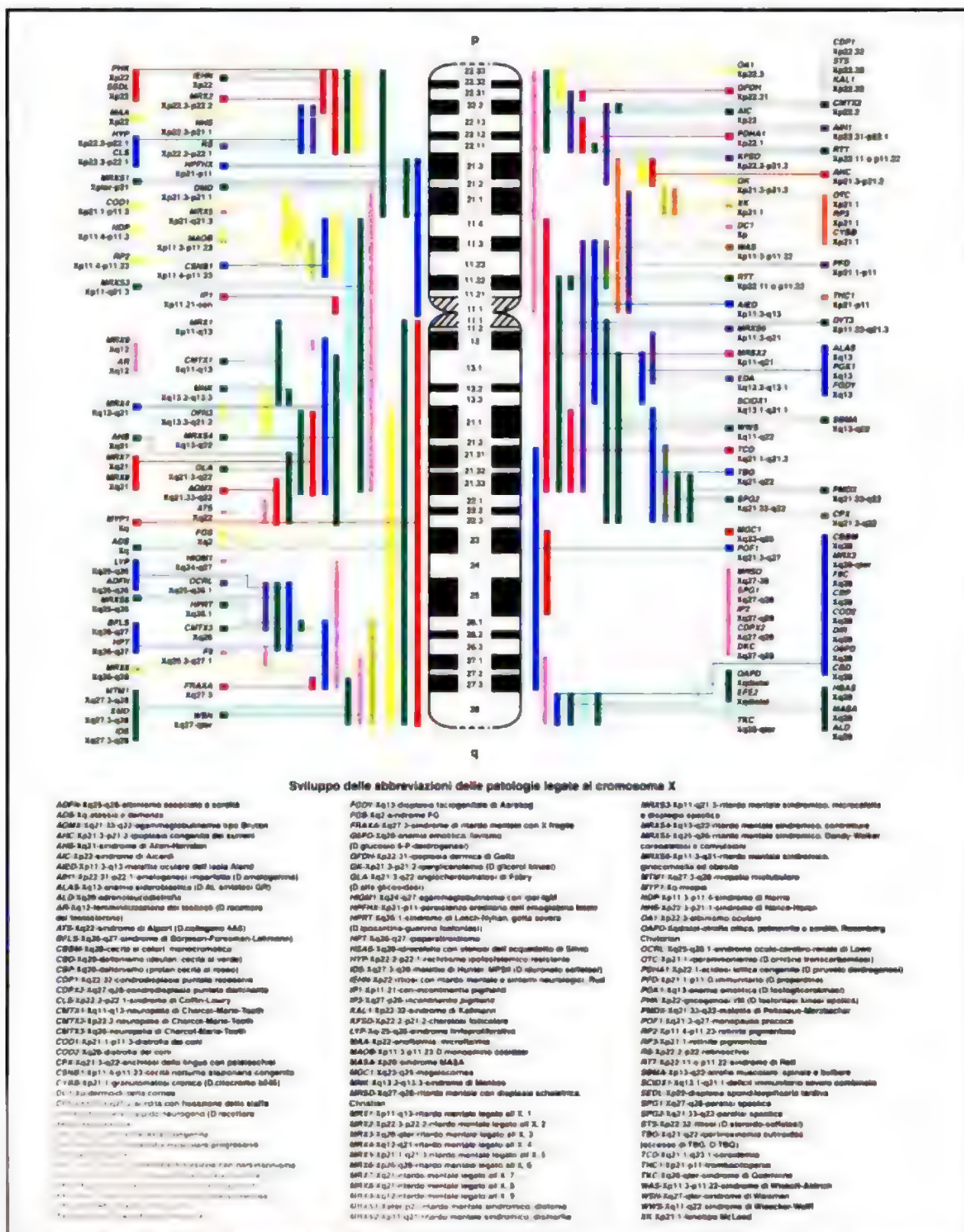


Fig. 5. Mappa delle malattie ereditarie e dei geni noti del cromosoma X umano: 164 Mb. In alto: schema a bande e relativa numerazione. Nella parte superiore sono indicate le malattie ereditarie. In basso sono sviluppate le abbreviazioni dei geni riportati nella illustrazione. L'abbreviazione D. indica «Deletti» (D.J. & Kaplan e M. Delpech, «Biologia Molecolare e Medicina», 1995, Gnocchi Editore). Sono riportate anche le concessioni della citazione (S. I. I. I.) in Italia e della casa Editrice (Gnocchi).

TAB. I. PRINCIPALI BANCHE DATI IMPORTANTI PER IL PROGETTO GENOMA UMANO

Banca dati	Descrizione e indirizzi elettronici
GDB (<i>Genome Database</i>)	La principale banca dati sul mappaggio umano. Ha sede alla Johns Hopkins University, School of Medicine. Permette l'interazione con la banca dati OMIM WWW-URL: http://gdbwww.gdb.org/ ; FTP: ftp:gdb.org ; e-mail: help@gdb.org
dbEST	Raccolta di sequenze parziali da cloni di cDNA (EST) WWW-URL: http://www.ncbi.nih.gov/dbEST/index.html ; FTP: ftp:gdb.org ; e-mail: help@gdb.org
OMIM (<i>on-line Mendelian Inheritance in Man</i>)	Catalogo elettronico del Mendelian Inheritance in Man di Victor McKusick, che elenca tutte le patologie ereditarie umane conosciute. Ha sede alla Johns Hopkins University e interagisce con la GDB (si veda sopra). Accesso tramite GDB
MGD (<i>Mouse Genome Database</i>)	La principale banca dati sul genoma murino. Ha sede presso i Jackson Laboratories, Bar Harbor, US WWW-URL: http://www.informatics.jax.org/ ; FTP: ftp:informatics.jax.org ; e-mail: mgi-help@informatics.jax.org
Généthon	Mappe genetiche umane basate su marcatori di ripetizioni (CA) _n associati, con sede presso il laboratorio Généthon Ivry (Parigi) WWW-URL: http://www.genethon.fr/ ; FTP: ftp:genethon.fr
CHLC (<i>Co-operative Human Linkage Center</i>)	Banca dati frutto di collaborazione di mappe genetiche umane contenente genotipi, dati su marcatori e linkage server, coordinata da Jeff Murray (Università dello Iowa) WWW-URL: http://www.chlc.org/ ; FTP: ftp:chlc.org ; e-mail: infoserver@chlc.org
CEPH (<i>Centre du Polymorphism Humain</i>)	Mappe fisiche basate su YAC del genoma umano, con sede presso il laboratorio CEPH di Parigi WWW-URL: http://www.cephb.fr/bio/ceph-genethon-map.html ; FTP: ceph-genethon-map.genethon.fr ; e-mail: ceph-genethon-map@cephb.fr
Whitehead Institute	Mappe fisiche basate su YAC del genoma umano, con sede presso il Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, USA WWW-URL: http://www.genome.wi.mit.edu/

cui non erano associati riarrangiamenti cromosomici visibili citogeneticamente che potessero suggerire una localizzazione cromosomica precisa. In base alla mappa genetica, è sufficiente un minimo di circa 300 marcatori (microsatelliti) posti a una distanza di circa 10cM l'uno dall'altro per una prima localizzazione cromosomica di praticamente qualsiasi malattia ereditaria con eredità mendeliana semplice (Hall *et al.*, 1996). Una volta ottenuto questo risultato, l'ulteriore localizzazione può essere fatta regionalmente utilizzando marcatori più vicini, specifici della regione identificata.

Nella fig. 5 è riportata una mappa delle malattie genetiche localizzate sul cromosoma X.

Per geni responsabili di malattie rare (v.**), ma soprattutto per quelli responsabili di malattie con eredità multifattoriale o non mendeliana semplice, spesso l'analisi genetica non permette di delimitare una regione genomica molto ristretta. Inoltre, sono abbastanza comuni regioni genomiche molto ricche in geni e in cui i geni sono relativamente piccoli e vicini. In questi casi la conoscenza di una possibile funzione del gene in esame o di un particolare quadro di espressione o omologie con modelli animali può facilitare la scelta di un gene candidato tra i molti possibili. La costruzione della mappa trascrizionale dettagliata basata sulle EST e lo sviluppo di mappe fisiche e genetiche di organismi modello (e in particolare del topo e del moscerino *Drosophila melanogaster*), e il completamento della sequenza di tutto il genoma del lievito *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996) sta rendendo sempre più utile e usato l'approccio cosiddetto del «candidato posizionale» che sarà probabilmente quello utilizzabile per l'identificazione dei geni responsabili di malattie a carattere poligenico come il diabete, l'ipertensione, le malattie psichiatriche etc. nelle quali l'analisi genetica è molto complessa e spesso non conclusiva.

A questo proposito nuovi metodi di sequenziamento e di

identificazione di mutazioni saranno sempre più necessari: tali metodi dovrebbero essere sviluppati nei prossimi anni e sperimentazioni a questo riguardo sono già in corso (Lander, 1996). Queste nuove metodologie dovrebbero costituire il passo successivo delle ricerche sul g. u. che permetterà non solo di identificare geni malattia ma di studiare le interazioni tra i geni che sono alla base della diversità tra gli individui e, in campo biomedico, alla diversità di gravità clinica di molte malattie causate da mutazione negli stessi geni. Tale fenomeno, descritto anche per malattie con ereditarietà mendeliana semplice, è stato spesso descritto ed è stato attribuito al cosiddetto «background genetico». La conoscenza di queste interazioni sarà fondamentale per l'applicazione nel campo della salute dell'uomo delle conoscenze derivate dal Progetto Genoma Umano (Lander, 1996; Tilghman, 1996).

Bibliografia

- Adams M. D. *et al.*, *Science*, 1991, **252**, 1651-1656.
 Botstein D. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, **32**, 314-331.
 Burke D. T. *et al.*, *Science*, 1987, **236**, 806-812.
 Chumakov I. M. *et al.*, *Nature*, 1992, **359**, 380-386.
 Dib C. *et al.*, *Nature*, 1996, **380**, 152-154.
 Dietrich W. F. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 10849-10853.
 Foote S. *et al.*, *Science*, 1992, **258**, 60-66.
 Gingrich J. C. *et al.*, *Genomics*, 1996, **32**, 65-74.
 Goffeau A. *et al.*, *Science*, 1996, **274**, 546-567.
 Guyer M. S., Collins F. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 10841-10848.
 Gyapay G. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **7**, 246-339.
 Gyapay G. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1996, **5**, 339.
 Hall J. M. *et al.*, *Genome Research*, 1996, **6**, 781-790.
 Ichikawa *et al.*, *Nature Genetics*, 1993, **4**, 361-365.
 Kaplan J. C., Delpech M., *Biologia molecolare e Medicina*, 1995, Gnocchi Editore, Napoli.
 Kim T. *et al.*, *Genomics*, 1994, **22**, 336-339.
 Lander E. S., *Science*, 1996, **274**, 536-539.
 Litt M., Luty J. A., *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, **44**, 397-401.
 Nature News and Views, *Nature*, 1995, **375**, 93-94.
 Olson M. *et al.*, *Science*, 1989, **245**, 1434-1435.

- Rowen L. et al., *Sequencing the Human Genome*, Science, 1997, **278**, 605-607.
 Schuler G. D. et al., Science, 1996, **274**, 540-546.
 Soares M. B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, **91**, 9228-9232.
 Strachan T., Read A. P., *Genetica umana molecolare*, 1997, UTET, Torino, pp. 335-365.
 The Genome Directory, Nature, 1995, **377**, Suppl., 1-379.
 The Genome Maps 1997, Science, 1997, **278**, 615-630.
 Tilghman S. M., Genome Research, 1996, **6**, 773-780.
 US Dept. of Health and Human Services and US Dept. of Energy (1990), *Understanding our Genetic inheritance: the US Human Genome Project*, NIH, Publ. No 90-1590.
 Weber J. L., May P. E., Am. J. Hum. Genet., 1989, **44**, 388-396.
 Wessendbach J. et al., Nature, 1992, **359**, 794-801.

DANIELA TONIOLO

GENOTECHES

f. *g  noth  ques*. - i. *libraries*. - t. *Genbanken*. - s. *genotecos*.

SOMMARIO

Definizione e premesse (col. 2495). - **Tipi di genoteche e materiale di partenza** (col. 2495): *Genoteche di DNA genomico*. - *Genoteche cromosomiche*. - *Genoteche subcromosomiche*. - *Genoteche di cDNA*. - *Genoteche di espressione*. - *Genoteche combinatorie*. - *Genoteche di esposizione*. - **Vettori di clonaggio** (col. 2497): *Vettori plasmidici*. - *Vettori fagici*. - *Vettori misti*. - **Metodi di analisi (screening)** (col. 2503).

Definizione e premesse

on il termine *genoteche* si indicano collezioni di frammenti di DNA che, isolati dal loro contesto originario, vengono inseriti in vettori di clonaggio (v. CLONE E CLONAZIONE*; INGEGNERIA GENETICA*; GENETICA**, *DNA ricombinante*) e mediante questi possono essere propagati in batteri e/o lieviti, purificati e caratterizzati. Vengono anche utilizzati i termini «banche di DNA» o «librerie» dall'inglese *libraries*.

L'analisi molecolare dei geni, resa possibile dall'inizio degli anni '70 dalle tecnologie del «DNA-ricombinante», ha aperto straordinarie prospettive allo studio dei processi biologici. Caratterizzare la struttura di un particolare segmento di DNA   la base per cominciare a capirne la funzione normale o a scoprire le basi molecolari di una sua eventuale funzione alterata. Per clonare uno specifico gene   necessario definire bene il materiale di partenza e decidere il mezzo migliore per distinguere il gene desiderato dagli altri. Le genoteche di DNA ricombinante permettono di soddisfare entrambe queste necessit .

Tipi di genoteche e materiale di partenza

Genoteche di DNA genomico

Le dimensioni dei DNA genomici di organismi diversi possono variare considerevolmente: dalle 4.000 kbp (migliaia di coppie di basi) di *E. coli*, il batterio pi  usato nella tecnologia del DNA ricombinante, alle 3.500.000 kbp del genoma umano. Il numero di cloni di una genoteca, necessario per rappresentare l'intero genoma di un organismo, dipende dalla dimensione dei frammenti in cui il DNA viene frazionato e da quelle del genoma stesso: mentre una g. di *E. coli* pu  essere rappresentata da soltanto poche migliaia di cloni contenenti inserti di circa 20 kb, una g. completa di mammifero, con il suo genoma di almeno un milione. Inoltre, data la maggiore complessit  del genoma degli eucarioti (presenza di introni, che separano i tratti codificanti per proteina),   necessario inserire un intero gene in un unico clone. Di solito   necessaria la costruzione di una libreria di vari cloni che si sovrappongano parzialmente.

Nella costruzione di una g. di DNA genomico, qualunque sia l'organismo in esame, il requisito fondamentale   che il DNA usato sia ad alto peso molecolare.

Il DNA viene purificato da cellule o tessuti, utilizzando tecnologie che ne limitino quanto pi  possibile rotture casuali (dato l'alto peso molecolare, il DNA genomico   particolarmente sensibile a sollecitazioni di tipo meccanico e all'azione di enzimi degradanti, rilasciati durante la purificazione dalle cellule). Questo problema   particolarmente grave per genomi di grandi dimensioni ma, usando opportuni accorgimenti,   possibile ottenere un DNA cromosomale quasi intatto: ad es., le cellule eucariotiche vengono incluse in blocchetti di gel d'agaroso a bassa temperatura di fusione e trattate con enzimi e altri reagenti allo scopo di liberare il DNA dalle proteine e dall'RNA cellulare. Nella matrice di gel le molecole di DNA vanno meno soggette a rotture e possono essere direttamente sottoposte ai trattamenti successivi per il clonaggio.

Le varie tecniche di clonaggio (frammentazione controllata, eventuale attacco di *linkers*, inserzione nei vettori) sono descritte in dettaglio alla voce (v. CLONE E CLONAZIONE*). I vettori usati per le g. genomiche sono quelli pi  idonei al clonaggio di lunghi frammenti: *fagi*, *cosmidi*, *YAC* (v. sotto).

Genoteche cromosomiche

Nlla ricerca di geni di cui gi  si conosca la localizzazione cromosomica, oppure nel caso che l'obiettivo sia la caratterizzazione di un cromosoma specifico, pu  essere utile costruire g. contenenti il DNA di un singolo cromosoma. Un determinato cromosoma pu  essere selezionato sulla base della quantit  di DNA e della composizione di paia di basi, mediante l'impiego di «FACS» (*Fluorescence-Activated Cell Sorters*, selezionatori cellulari attivati da fluorescenza).

I cromosomi, provenienti da cellule trattate con colchicina (un inibitore mitotico che blocca la divisione cellulare in metafase) vengono colorati con coloranti specifici per il DNA (Hoechst 33258 per le regioni ricche in AT, e cromomicina A per quelle ricche in GC) e quindi sottoposti all'analisi con i FACS, che separano i diversi cromosomi sulla base delle loro specifiche emissioni di fluorescenza.

Come fonte di DNA preselezionato, pu  essere utile usare ibridi di cellule somatiche, generati da cellule in coltura di specie diverse, fuse *in vitro* (ad es. uomo/topo, topo/criceto). Durante la crescita delle cellule ibride avviene una perdita progressiva e specifica dei cromosomi di una delle due specie fino a che ne rimangono solo uno o pochi, che possono essere facilmente identificati con l'uso di marcatori genetici.

Genoteche subcromosomiche

Porzioni ancora pi  piccole del genoma, possono essere isolate mediante *microdissezione*, una tecnica, all'inizio usata solo per cromosomi facilmente individuabili, quali i cromosomi politenici giganti di *Drosophila*, ma pi  recentemente applicata anche ai cromosomi umani, per clonare particolari regioni cromosomiche identificabili mediante colorazioni specifiche. Il DNA escisso dalle singole bande colorate (poche centinaia di femtogrammi)   sufficiente per essere amplificato mediante la tecnica *Polymerase Chain Reaction* e clonato (v. PCR [v.*; v.**]).

Genoteche di cDNA

Le sequenze di DNA, trascritte in un particolare tessuto o tipo di cellula, possono essere selettivamente clonate utilizzando come materiale di partenza l'RNA messaggero (mRNA) isolato da quel tessuto. Questo viene estratto dalle cellule, convertito enzimaticamente nel DNA complementare (cDNA) e sottoposto alle varie tecniche per il clonaggio (v. CLONE E CLONAZIONE*). Data la minore complessit  e grandezza del cDNA rispetto al DNA genomico, in questo tipo di genoteche il numero di cloni necessario e la dimensione media dei frammenti di DNA da clonare   notevolmente inferiore. Non ci sono quindi limiti che impongano la scelta di particolari vettori: questi possono essere sia plasmidici, sia fagici (v. sotto, fig. 1); particolarmente utili sono

quelli le cui caratteristiche permettono di determinare rapidamente la sequenza nucleotidica dell'inserito (*fagi filamentosi e fagemidi*): da questa è poi possibile dedurre la sequenza aminoacidica della proteina corrispondente.

Genoteche di espressione

Nel cDNA non sono presenti le sequenze regolatrici che permettono l'espressione del gene e la produzione di una eventuale proteina; però, è possibile indurre l'espressione di una sequenza di DNA, se questa viene inserita in un vettore specializzato. I vettori di espressione possono essere sia plasmidici che fagici; un cDNA eucariotico può essere correttamente trascritto e tradotto se inserito (nel giusto orientamento) a valle di segnali che determinano la trascrizione e la traduzione nell'ospite utilizzato per il clonaggio oppure all'interno della sequenza codificante per una proteina batterica. In quest'ultimo caso, se la fase di lettura è corretta, verrà prodotta una proteina di fusione, che si accumulerà all'interno del batterio o verrà secreta all'esterno. Mediante anticorpi specifici, diretti contro la proteina o parte di essa, è possibile identificare il clone contenente il cDNA che la codifica (v. sotto *Metodi di analisi*).

Genoteche combinatorie

Un particolare tipo di g. di espressione è quella utilizzata per produrre in batteri molecole complesse come gli anticorpi; il materiale di partenza è mRNA di linfociti, o di cellule della milza, o di ibridomi (per gli anticorpi monoclonali) v. MONOCLONALI ANTICORPI (v.; v.*; v.**).

Le prime g. di questo tipo sono state costruite in *vettori fagici tipo λ*: i cDNA codificanti per le catene pesanti (H) e leggere (L) sono stati clonati separatamente (mediante PCR e *primer* specifici) in due g. Il DNA estratto dai fagi è stato ricombinato *in vitro* e utilizzato per costruire una terza g. «combinatoria» costituita da fagi contenenti coppie casuali dei geni di catene pesanti e leggere.

In questo modo vengono prodotti anticorpi contenenti tutte le possibili combinazioni delle due catene; tra queste è possibile isolare quello desiderato utilizzando come sonda l'antigene corrispondente. Recentemente la tecnica di costruzione è stata semplificata, eliminando la costruzione delle prime due g., fondendo direttamente *in vitro* i cDNA (H) e (L) e clonandoli in *fagi filamentosi* (v. sotto), in modo che sulla superficie di questi vengano esposti gli anticorpi corrispondenti.

Genoteche di esposizione

Recentemente è stata sviluppata una nuova tecnologia, detta *phage display*, basata sulla possibilità di esporre proteine o peptidi sulla superficie dei *fagi filamentosi*. Frammenti di DNA, inseriti nelle sequenze codificanti le proteine del capsido fagico (involucro esterno), vengono espressi come proteine di fusione e come tali vengono esposte sulla superficie del fago. Peptidi di dimensioni troppo grandi possono non essere tollerati nella struttura del capsido fagico, di conseguenza per esporre intere proteine (come gli anticorpi) si usano i *vettori fagemidici* (v. sotto), nel cui capsido sono esposte solo alcune copie di proteine ibride tra quelle di tipo selvatico (fig. 2, in basso; v. sotto, coll. **2501-2502).

Questo tipo di genoteche presenta notevoli vantaggi nell'identificazione dei cloni positivi (v. sotto *Metodi di analisi*). Inoltre i cloni, una volta selezionati, possono essere rapidamente sequenziati, estraendo il DNA fagico contenuto nel capsido.

Vettori di clonaggio

In fig. 1 sono rappresentati i principali vettori di clonaggio usati nella costruzione di g.

Vettori plasmidici

I plasmidi batterici sono i più comuni vettori di clonaggio. Il loro numero di copie, all'interno della cellula, varia da 10 a 200 circa. Il DNA esogeno, in essi inserito, verrà rappresentato all'interno della cellula nel corrispondente numero di copie. I plasmidi di lievito, dotati di origini di replicazione cellulari «ARS» (*autonomously replicating sequences*) e di centromero «CEN» (responsabile della stabile e corretta ripartizione dei cromosomi durante la divisione cellulare), limitano il loro numero di copie a 1 o 2 per cellula.

Nei plasmidi è possibile inserire frammenti di DNA esogeno di una lunghezza massima di circa 15 kbp, in quanto l'efficienza con cui essi vengono captati dai batteri è inversamente proporzionale alla loro dimensione; inoltre, i plasmidi contenenti inserti di grandi dimensioni hanno uno svantaggio selettivo in quanto si replicano più lentamente. Questo può favorire la selezione di plasmidi contenenti delezioni nel frammento clonato.

I plasmidi vengono introdotti nei loro ospiti mediante «trasformazione». L'efficienza con cui il DNA viene captato dipende dal tipo di tecnica usata e naturalmente dall'organismo utilizzato: mescolando batteri del tipo *E. coli* e DNA in una soluzione di cloruro di calcio a bassa temperatura si ottengono $\sim 10^6$ cloni positivi (colonie contenenti plasmidi) per μg di DNA plasmidico; con un altro metodo, l'elettroporazione, si può veicolare il DNA in maniera più efficace ($\sim 10^{10}$ cloni/ μg DNA) attraverso pori temporanei che si formano sulla membrana delle cellule, colpite da un breve impulso elettrico. Le colonie trasformate vengono identificate su terreni di coltura selettivi, grazie all'espressione dei marcatori genetici presenti sul plasmide.

Alcuni vettori specializzati sono in grado di replicarsi e di essere identificati in due diversi organismi, grazie alla presenza di origini di replicazione e di marcatori selettivi per entrambi gli organismi (vettori spoletta, *shuttle*). A questa classe appartengono gli YAC (*yeast artificial chromosomes*). Questi vettori sono particolarmente importanti per la costruzione di genoteche di DNA genomico, in quanto offrono la possibilità di clonare inserti molto lunghi. Gli YAC, grazie alla presenza di due sequenze «telomeri» (v. TELOMERI E TELOMERASI**), che funzionano come estremità stabili del cromosoma, possono replicarsi come molecole lineari.

Nella costruzione di una genoteca gli YAC vengono linearizzati mediante taglio con *enzimi di restrizione*, i cui siti di riconoscimento fiancheggiano i telomeri (BamHI, in fig. 1), e i frammenti di DNA vengono inseriti nello specifico sito di clonaggio (*polylinker*). Con gli YAC così modificati, vengono trasformati degli «sferoplasti» ossia cellule depresse della parete cellulare.

È stato osservato che la ripartizione in mitosi di questi minicromosomi artificiali avviene in maniera corretta solo se la lunghezza del cromosoma è superiore alle 150 kbp. Questa proprietà viene sfruttata nella costruzione di g. per selezionare specificamente i cloni con frammenti di DNA molto lunghi. I vettori contenenti piccoli inserti (meno di 50 kbp) sono automaticamente eliminati dalla collezione durante la crescita.

Vettori fagici

I batteriofagi sono elementi genetici capaci di infettare i batteri, replicarsi in essi e fuoriuscire all'esterno, rivestiti da un involucro proteico (capside). Questo processo può essere evidenziato dalla formazione di «placche» su uno strato di batteri disseminati su piastre di agar (fig. 1). Nella costruzione delle g. vengono utilizzati soprattutto due tipi di batteriofagi: i *fagi filamentosi* e i *fagi derivati dal λ*.

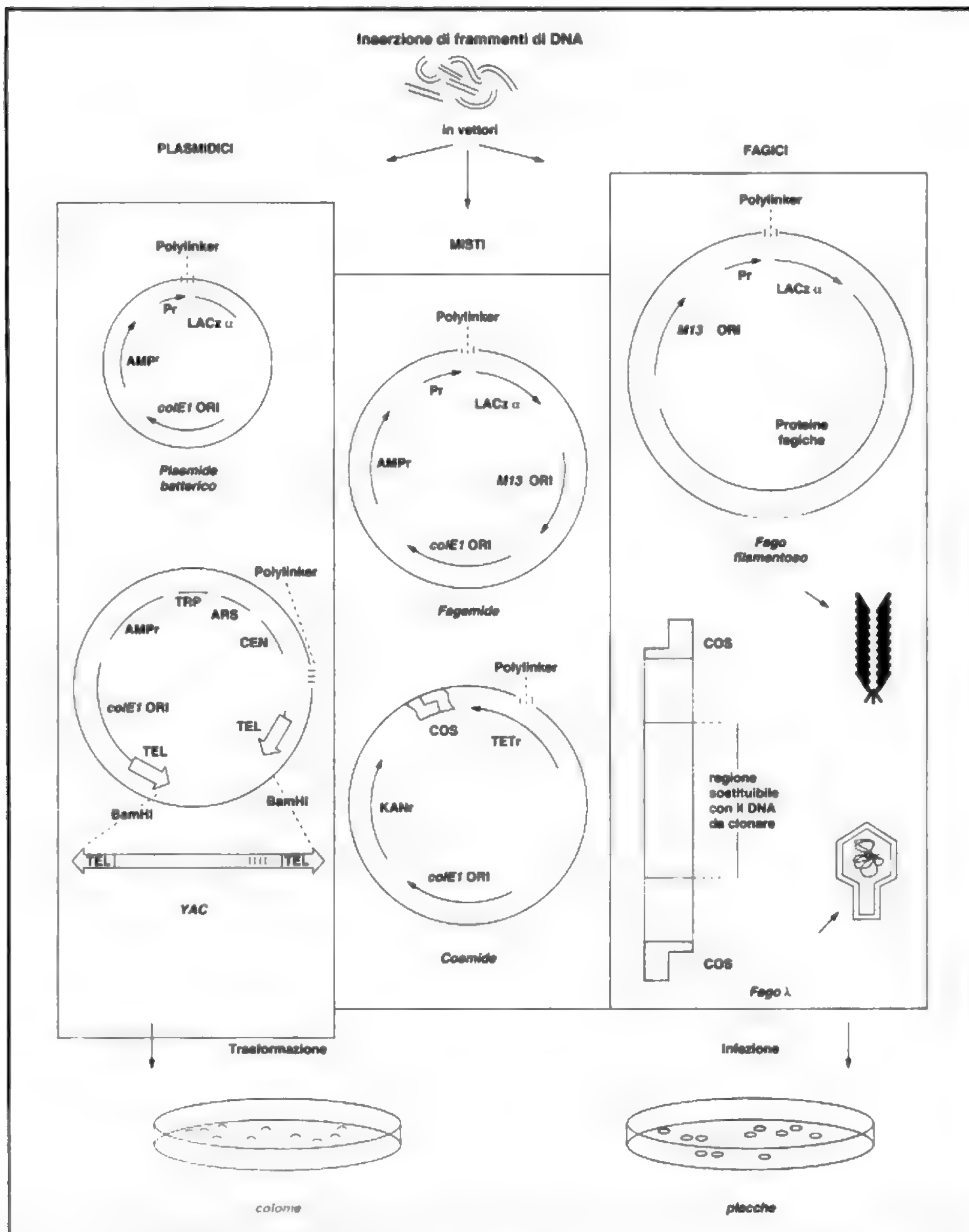


Fig. 1. Vettori di clonaggio. Sono illustrate le caratteristiche fondamentali di ciascuno. Marcatori genetici: AMP^r e KAN^r; rispettivamente resistenza all'ampicillina e alla kanamicina. TRP, gene di triptofano; LACZα, regione codificante per la β-galattosidasi (peptide α); Pr, promotore; ARS, autonomously replicating sequences; CEN, centromero; colE1 e M13 ORI, origini di replicazione dei rispettivi vettori. Le dimensioni relative dei vari vettori non sono in scala.

I primi sono particolarmente utili nelle tecniche di sequenziamento perché il loro DNA può essere isolato in forma di singolo filamento e sottoposto alla procedura di

elongazione con dideossinucleotidi. I fagi filamentosi vengono, inoltre, utilizzati nelle g. di esposizione (*phage display*; v. sopra) per la possibilità di esporre sul loro capsido

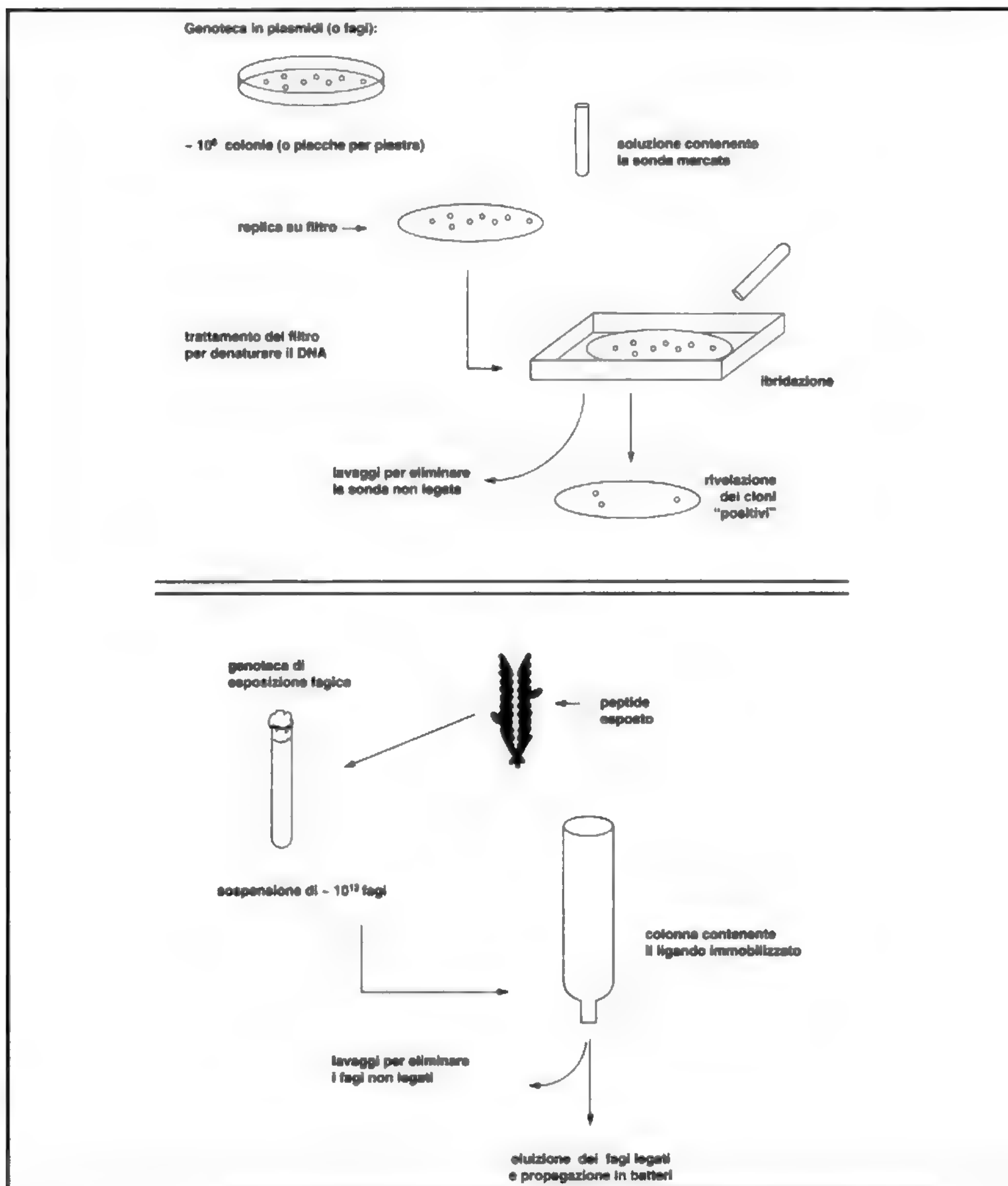


Fig. 2. Analisi di g. *In alto*, ibridazione su filtro di colonie (o placche) con una sonda di acido nucleico. Viene mostrata una sola piastra, ma nello *screening* devono essere analizzati un numero di cloni sufficienti a rappresentare la g. completa. *In basso*, esposizione di proteine su fagi filamentosi. Una sospensione fagica, rappresentante tutta la g., viene fatta passare su una colonna di affinità in cui il ligando è immobilizzato.

proteine ibride, prodotte fondendo frammenti di DNA esogeno ai geni codificanti le proteine del capsido.

Vi sono delle limitazioni nelle dimensioni del DNA che può essere inserito in questi vettori, in quanto si è visto che frammenti di grandezza superiore alle 1500 basi tendono a subire delle delezioni durante la replicazione.

Nei fagi derivati dal λ , invece, possono essere inseriti frammenti di dimensioni variabili (i limiti di lunghezza variano a seconda del λ utilizzato), ma di solito ben superiori a quelle compatibili con un vettore plasmidico. Il 40% del genoma di λ (circa 50 kbp) non è indispensabile per la replicazione e può quindi essere sostituito *in vitro* da frammenti di DNA esogeno di grandezza comparabile. Alle estremità del cromosoma di λ esistono due sequenze a singolo filamento, COS (*cohesive extremities*), complementari tra loro; il loro appaiamento permette la circolarizzazione e l'impacchettamento delle molecole le cui dimensioni sono comprese tra l'80% e il 105% del genoma di λ . Questo significa che vettori con inserti troppo piccoli sono automaticamente eliminati.

Infine, la possibilità di utilizzare il processo naturale dell'infezione, aumenta considerevolmente l'efficienza con cui una singola molecola di DNA può essere introdotta in un ospite batterico.

Vettori misti

Sono vettori che presentano caratteristiche sia di fagi che di plasmidi.

Vengono chiamati *fagemidi* quei plasmidi che contengono, oltre all'origine della replicazione plasmidica, l'origine della replicazione di un fago filamentoso. Questi vettori uniscono i vantaggi dei vettori plasmidici da cui derivano (alto numero di copie, stabilità degli inserti, presenza di marcatori genetici), alla possibilità di produrre DNA a singolo filamento rivestito da un capsido (come i fagi filamentosi). Si replicano, infatti come plasmidi, ma se i batteri che li contengono vengono superinfettati con un fago filamentoso, detto *helper*, i fagemidi iniziano a replicarsi come fagi utilizzando le proteine prodotte dall'*helper*.

I *cosmidi* sono plasmidi batterici in cui sono state inserite le sequenze COS del λ . Utilizzando estratti che permettono l'«impacchettamento» di λ (in provetta, al di fuori di una cellula batterica: *in vitro packaging extracts*) è possibile includere in un capsido fagico infettivo qualunque DNA che rechi due siti COS distanti da 35 a 45 kb; di conseguenza i cosmidi possono essere introdotti in batteri mediante infezione, ma replicarsi come i plasmidi farmcoresistenti (fig. 1). Insieme agli YAC sono i vettori di elezione nei progetti di caratterizzazione di grandi genomi.

Metodi di analisi (*screening*)

Esistono varie procedure dirette o indirette che consentono di identificare nella g. il frammento di DNA desiderato. Molti metodi si basano sulla complementarietà dell'appaiamento delle basi del DNA e sulla possibilità di produrre *in vitro* delle sonde marcate (con isotopi radioattivi o identificabili mediante colorazioni specifiche). È possibile replicare su membrane da ibridazione le piastre contenenti i cloni della g. da analizzare (*colony* o *plaque hybridization*) (fig. 2, *in alto*).

Le sonde (v. SONDE MOLECOLARI [v.*; v.**]) possono essere progettate in base alle informazioni esistenti sul gene desiderato: 1) sintetizzando oligonucleotidi corrispondenti agli aminoacidi della sequenza proteica, se questa è nota; 2) utilizzando tecniche di ibridazione differenziale con cDNA specifici, se la proteina è espressa solo in determinati tessuti; 3) utilizzando elementi conservati di famiglie di geni omologhi.

Le genoteche di espressione permettono l'identificazione del gene d'interesse direttamente dall'analisi delle proprietà funzionali o strutturali del suo prodotto. Per es., se si ha a disposizione un anticorpo specifico contro una certa proteina, l'anticorpo stesso potrà essere utilizzato per identificare il clone che esprime un prodotto che reagisce con l'anticorpo.

L'analisi può essere fatta dopo aver trasferito le colonie su una membrana di nitrocellulosa; oppure in liquido, nel caso di g. di esposizione fagica, in cui un gran numero di cloni può essere facilmente fatto reagire, in piccoli volumi di sospensione fagica, con un ligando immobilizzato su un supporto solido (fig. 2, *in basso*).

Quando non ci sono informazioni sufficienti sul gene da isolare, l'unico modo di trovarlo è quello di «camminare» (*walking*) verso esso, utilizzando cloni che si sovrappongano parzialmente: dopo avere identificato una sequenza vicina nel cromosoma, è necessario caratterizzare accuratamente tutte le sequenze che la precedono o la seguono fino ad imbattersi nel gene desiderato. Nel caso di geni molto grandi sarà necessario addirittura «saltare» (*jumping*) da un cromosoma ad un altro: a tale scopo sono particolarmente utili sonde provenienti da sequenze uniche, specifiche per ciascun cromosoma, dette STS (*single target sequences*). Queste sonde permettono di caratterizzare frammenti dello stesso cromosoma contenute in YAC differenti: dall'analisi comparata di questi è possibile ordinare i cloni e ricostruire tutta la regione genomica corrispondente ad un determinato gene e alle sue regioni di controllo.

Bibliografia

Glover D. M., *DNA cloning: a practical approach*, 1985, vol. I, Irl Press, Washington DC.
Lewin B., *Gene VI*, 1997, Oxford University Press, Oxford.
Watson J. D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M., *DNA Ricombinante*, 1994, Zanichelli, Bologna.

LUCIANA DENTE

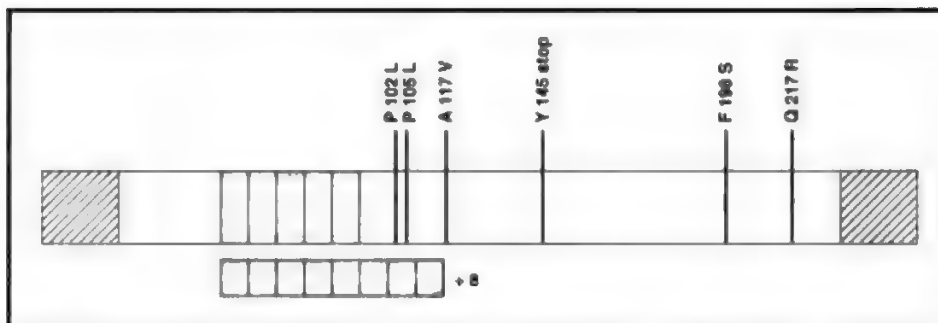
GERSTMANN-STRÄUSSLER-SCHEINKER, SINDROME DI [v. GERSTMANN-STRÄUSSLER, SINDROME DI*, Agg. I, coll. *3377-3378]

La sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker [GSS] è una rara malattia degenerativa del S.N.C. che appartiene alle encefalopatie spongiformi trasmissibili (v.***) o malattie da prioni dell'uomo. La GSS si manifesta in forma familiare a trasmissione autosomica dominante ed è legata a diverse mutazioni del gene della PrP (*PRNP*; fig. 1). La GSS è tuttavia, in una buona percentuale dei casi, sperimentalmente trasmissibile ad animali da laboratorio.

La maggior parte dei casi di GSS sono associati ad una mutazione puntiforme del gene *PRNP* al codone 102 che comporta la sostituzione della prolina in leucina nella proteina PrP (mutazione *P102L*; fig. 1). Questa mutazione è stata identificata nella famiglia austriaca originariamente descritta da Gerstmann, Sträussler e Scheinker e successivamente in diverse famiglie in Europa, America e Giappone. Nei soggetti portatori della mutazione *P102L* la malattia compare intorno ai 50 anni con una atassia cerebellare cronica cui si associano altri segni clinici quali la demenza, il mioclono e disturbi di tipo pseudobulbare. La durata media della malattia è intorno ai 5 anni. L'esame elettroencefalografico non mostra di solito la caratteristica periodicità che si osserva nei casi di malattia di Creutzfeldt-Jakob.

Dal punto di vista neuropatologico si osservano placche amiloidi multicentriche nel cervelletto e nella corteccia cerebrale dovute all'accumulo della sola PrP mutata

Fig. 1. Mutazioni della proteina PrP associate alla GSS. Le aree con barre diagonali rappresentano porzioni della proteina che vengono clivate durante il processo di maturazione. Le aree grigie indicano la regione della proteina in cui sono presenti sequenze ripetute di 8-9 aminoacidi.



(fig. 2). Spesso si osservano anche spongiosi ed astrogliosi. Le caratteristiche cliniche e neuropatologiche sono tuttavia molto variabili anche tra i soggetti affetti della stessa famiglia. La GSS con mutazione *P102L* è stata trasmessa con successo a primati e criceti in seguito a inoculazione con materiale cerebrale proveniente da tre diversi pazienti.

L'importanza della mutazione *P102L* nel causare la malattia è stata accertata sperimentalmente osservando che topi in cui viene introdotta questa mutazione puntiforme sviluppano spontaneamente una caratteristica encefalopatia spongiforme.

In tre distinte famiglie affette da GSS, la mutazione puntiforme responsabile della malattia si trova sul codone 117 del gene *PRNP* con conseguente sostituzione di alanina in valina (mutazione *A117V*, fig. 1). Anche in questa variante la sintomatologia clinica è molto variabile. In alcuni soggetti predomina il deterioramento intellettivo mentre in altri il disturbo principale è l'atassia cerebellare. All'esame neuropatologico si osservano le caratteristiche placche di amiloide, spongiosi, e una moderata degenerazione neurofibrillare.

Altre mutazioni puntiformi del gene *PRNP* associate con la GSS sono al codone 105 (sostituzione di prolina con leucina, *P105L*; fig. 1), al codone 198 (sostituzione di fenilalanina con serina, *F198S*; fig. 1), al codone 217 (sostituzione di glutamina con arginina, *Q217R*; fig. 1) ed al codone 145 (sostituzione di tirosina con l'interruzione della catena aminoacidica, *Y145X*; fig. 1).

La mutazione *P105L* è stata descritta solo in famiglie giapponesi ed è caratterizzata da disturbi della marcia, de-

menza, mioclono ed un tipico tracciato elettroencefalografico periodico. Non sono presenti disturbi cerebellari ed all'esame neuropatologico le caratteristiche lesioni della GSS (placche amiloidi e astrocitosi) sono localizzate esclusivamente nella corteccia cerebrale. La GSS *P105L* non è mai stata trasmessa ad animali di laboratorio.

La mutazione *F198S* è stata trovata in una sola famiglia americana (*Indiana kindred*) in cui vi sono stati oltre 70 soggetti affetti in 6 generazioni. I principali segni clinici sono il deterioramento intellettivo ingravescente, disturbi di tipo parkinsoniano, atassia cerebellare con un decorso che va da 3 ad oltre 10 anni. Le lesioni istologiche del S.N.C. comprendono, oltre alle caratteristiche placche amiloidi multicentriche e una modesta spongiosi, anche una grave degenerazione neurofibrillare simile a quella che si osserva nella malattia di Alzheimer. Questa variante di GSS non è mai stata sperimentalmente trasmessa ad animali di laboratorio.

La mutazione *Q217R* è stata descritta in una sola famiglia svedese ed ha caratteristiche cliniche e neuropatologiche simili alla GSS con mutazione *F198S*.

La mutazione *Y145X* è stata invece riscontrata in una sola paziente giapponese che all'età di 38 anni ha sviluppato disturbi della memoria e dell'orientamento con un progressivo deterioramento intellettivo che è durato per oltre 20 anni. L'esame neuropatologico evidenziava depositi di amiloide nel parenchima cerebrale e perivascolare, lesioni neurofibrillari ed una grave perdita neuronale associata ad una marcata gliosi.

La GSS è legata, oltre alle mutazioni puntiformi sopra descritte, ad una inserzione di 192 basi nel gene della *PRNP* (fig. 1). I soggetti portatori di questa mutazione presentano demenza, atassia, mioclono e segni piramidali intorno ai 40 anni ed hanno un decorso clinico di circa un anno. Le caratteristiche lesioni neuropatologiche della GSS sono particolarmente evidenti nel cervelletto.

Bibliografia

- Barbanti P. et al., *Neurology*, 1996, **47**, 734.
Hsiao K. et al., *Nature*, 1989, **338**, 342.
Hsiao K. et al., *Science*, 1990, **250**, 1587.
Pocchiari M., *Molec. Aspects Med.*, 1994, **15**, 195.

ANNA LADOGANA E MAURIZIO POCCHIARI

GESTOSI [v. vol. VII, coll. 157-169; Agg. I, coll. *3380-3383]

Il solfato di magnesio nella prevenzione e nel trattamento delle crisi convulsive eclamptiche

Recenti studi clinici hanno sottolineato l'efficacia del solfato di magnesio nella prevenzione e nel controllo delle convulsioni eclamptiche. Un primo studio multicentrico randomizzato condotto su 1680 donne gravide di vari Paesi

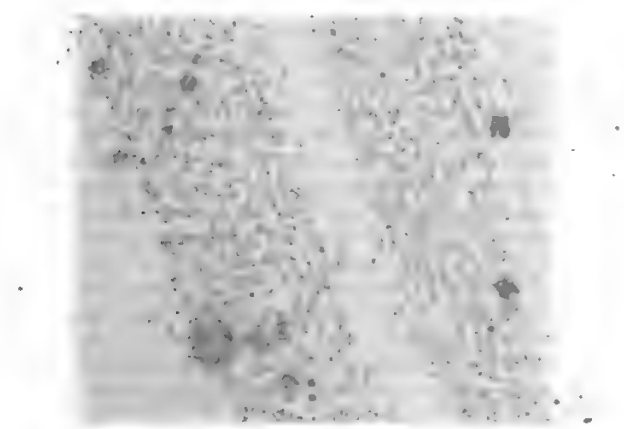


Fig. 2. Placche amiloidi multicentriche nello strato molecolare del cervelletto in un caso di GSS. Immunoistochimica con anticorpi anti-PrP.

(Asia, Africa, Sud America) che già avevano presentato convulsioni eclamptiche ha messo a confronto l'efficacia del solfato di magnesio con quella del diazepam (v.) e della fenitoina (v. ANTIEPILETTICI FARMACI [v.; v.*; v.**]) nel prevenire altre crisi convulsive (The Eclampsia Trial Collaborative Group, 1995). Per ognuno dei tre farmaci è stata somministrata una prima dose di carico per via endovenosa (4-5 g per il solfato di magnesio, 10 mg per il diazepam, 1 g per la fenitoina), seguita da dosi di mantenimento per almeno 24 h. Con il solfato di magnesio il rischio di ricomparsa di crisi convulsive è stato inferiore del 52% a quello riscontrato con la somministrazione di diazepam e del 67% a quello con la fenitoina.

Un altro studio comparativo è stato condotto sull'efficacia del solfato di magnesio, rispetto a quella della fenitoina, nel prevenire le crisi convulsive eclamptiche in 2138 pazienti con ipertensione nel corso del parto (Lucas *et al.*, 1995). Anche in questo caso si è evidenziata in misura significativa ($P = 0,004$) la maggiore efficacia del solfato di magnesio: in nessuna delle pazienti (1049) con esso trattate sono comparsi attacchi convulsivi, che invece sono stati osservati nell'1% di quelle (1089) trattate con fenitoina.

Questi risultati assegnano al solfato di magnesio il carattere di farmaco di scelta sia per prevenire altre crisi convulsive in donne gravide che già abbiano presentato accessi eclamptici, sia in un eventuale trattamento preventivo di routine delle pazienti con ipertensione gravidica, sull'opportunità del quale però tuttora si discute.

V. anche: GRAVIDANZA*, ipotesi patogenetiche sulla preeclampsia e l'ipertensione, *3490; IPERTENSIONE ARTERIOSA*, ipertensione in gravidanza, *4019; MAGNESIO [v.; v.*].

Bibliografia

- DTB, 1995, 4(10), 80.
Lucas M. J., Leveno K. J., Cunningham F. G., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 201-205.
The Eclampsia Trial Collaborative Group, *Lancet*, 1995, 345, 1455-1463.

REF.D.

L'impiego del calcio nella prevenzione della preeclampsia

I risultati di varie sperimentazioni cliniche, anche molto recenti (Villar J. e Repke J. T., 1990; Ito M. *et al.*, 1994; Sanchez Ramos L. *et al.*, 1994), e alcune meta-analisi (Carrolli G. *et al.*, 1994; Bucher *et al.*, 1996) hanno fatto prospettare un effetto favorevole della somministrazione suppletiva di calcio nel ridurre l'incidenza della preeclampsia. Un'analisi critica di questi dati ha sollevato, tuttavia, alcuni dubbi sulla loro attendibilità per varie disomogeneità delle condizioni sperimentali.

Del tutto recentemente è stato condotto un ampio studio da parte di 5 centri medici U.S.A. secondo un protocollo sperimentale concordemente programmato, ai fini di poter formulare una valutazione definitiva dell'effetto di un supplemento di calcio nella prevenzione della preeclampsia (Levine R. J. *et al.*, 1997). La sperimentazione è stata condotta su 4589 donne nullipare sane (di età gestazionale compresa tra la 13^a e la 21^a settimana), di cui 2295 sono state trattate quotidianamente fino alla fine della loro gravidanza con 2 g di calcio elementare *per os* e 2294 hanno ricevuto placebo. Non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi. La somministrazione di calcio non ha avuto effetti sull'incidenza o la gravità della preeclampsia, né ha ritardato la sua insorgenza: la preeclampsia è comparsa in 158 delle donne trattate con calcio (6,9%) e in 168 di quelle con placebo (7,3%) (rischio relativo 0,94; intervallo di confidenza al 95%, da 0,76 a 1,16). Nessuna differenza significativa tra i due gruppi nemmeno per quanto riguarda la prevalenza di ipertensione associata alla gravi-

danza senza preeclampsia, quella di proteinuria associata alla gravidanza senza ipertensione o di altri disturbi ipertensivi, né per quanto riguarda il numero di parti prima del termine, di neonati sotto peso, di morti fetali o neonatali: gli AA. concludono che nelle donne prese in esame la somministrazione suppletiva di calcio è risultata priva di efficacia nella prevenzione della preeclampsia, dell'ipertensione gravidica o di esiti perinatali avversi.

Bibliografia

- Bucher H. C., Guyatt G. H., Cook R. J. *et al.*, *JAMA*, 1996, 275, 1113.
Carrolli G., Duley L., Belizan J. M., Villar J., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1994, 101, 753.
Ito M., Koyama H., Ohshige A. *et al.*, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 1994, 47, 115.
Levine R. J., Hant J. C., Curet L. B. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, 337, 69.
Sanchez Ramos L., Briones D. K., Kaunitz A. M. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1994, 84, 349.
Villar J., Repke J. T., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990, 163, 1124.

REF.D.

GINOCCHIO: v. GINOCCHIO (VII, col. 219-265); GINOCCHIO* (coll. *3387-3394); MENISCHI E LEGAMENTI* (coll. *5006-5016); MENISCHI E LEGAMENTI**.

GLAUCOMA [v. vol. VII, 270-285; Agg. I, coll. *3398-3404]

SOMMARIO

Genetica (col. 2508). • Trattamento medico (col. 2509). • Trattamento chirurgico (col. 2510).

Genetica

Studi condotti da vari ricercatori ed accurate indagini epidemiologiche sembrano confermare che esistono fattori genetici che caratterizzano la malattia glaucomatosa e che quindi essa possa trasmettersi tra consanguinei anche se con modalità per ora non ben definite. Col termine di glaucoma [g.] si suole indicare un insieme di forme cliniche che, pur esitando in uno stesso quadro, caratterizzato da atrofia ed escavazione del nervo ottico, si differenziano fra loro per quanto riguarda la sintomatologia, le caratteristiche cliniche, la patogenesi e la terapia. Anche dal punto di vista genetico, il problema deve essere valutato alla luce dei diversi quadri con i quali la malattia si presenta.

Il *glaucoma primario ad angolo aperto* o *glaucoma primario cronico* è la forma più frequente ed anche più subdola, in quanto insorge ed evolve per lungo tempo in maniera soggettivamente asintomatica. Non esistono ormai più dubbi che esso si trasmetta ai membri di una stessa famiglia e che possa comparire anche a distanza di generazioni. Tuttavia non è ancora chiara la modalità genetica con cui l'affezione si trasmette. Dopo aver accertato che la trasmissione della malattia non avviene semplicemente secondo le leggi Mendeliane, si ritiene attualmente che un numero imprecisato di geni concorra a rendere il soggetto vulnerabile e quindi passibile di essere affetto dalla malattia.

Il problema della trasmissibilità è stato ed è tuttora controverso. In molti alberi genealogici, la trasmissione si presenta di tipo autosomico dominante in quanto colpisce tutte le generazioni ed ambo i sessi in maniera uguale. In altri casi invece, i soggetti malati hanno genitori sani e la comparsa della malattia ha luogo dopo un salto di generazione; si tratterebbe quindi o di una trasmissione autosomica recessiva o autosomica dominante con penetranza incompleta.

Poiché la *pressione oculare* rappresenta il più importante

fattore di rischio della malattia, molte indagini sono state condotte valutando il valore pressorio di base e la risposta ipertensiva che ha luogo dopo somministrazione locale di cortisonici. In base a tale risposta e cioè all'aumento del valore pressorio, la popolazione risulta divisa, secondo Becker, in tre gruppi costituiti da tre livelli di risposta: normali, intermedi e con risposta elevata. In tal modo Becker e Hahn (1964) hanno osservato una risposta altamente positiva nel 92% della popolazione glaucomatosa. Si tratterebbe di una risposta monogenica ai cortisonici e quindi di una risposta prevedibile in una unità familiare secondo le leggi Mendeliane. In questo senso tuttavia tale risposta rivelerebbe il genotipo «glaucoma» per cui il g. primario ad angolo aperto sarebbe ereditario in modo recessivo. Oltre alla pressione oculare sembrano possedere carattere di ereditarietà anche altri parametri che caratterizzano il g., quali la facilità di deflusso dell'umore acqueo ed il rapporto fra le dimensioni del disco ottico e quelle dell'escavazione. Tutti questi parametri sembrano avere in comune almeno un determinante genetico, cioè gli alleli ai quali è associata la risposta ipertensiva o meno ai cortisonici.

Il glaucoma ad angolo chiuso è in genere presente in occhi anatomicamente predisposti. La camera anteriore è più bassa della norma, come pure l'angolo irido-corneale risulta più stretto. La risposta ai cortisonici è del tutto normale. In genere si ritiene che questa forma di g. si trasmetta con una ereditarietà multifattoriale anche se, secondo alcuni AA., sarebbe condizionata da un gene autosomico recessivo.

Per quanto riguarda il glaucoma congenito, caratterizzato da una notevole varietà di quadri clinici, è evidente che si tratta di una affezione geneticamente eterogenea alla cui definizione contribuiscono fattori autosomici recessivi o dominanti. Fra questi ultimi, il più importante è rappresentato dalla goniodisgenesia cioè dalla alterazione strutturale dell'angolo della camera anteriore su base genetica, che è un elemento patogeneticamente determinante per l'insorgenza dell'ipertensione oculare e quindi della malattia.

Per quanto più specificatamente concerne le forme autosomiche dominanti del g. giovanile ad angolo aperto, Johnson *et al.* (1993) e Sheffield *et al.* (1993), hanno mappato il gene sul cromosoma 1 (1q21-q31). Richard *et al.* (1994) hanno anche essi mappato il locus del gene del g. giovanile ad angolo aperto sul cromosoma 1q21-q31. Alward *et al.* (1998) hanno individuato il gene del g. GLC1A, situato sul cromosoma 1, e 16 mutazioni che vanno dal g. giovanile al tipico g. primario ad angolo aperto ad insorgenza tardiva.

Trattamento medico

In questi ultimi anni, l'introduzione dei farmaci betabloccanti per via topica ha rivoluzionato le strategie terapeutiche delle varie forme di g. Queste sostanze sono molto efficaci e ben tollerate da parte del paziente. I betabloccanti costituiscono i farmaci di prima scelta per quasi tutte le forme di glaucoma anche se, in alcuni casi, la loro azione non risulta sempre sufficientemente efficace. Ciò rende necessario ricorrere all'uso di altre sostanze le cui ripetute instillazioni riducono la collaborazione da parte del paziente. Per tale motivo sono state proposte associazioni di farmaci con attività sinergica. Fra le più efficaci sono le associazioni di betabloccanti con miotici parasimpaticomimetici (timololo + pilocarpina; betaxololo + pilocarpina, etc.) che consentono l'uso contemporaneo di due farmaci senza aumentare il numero di instillazioni. Purtroppo però, il farmaco miotico comporta alcuni effetti collaterali che disturbano la visione, specie in soggetti giovani; e ciò riduce la compliance del paziente stesso. Recentemente è stato introdotto un nuovo farmaco (dorzolamide) che somministrato localmente sotto forma di collirio, agisce con lo stesso

meccanismo d'azione dei diuretici inibitori dell'anidrasi carbonica somministrati per via orale. Esso riduce la pressione oculare, diminuendo la produzione di umore acqueo ma con modalità diverse da quelle che caratterizzano i betabloccanti. La dorzolamide è ben tollerata dal paziente e non determina effetti collaterali sia locali che sistemici. Il farmaco può essere usato in aggiunta ai betabloccanti quando questi non risultino sufficientemente efficaci.

Altra famiglia di sostanze che riducono la pressione oculare aumentando il deflusso dell'umore acqueo attraverso le vie uveo-sclerali sono le prostaglandine o meglio alcune sostanze da esse derivate. Attualmente non sono ancora disponibili in Italia per la prescrizione al paziente, ma le indagini multicentriche condotte in vari Paesi, hanno fornito risultati di estremo interesse soprattutto per la possibilità di poter essere somministrati anche una sola volta nelle 24 ore.

Altro farmaco di notevole efficacia e di recente introduzione è la brimonidina, sostanza ad attività α_2 -stimolante che, somministrata localmente, riduce la pressione oculare senza indurre alcuna vasocostrizione.

A questo proposito occorre ricordare che a volte la sola riduzione della pressione oculare sembra non essere sufficiente ad arrestare il danno glaucomatoso. Si ritiene infatti che sia necessario incrementare la perfusione della testa del nervo ottico con farmaci che agiscono direttamente sul vaso sanguigno impedendo un vasospasmo e, quando necessario, consentendo una vasodilatazione su base autoregolatoria. Ciò sembra essere importante soprattutto per le forme di «g. a bassa pressione» in cui la componente vascolare sembra svolgere un ruolo determinante.

Recenti studi hanno dimostrato che l'uso di farmaci calcioantagonisti per via locale, ma soprattutto per via sistemica contribuisce in maniera significativa ad arrestare l'evoluzione della malattia (naturalmente in associazione con farmaci ipotonizzanti oculari).

Trattamento chirurgico

L'introduzione del laser (v.*) nella terapia del g. ha notevolmente migliorato la prognosi della malattia essendo tali metodiche non invasive e spesso ripetibili nel tempo. L'Argon laser consente di ridurre la pressione oculare in varie forme di g. in cui però il trabecolato corneo-sclerale sia accessibile e quindi trattabile (fig. 1). Il raggio laser colpisce

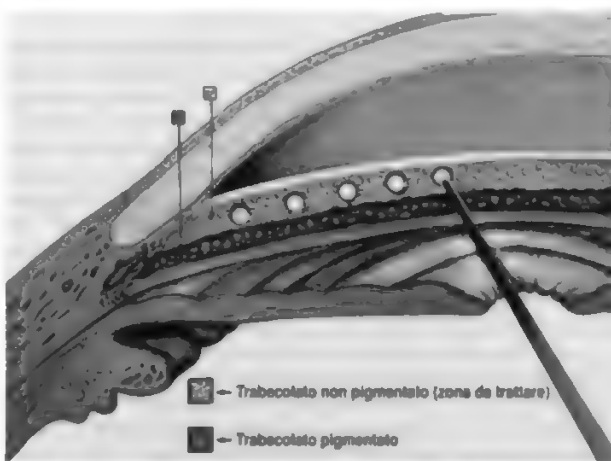


Fig. 1. Rappresentazione schematica dell'area dell'angolo irido-corneale che viene sottoposta al trattamento con Argon-laser. (Da Buratto L., *Chirurgia del Glaucoma*, Fogliazza Ed., 1988, Milano).



Fig. 2. Disegno schematico di un tempo terminale dell'intervento chirurgico di trabeculectomia.

un'area ben definita di tale struttura con *spot* di 50 micron e per un'estensione di 180° o 360°. Il numero degli *spot* si aggira sui 20-25 per quadrante ed il trattamento può essere eseguito in una o più sedute. La riduzione della pressione oculare ha luogo per aumento del deflusso dell'umore acqueo. Con il Nd:YAG laser si eseguono in genere iridectomie per la profilassi ed il trattamento del g. da chiusura d'angolo. Con lo stesso tipo di laser, si possono poi eseguire riaperture della fistola sclerale chirurgica che a varia distanza di tempo dall'intervento può restringersi o chiudersi.

Sempre ricorrendo all'uso del Nd:YAG laser, può essere eseguita una ciclofotocoagulazione transclerale che ha lo scopo di distruggere alcuni processi ciliari per ridurre la produzione di umore acqueo e quindi la pressione oculare. Lo stesso risultato può essere raggiunto usando anche un fascio di ultrasuoni ad alta intensità o con il laser «a diodi».

Risultati ancora non ben definiti, sono stati ottenuti con il laser ad olmio mediante il quale si esegue una sclerostomia di ridotte dimensioni, che consente il drenaggio verso l'esterno dell'umore acqueo.

L'intervento chirurgico più adottato per il trattamento di molte forme di glaucoma è la *trabeculectomia*. In genere si è soliti ricorrere alla soluzione chirurgica quando la terapia medica ed il laser non si dimostrano più in grado di raggiungere valori pressori normali per il paziente in esame. Attualmente esistono alcune scuole di pensiero (anglosassoni) che consigliano di intervenire chirurgicamente in tempi molto precoci anche se la terapia medica sembra consentire un buon controllo pressorio. Infatti l'azione del farmaco non è costante nelle 24 ore, ma cambia continuamente dal momento della sua instillazione fino a quando tale azione si estingue. In questo senso l'intervento chirurgico consente di raggiungere livelli pressori più bassi e soprattutto più costanti nel tempo (fig. 2); (v. GLAUCOMA*, col. *3403).

Occorre tuttavia ricordare che la trabeculectomia, come altre procedure chirurgiche, non è scevra da complicanze a lungo termine. Fra queste deve essere ricordata la chiusura completa della sclerostomia per azione di un lento e continuo processo di cicatrizzazione. Tutto ciò annulla l'efficacia dell'intervento e rende necessario un reintervento. In questi ultimi anni, al fine di ridurre l'entità di questo processo cicatrizzante, si somministra durante o dopo l'esecuzione dell'intervento una sostanza in grado di diminuire questa

attività fibroblastica. Fra questi farmaci, detti antimetaboliti in quanto, come si è detto, riducono la proliferazione dei fibroblasti nell'area di filtrazione, ricordiamo il *5-fluorouracile* (5-FU) e la *mitomicina*. I risultati ottenuti fino ad ora sono incoraggianti anche se il loro uso non deve essere indiscriminato, ma adottato soprattutto nei soggetti giovani o quando si voglia raggiungere dopo l'intervento una consistente ipotonizzazione. A volte possono occorrere complicanze anche a distanza di tempo dall'intervento chirurgico, con riduzione del *visus* ed eccessivo ipotono; il che deve indurre ad usare le suddette sostanze con prudenza ed in caso di motivata necessità (reintervento).

Quando ogni tentativo di soluzione chirurgica con le tecniche tradizionali risulta inefficace, si può ricorrere all'impianto di *valvole artificiali* che consentono il drenaggio dell'umore acqueo dalla camera anteriore. Le più adottate sono la valvola di Krupin e quella di Molteno. Anche con queste tecniche, le complicanze non sono infrequenti. Fra queste ricorderemo l'eccessiva ipotonizzazione, le emorragie coroidali, il contatto del tubo di cui è costituita la valvola con la cornea, l'iride o il cristallino e la comparsa di infezioni.

Bibliografia

- Alward W. L. M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **388**(15), 1022-1027.
 Becker B., Hahn K. A., *Am. J. Ophthalmol.*, 1964, **57**, 543.
 Bucci M. G., *Oftalmologia*, 1993, S. E. Universo, Roma.
 Drance S. M., Van Buskirk E. M., Neufeld A. H. eds., *Pharmacology of glaucoma*, 1992, Williams and Wilkins, Baltimore.
 Johnson A. T. et al., *Ophthalmology*, 1993, **100**, 524-529.
 Krieglstein G. K. ed., *Glaucoma update*, 1995, vol. V, Kaden Verlag.
 Pecori Giraldi J. et al., *Glaucoma ed ereditarietà*, *Boll. Ocul.*, 1993, **73**, suppl. 5.
 Richards J. E. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, **54**, 62-70.
 Sheffield V. C. et al., *Nature Genetics*, 1993, **4**, 47-50.
 Shields M. B., *A study guide for glaucoma*, 1982, Williams and Wilkins, Baltimore.

MASSIMO GILBERTO BUCCI

GLICINA: v. GLICINA (vol. VII, coll. 365-367); IPEREKLESSIA EREDITARIA**, coll. **2860-2862.

GLICOGENOSI [v. vol. VII, coll. 372-391]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2512). - **Glicogenosi I (GSD I)** (col. 2513). - **Glicogenosi II (GSD II)** (col. 2517). - **Glicogenosi III (GSD III)** (col. 2518). - **Glicogenosi IV (GSD IV)** (col. 2519). - **Glicogenosi V (GSD V)** (col. 2519). - **Glicogenosi VI (GSD VI)** (col. 2519). - **Glicogenosi VII (GSD VII)** (col. 2519). - **Glicogenosi IX (GSD IX)** (col. 2520): *Glicogenosi epatica X-linked o glicogenosi IXa*. - *Glicogenosi epatica e muscolare o glicogenosi IXb*. - *Glicogenosi IXc*. - **Altre glicogenosi** (col. 2521). *Deficit di glicogenosintetasi*. - *Sindrome di Fanconi-Bickel*. - *Deficit di fosfoglicoisomerasi*. - *Defetti della glicolisi*.

Introduzione

Durante i due ultimi decenni, i soggetti con difetto metabolico del glicogeno (glicogenosi, GSD: *Glycogen Storage Disease*) sono stati oggetto di studi biochimici e molecolari che hanno molto ampliato le conoscenze delle proteine coinvolte nella sua sintesi e degradazione e quelle della regolazione di questi processi. La glicoso-6-fosfatasi è, ad esempio, risultata costituita da 6 differenti proteine legate alle membrane, di cui 2 deputate all'attività catalitica e 4 al trasporto del substrato e dei prodotti di idrolisi.

Queste acquisizioni hanno modificato la classificazione (tab. I), perfezionato le modalità diagnostiche (tab. II) e portato alla individuazione di altre rare forme. La migliore conoscenza fisiopatologica dei singoli difetti enzimatici ha originato approcci terapeutici più razionali ed efficaci, che

TAB. I. CLASSIFICAZIONE E MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLE GLICOGENOSI

Tipo	Difetto enzimatico	Locus genetico	Organi interessati			Manifestazioni cliniche
			Fegato	Muscolo	Cuore	
Ia	Glicosio-6-fosfatasi (G-6-Pasi)	17	+			Complicanze a lungo termine: difetto staturale, nefropatia, adenoma epatico, osteoporosi, anemia, cisti ovariche, aterosclerosi (?)
I non a (I b, c, d)	Trasporto del substrato e dei prodotti di idrolisi della G-6-Pasi		+			Come Ia, infezioni ricorrenti, malattia infiammatoria cronica intestinale
II	α -glicosidasi	17q23	+	+	+	Forma infantile: <i>exitus</i> < 2 anni Forma tardiva: miopatia ad esordio nei primi anni con o senza interessamento cardiaco Forma adulta: miopatia
IIIa	amilio-1,6 glicosidasi	1p21	+	+	(+)	Sintomi epatici a decorso migliorativo sostituiti alla pubertà da ipotrofia e debolezza muscolare. Interessamento cardiaco generalmente senza ripercussioni funzionali
IIIb	" " "	"	+			Sintomi epatici a decorso migliorativo
IV	amilio-1,4-1,6 transglicosidasi	3	+	+	+	Cirrosi epatica progressiva, interessamento neuromuscolare, <i>exitus</i> < 5 anni Rare varianti con cardiomiopatia grave oppure con interessamento neuromuscolare (PGBD = <i>polyglucosan body disease</i>)
V	miofosforilasi	11q13		+		Debolezza e crampi muscolari dopo esercizio fisico intenso ad esordio 2°, 3° decennio Varianti infantili o senili
VI	fosforilasi	14q21?	+			Sintomi epatici lievi a decorso migliorativo
VII	fosfofruttochinasi	1q32		+		Sintomi come nel tipo V ma ad esordio più precoce, più gravi ed associati ad anemia emolitica compensata. Varianti con ipotonia muscolare senza crampi ad esordio precoce e prognosi infausta oppure tardivo e decorso prolungato
IXa	fosforilasi chinasi	Xp22	+			Sintomi epatici a decorso migliorativo
IXb	" "	16q12?	+	+		Sintomi epatici e ipotonia muscolare a decorso migliorativo
IXc	" "	Xp22?		+		Sintomi muscolari (debolezza, crampi dopo esercizio fisico) che persistono in età adulta <i>Exitus</i> in età infantile per insufficienza cardiaca
	" "	?			+	

Nota: il lettore noterà che nella classificazione riportata in tabella manca la glicogenosi VIII, che è una classe numerica utilizzata in passato (1974) per una forma probabilmente autosomica recessiva del difetto della fosforilasi epatica

hanno cambiato la prognosi di molti pazienti, sia in termini di aspettativa che di qualità di vita. Infine, lo studio molecolare ha iniziato a dare importanti contributi alla prevenzione, alla correlazione genotipo-fenotipo e alla esatta classificazione di alcuni difetti enzimatici. Esaurienti revisioni sono dedicate agli aspetti generali (Chen e Burkell, 1995; Cornblath e Schwartz, 1991; Fernandes, 1989), diagnostici (Shin, 1990) e terapeutici (Moses, 1990).

Glicogenosi I (GSD I)

La glicosio-6-fosfatasi (G-6-fosfatasi) deficitaria nelle glicogenosi I è un sistema enzimatico, espresso prevalentemente nel fegato, rene e cellule β -pancreatiche, costituito da 6 componenti: la subunità catalitica (E) con il sito rivolto verso il lume del reticolo endoplasmatico, una proteina stabilizzante (SP) e quattro proteine trasportatrici (T1, T2 α , T2 β , GLUT 7). Il glicosio-6-fosfato veicolato nei microsomi da T1, è defosforilato ad opera dell'enzima (E) in presenza della proteina stabilizzante (SP). I prodotti di idrolisi, fosfati e glicosio, ritornano nel citosol ad opera di T2 α , T2 β e GLUT 7.

L'osservazione di soggetti con quadro indistinguibile da quello del difetto della G-6-fosfatasi, ma senza difetto enzimatico, ha inizialmente condotto alla distinzione di g. Ia classica (GSD Ia) e g. Ib (GSD Ib) senza difetto enzimatico.

La conoscenza del complesso multicomponente della G-6-fosfatasi è stata utilizzata per caratterizzare biochimicamente i due gruppi. Il difetto della subunità catalitica (E) è il più comune e viene indicato GSD Ia. Molto raro e di difficile documentazione è il difetto della proteina essenziale per l'attività di E che è indicato GSD IaSP. Entrambi questi difetti si evidenziano su tessuto epatico sia fresco che congelato. La GSD Ib corrisponde al difetto degli altri componenti dimostrabile solo su tessuto epatico fresco, quando l'integrità delle membrane plasmatiche consente di valutare il ruolo dei sistemi di trasporto. Si distinguono i sottogruppi GSD Ib, c, d corrispondenti, rispettivamente, al difetto di T1, T2 α e T2 β , GLUT 7. Poiché è particolarmente complesso documentare il difetto dei singoli componenti, è di uso corrente la terminologia di GSD Ia e GSD non-Ia corrispondenti, rispettivamente, al difetto su tessuto epatico fresco o congelato e solo su tessuto epatico fresco.

TAB. II. ALTERAZIONI METABOLICHE PRINCIPALI E DIAGNOSI

Tipo	Alterazioni metaboliche							Ri- spo- sta glu- cagone	Diagnosi Cellule o tessuti utilizzabili per la diagnosi enzimatica							
	Ipo- glicemia	Iper- lattacide- mia	Che- tosi	Ipe- ruri- cemia	Iper- trans- ammi- nase- mia	Iper- trigli- ceride- mia	Altro		Leu- cociti	Eri- tro- citi	Fibro- blasti	Fe- gato	Mu- scolo	Cuore	Villi co- riali	Amio- citi cutanei
Ia	+++	+++	-	+++	+	+++		assente				+				
I non a	+++	+++	-	+++	+	+++	Neutropenia, di- fetto funzio- ne neutrofili	assente				+				
II	-	-	-	-	+	-	aumento enz. muscolari		linfo- citi	+	+	+	+	+	+	+
IIIa	++	-	+	+	++	++	aumento enz. muscolari	presente	+	+	+	+	+	+	+	+
IIIb	++	-	+	+	++	++		presente	+	+	+	+			+	+
IV	(+)	-	-	-	+	-		-	+	+	+	+	+	+	+	+
V	-	-	-	++	-	-	mioglobinuria, iperammon.*	-	-	-	-	-	+	-	-	-
VI	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)		-	-	-	-	+	-	-	-	-
VII	-	-	-	++	-	-	mioglobinuria*	-	+	+	+	-	+	-	-	-
IXa	(+)		+		+	+		presente	+	+	+	+				-
IXb	+		+		+	+		presente	+	+	+	+	+			-
IXc	-		-		+	-	aum. enz. musc.	-	-	-	-	-	+	-	-	-
			-		-	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-

* dopo esercizio fisico.

() le parentesi indicano alterazioni non costanti o di lieve entità.

Il quadro clinico della GSD Ia è eterogeneo. Accanto al fenotipo classico di epatomegalia ed ipoglicemia ad esordio nei primi mesi di vita, esistono casi con epatomegalia, diagnosticata talvolta solo in età adulta (Pears *et al.*, 1992).

Il quadro clinico della GSD non-Ia differisce da quello della GSD Ia per l'associazione di neutropenia e difetto della funzione dei neutrofili che condiziona infezioni batteriche frequenti.

Nonostante la diagnosi precoce ed il trattamento abbiano migliorato la prognosi, rimangono complicanze a lungo termine che sono più frequenti ed accentuate nei casi diagnosticati tardivamente o non correttamente trattati. La pubertà è ritardata e la statura finale è spesso ridotta. La fertilità è normale. Sono conseguenti all'iperlipemia gli xantomi cutanei, l'aspetto biancastro della retina e l'aumentato rischio di pancreatite acuta ed aterosclerosi. Il difetto di aggregazione piastrinica può avere un ruolo di protezione nei confronti dell'aterosclerosi precoce. L'anemia, l'osteopenia e le cisti ovariche sono in secondo piano rispetto alle complicanze renali, che comprendono nefropatia uratica, calcolosi, nefrocalcinosi, disfunzione del tubulo prossimale ed insufficienza renale cronica progressiva che si evidenzia in genere nel 3°-4° decennio di vita. L'incidenza degli adenomi epatici, che possono subire una trasformazione maligna o andar incontro ad emorragia, aumenta con l'età e nell'adulto è circa del 75%. L'ipertensione polmonare è una complicanza molto rara. Una malattia cronica infiammatoria intestinale, sovrapponibile al morbo di Crohn, è possibile nella GSD non-Ia.

La diagnosi comporta il dosaggio della glicoso-6-fosfatasi su tessuto epatico fresco e congelato. Lo studio *in vitro* della funzionalità dei neutrofili può confermare la diagnosi

enzimatica di GSD non-Ia o distinguere tra i due tipi quando l'attività enzimatica è stata valutata solo su tessuto epatico congelato.

L'individuazione dei portatori sani e la diagnosi prenatale non invasiva, cioè senza ricorrere alla biopsia del fegato fetale, sono possibili solo per la GSD Ia quando è nota la mutazione nel *propositus*. Lo studio delle mutazioni, finora limitato a pochi pazienti, ha dimostrato 9 differenti mutazioni fra cui la R83C è risultata la più frequente (Lei *et al.*, 1994). Questa mutazione è risultata prevalente anche nella analisi mutazionale di 22 pazienti italiani (Stroppiano *et al.*, 1996).

L'obiettivo del trattamento è quello di mantenere una normale concentrazione di glicoso nel sangue. La normoglicemia è in grado di correggere la maggior parte delle alterazioni metaboliche e ridurre quindi la morbosità. La normoglicemia può essere raggiunta con pasti frazionati durante le 24 ore o con la nutrizione nasogastrica notturna associata a frazionamento diurno dei pasti oppure con l'introduzione di carboidrati a lenta liberazione di glicoso, quali amido di mais o amido di riso crudi. La distribuzione delle calorie dovrebbe essere: ca. 65-75% carboidrati, 10-15% proteine e 20-25% grassi. È consigliabile una riduzione dell'apporto di lattosio e saccarosio onde evitare che il galattosio e il fruttosio accentuino l'iperlattacidemia. La scelta dei tre approcci è in funzione dell'età e delle condizioni del paziente, del livello socio-economico della famiglia e della disponibilità del supporto medico.

Il frazionamento diurno dei pasti è indicato nei primi mesi di vita soprattutto quando è possibile l'allattamento materno a richiesta.

La nutrizione enterale notturna è una tecnica impegna-

tiva per la famiglia e non del tutto priva di pericoli ma, associata al frazionamento diurno dei pasti, è senz'altro il programma dietetico che offre i migliori risultati in termini di crescita staturale e limitazione delle complicanze.

Da circa 10 anni è stato introdotto l'uso dell'amido di mais crudo. Nei pazienti di età inferiore a 2 anni la dose di 1,6 g/kg dopo un pasto garantisce la normoglicemia per 4 ore. In età successive una dose superiore (1,75-2,5 g/kg) mantiene normali i livelli ematici di glicoso per 6-8 ore. In base all'esperienza acquisita nel corso degli anni, il trattamento con amido di mais è risultato più semplice rispetto all'alimentazione enterale, ma altrettanto efficace e sicuro (Chen *et al.*, 1993). L'enterale notturna dovrebbe essere riservata ai casi in cui il controllo metabolico è difficile o esistono complicanze precoci e la famiglia offre garanzie per la gestione del trattamento.

L'allopurinolo può essere di aiuto a ridurre l'iperuricemia.

Nei pazienti con GSD non-Ia il trattamento dietetico può essere associato alla somministrazione di G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor* [v. SANGUE*, col. *6506]), che riduce la incidenza delle infezioni e migliora la malattia infiammatoria cronica intestinale (Roe *et al.*, 1992).

Le misure dietetiche e farmacologiche hanno radicalmente modificato l'aspettativa e la qualità di vita di questi malati. La durata di vita è normale e sono note diverse donne che hanno condotto a termine la gravidanza. Esiste, tuttavia, in tutti i centri che seguono pazienti con GSD I una piccola percentuale di casi che non risponde al programma terapeutico. È verosimile che questa eterogeneità clinica corrisponda ad una eterogeneità genetica che non è stata ancora dimostrata.

Per i pazienti «non responders» può essere considerato il trapianto epatico che trova sicura indicazione per i casi con trasformazione maligna dell'adenoma. Il trapianto epatico corregge tutte le anomalie biochimiche. Il trapianto renale eseguito nei casi complicati da insufficienza renale non modifica le alterazioni metaboliche.

Glicogenosi II (GSD II)

Il difetto della α -glicosidasi ha uno spettro di manifestazioni cliniche i cui estremi sono rappresentati dalla forma grave, corrispondente alla classica descrizione di Pompe (v. VII, 382), e dalla forma di miopatia lentamente progressiva ad esordio tra 15 e 60 anni (Hirschhorn, 1995). Tra questi due estremi sono compresi fenotipi clinici differenti, chiamati «tipo tardo infantile» o «giovanile» o «variante muscolare», caratterizzati da esordio oltre il primo anno, in genere tra 2 e 15 anni, interessamento della muscolatura scheletrica, raro coinvolgimento cardiaco e decorso lento, ma comunque con *exitus* entro il secondo decennio di vita. Gli aspetti clinici più nuovi sono rappresentati dalle segnalazioni di patologia vascolare cerebrale nella forma giovanile (Kretschmar *et al.*, 1990), di sintomi bulbari nella forma dell'adulto (Barnes e Hughes, 1993) e di cardiomegalia senza interessamento della muscolatura scheletrica (Suzuki *et al.*, 1988).

L'accumulo di glicogeno, prevalentemente intralisosomale ma anche endocitoplasmatico, è pressoché generalizzato nella forma infantile e limitato alla muscolatura scheletrica nelle forme ad esordio tardivo, con l'eccezione di alcuni casi autotici in cui è stato osservato un accumulo a livello dei vasi cerebrali.

Le attività enzimatiche muscolari, soprattutto creatinfosfochinasi, sono elevate nel siero della forma infantile e, in minor grado, nella forma ad esordio tardivo. Il reperto dell'EMG è di tipo miopatico e sono frequenti scariche pseudomiotoniche.

La α -glicosidasi è pressoché assente nei linfociti e nei fibroblasti della forma infantile e assente o ridotta o pressoché normale nelle forme giovanile ed adulta, senza una correlazione tra attività enzimatica residua e fenotipo clinico (Reuser *et al.*, 1987). Nelle urine è presente un oligosaccaride contenente glicoso. La diagnosi prenatale è possibile su villi coriali e su amniociti coltivati.

Gli eterozigoti hanno in genere una attività enzimatica ridotta, ma esiste una sovrapposizione tra eterozigoti obbligati e popolazione normale (Loonen *et al.*, 1981).

La malattia è ad ereditarietà autosomica recessiva. Sono riportate variazioni intrafamiliari del fenotipo clinico con, ad es., tipo infantile e tipo adulto nella stessa famiglia (Dannon *et al.*, 1986).

Il gene strutturale e il cDNA (*copy DNA*; v. *1706) della α -glicosidasi sono stati isolati, caratterizzati e utilizzati per l'analisi della mutazione. In un limitato numero di pazienti sono stati dimostrati differenti tipi di mutazioni suggestive di una eterogeneità genetica, ma non ancora sufficienti per una correlazione genotipo-fenotipo (Huie *et al.*, 1994).

Non esiste alcun trattamento efficace. La terapia di supporto della sintomatologia respiratoria può migliorare la qualità di vita dei soggetti adulti affetti.

La denominazione di «g. IIb» si riferisce a rari pazienti con cardiomiopatia ipertrofica, minimi segni di miopatia scheletrica, creatinfosfochinasi elevata, talvolta ritardo mentale, accumulo intralisosomale di glicogeno e normale attività della maltasi acida (Tachi *et al.*, 1989).

Glicogenosi III (GSD III)

Si distinguono due sottotipi indicati GSD IIIa e GSD IIIb. La maggior parte di pazienti ha un interessamento epatico e muscolare (GSD IIIa). I sintomi epatici si attenuano con il tempo e in genere scompaiono alla pubertà. I sintomi muscolari sono lievi durante l'infanzia e progrediscono oltre l'adolescenza fino ad un quadro di atrofia muscolare nel 3°-4° decennio di vita. Il reperto elettromiografico è di tipo miopatico e può coesistere una alterazione della velocità di conduzione motoria. È frequente una ipertrofia ventricolare cardiaca, ma una alterazione della funzione è rara (Labrune *et al.*, 1991). Circa il 15% dei pazienti presenta invece solo una sintomatologia epatica a decorso migliorativo (GSD IIIb).

L'istologia epatica è caratterizzata dall'accumulo di glicogeno intraepatocitario e da fibrosi in assenza o quasi di accumulo lipidico, presente invece nella GSD I.

Il difetto enzimatico è generalizzato e si accompagna ad un aumento del glicogeno eritrocitario. Nel sottotipo IIIb l'attività enzimatica è conservata nel muscolo. Non esiste alcun test per distinguere tra i due sottotipi oltre al dosaggio enzimatico nel tessuto epatico e in quello muscolare. La normale attività della creatinfosfochinasi non esclude un coinvolgimento muscolare in età adulta (Coleman *et al.*, 1992).

La diagnosi degli eterozigoti non è completamente affidabile.

La diagnosi prenatale è tecnicamente difficile perché l'attività enzimatica è fisiologicamente bassa sui villi coriali e sugli amniociti.

Lo studio molecolare ha finora documentato una eterogeneità genetica a livello dell'mRNA (Yang *et al.*, 1992).

Il trattamento è più semplice di quello della GSD I. Il frazionamento dei pasti e la supplementazione con amido di mais sono limitati ai primi anni di vita, in cui è presente una ridotta tolleranza al digiuno. Un aumentato apporto proteico, sia con i pasti diurni sia con la nutrizione enterale notturna, è consigliato nei casi con interessamento musco-

lare, ma non esistono finora sicuri dati che questa misura dietetica possa prevenire o migliorare la miopatia.

Glicogenosi IV (GSD IV)

L'accumulo generalizzato di glicogeno di struttura anomala, simile all'amilopectina, condiziona una malattia multisistemica con prevalente manifestazione epatica. L'ipoglicemia compare solo nelle fasi terminali della cirrosi come espressione dell'insufficienza degli epatociti alla mobilizzazione del glicoso. Esistono rare varianti con epatopatia non progressiva (Greene *et al.*, 1988) o ad esordio in età adulta e limitate al sistema nervoso (PGBD; tab. I) (Bruno *et al.*, 1992).

Il quadro istologico epatico è caratterizzato da epatociti ingranditi, con inclusioni basofile nel citoplasma, e fibrosi intralobulare.

Sono possibili la diagnosi degli eterozigoti e la diagnosi prenatale.

Non esistono trattamenti specifici. Un accurato programma nutrizionale può ritardare l'insufficienza epatica candidata alla sostituzione dell'organo. In considerazione della natura multisistemica del disordine, il *follow-up* post-trapianto non è ancora sufficiente per una valutazione del successo a lungo termine del trapianto epatico (Selby *et al.*, 1991).

Glicogenosi V (GSD V)

Sono state osservate varianti ad esordio molto tardivo oltre il 7° decennio di vita e varianti ad esordio in età pediatrica. Sono noti lattanti con ipotonia, insufficienza respiratoria ed *exitus* nei primi mesi (Milstein *et al.*, 1989) e bambini con ritardo psicomotorio, debolezza muscolare prossimale, quadro elettromiografico di tipo miopatico ed aumento della creatinfosfochinasi (De La Marza *et al.*, 1980).

La diagnosi suggerita da iperammoniemia e da assenza di iperlattacidemia in risposta allo stimolo ischemico deve essere confermata dal dosaggio enzimatico sul tessuto muscolare.

Poiché tre mutazioni principali sono responsabili del difetto della fosforilasi muscolare, l'analisi molecolare può evitare la biopsia muscolare nella maggior parte dei pazienti (Tsujino *et al.*, 1993a, 1993b).

Non sembra necessario ricorrere a manipolazioni dietetiche per aumentare le prestazioni muscolari, dal momento che l'astensione dagli sforzi fisici è sufficiente al controllo della sintomatologia.

Glicogenosi VI (GSD VI)

Il difetto della fosforilasi epatica è una condizione benigna e spesso non riconosciuta. Le alterazioni metaboliche e l'epatomegalia sono modeste e in genere scompaiono dopo la pubertà. La diagnosi richiede il dosaggio enzimatico sul tessuto epatico.

Glicogenosi VII (GSD VII)

La fosfofruttochinasi è un enzima tetramero derivato da tre loci singoli sui cromosomi 1, 21 e 10 codificanti, rispettivamente, per la subunità muscolare (M), epatica (L) e piastrinica (P). Queste tre subunità sono variamente espresse nei tessuti. Il tessuto muscolare esprime solo la subunità M. Gli eritrociti esprimono le subunità M e L. Nella GSD VII classica una mutazione a livello del locus codificante la subunità M determina un difetto enzimatico completo nel muscolo. Gli eritrociti conservano circa il 50% dell'attività enzimatica codificata dalla subunità L. La presenza di entrambi gli isoenzimi M e L nelle varianti tardive giustifica l'esordio ritardato e la minore intensità dei sintomi.

Rispetto alla GSD V è caratteristica un'intolleranza all'attività fisica dopo un pasto ricco in carboidrati poiché il glicoso non solo non può essere utilizzato, ma anche riduce il livello di acidi grassi che sono una importante fonte energetica per il muscolo (Haller e Lewis, 1991). Sono note forme infantili a prognosi infausta (Servidei *et al.*, 1986) e forme ad esordio tardivo (Danon *et al.*, 1988).

Nel tessuto muscolare l'accumulo ha una struttura fibrillare simile all'amilopectina presente nella GSD IV. Si ritiene che ciò sia dovuto ad una attivazione della glicogeno-sintetasi da parte dell'eccesso di glicoso-6-fosfato nel muscolo.

Il difetto enzimatico può dimostrarsi anche sulle cellule del sangue. Sono riportate mutazioni responsabili del difetto enzimatico (Raben *et al.*, 1993). È possibile la diagnosi degli eterozigoti. Non risulta che sia stata eseguita la diagnosi prenatale.

Glicogenosi IX (GSD IX)

La fosforilasi chinasi è una proteina composta da quattro differenti subunità α , β , γ e δ presenti in differenti isoforme trascritte da geni differenti o da uno «splicing» differenziale dello stesso gene. Sono stati isolati dal muscolo (PHKA1) e dal fegato (PHKA2) due geni situati sul cromosoma X codificanti per due differenti subunità α . Una isoforma, subunità α' , presente nel cuore e nel muscolo scheletrico, deriva da uno «splicing» differenziale del gene PHKA1. Un gene codificante per la subunità β (PHKB) è stato localizzato nel cromosoma 16 e le isoforme della subunità β sono prodotti dello «splicing» differenziale di questo gene. Non ancora ben definite sono le subunità γ e δ . La complessità del sistema della fosforilasi chinasi si riflette nella eterogeneità genetica del difetto enzimatico.

La rarità della malattia, la sintomatologia clinica eguale, il decorso quasi sempre benigno, l'analisi enzimatica spesso limitata solo agli eritrociti e/o ai leucociti e la scarsità degli studi molecolari non hanno ancora permesso una precisa classificazione che dovrebbe essere basata sulla identificazione delle mutazioni nei differenti geni (Willems *et al.*, 1990). Al momento attuale si distinguono:

Glicogenosi epatica X-linked o glicogenosi IXa

È la più comune delle g. IX (circa il 75% dei casi). L'ereditarietà X-linked ha trovato conferma nel riscontro in quattro pazienti appartenenti a differenti famiglie di quattro differenti mutazioni nel gene PHKA2 localizzato in Xp22 (Hendrickx *et al.*, 1995). Il sintomo più rilevante è spesso solo il difetto staturale, che si corregge dopo la pubertà.

Il difetto della fosforilasi chinasi epatica è stato diagnosticato anche in soggetti di entrambi i sessi appartenenti a due differenti famiglie. Questa modalità di trasmissione, apparentemente autosomica recessiva, non ha finora trovato una spiegazione molecolare.

Glicogenosi epatica e muscolare o glicogenosi IXb

L'ereditarietà è autosomica recessiva ed il gene implicato è probabilmente PHKB (Madlom *et al.*, 1989).

L'epatomegalia e il difetto staturale si accompagnano ad una modesta sintomatologia muscolare. I sintomi scompaiono gradualmente con l'età.

Glicogenosi IXc

Si distinguono un fenotipo muscolare scheletrico ed un fenotipo cardiaco. Il difetto limitato alla muscolatura scheletrica è stato diagnosticato in soggetti di entrambi i sessi suggerendo una ereditarietà autosomica recessiva. In un paziente è stata individuata una mutazione a carico del gene PHKA1 che suggerisce una ereditarietà X-linked (Wehner *et al.*, 1994). Nelle femmine sono possibili mutazioni nello stesso gene con una lyonizzazione (teoria di Mary Lyon; XIV, 14; *3359) non favorevole o mutazioni in altri geni. Non

è noto il gene della fosforilasi chinasi, responsabile del difetto enzimatico limitato al cuore che è stato finora osservato solo in due casi, un maschio e una femmina.

Altre glicogenosi

Deficit di glicogenosintetasi

Questa condizione, molto rara, è impropriamente classificata tra le g. Il difetto enzimatico, infatti, porta ad una riduzione delle riserve di glicogeno piuttosto che ad un accumulo. I pazienti presentano precocemente ipoglicemia e iperchetonemia. L'epatomegalia è assente. Tipiche sono l'iperglicemia e l'iperlattacidemia postprandiali e la risposta al glucagone solo dopo il pasto (Aynsley-Green *et al.*, 1977). L'attività enzimatica si esprime solo sul tessuto epatico. La diagnosi richiede pertanto la biopsia epatica che, oltre a documentare il difetto enzimatico, evidenzia una riduzione del contenuto di glicogeno.

La terapia dietetica comporta pasti frequenti particolarmente ricchi in proteine.

Sindrome di Fanconi-Bickel

Questa malattia, molto rara, è stata confusa con la GSD I. Il difetto metabolico non è ancora noto. I pazienti manifestano precocemente difetto di crescita, epatomegalia, nefromegalia e rachitismo. L'ipoglicemia e l'iperchetonemia non sono comuni. I segni di laboratorio caratteristici sono il diabete glico-fosfoaminico, l'acidosi, l'ipofosforemia, l'iperfosfatemia e una intolleranza al carico orale di galattoso (Hurvitz *et al.*, 1989).

La terapia è sintomatica. Una restrizione dell'apporto dietetico di galattoso e un elevato apporto calorico possono migliorare l'accrescimento.

Deficit di fosfoglicoisomerasi

È stato documentato in un bambino di otto anni con ritardo mentale, debolezza muscolare ed epatomegalia. I pasti frequenti a basso contenuto in carboidrati normalizzano il volume epatico (Van Biervliet e Staal, 1977).

Difetti della glicolisi

Il difetto della fosfoglicerato chinasi (DiMauro *et al.*, 1983), quello della fosfoglicerato mutasi (Tsuji *et al.*, 1993c) e quello della lattato deidrogenasi (Nagata *et al.*, 1982) risultano in sintomi simili a quelli della GSD V.

Va segnalata l'esistenza dell'Associazione Italiana Glicogenosi (via Matteotti 14/E - 20090 Assago [MI] - tel. 02/45703334), che riunisce pazienti affetti da g. e svolge una mentoraria azione di indirizzo e consulenza per i loro problemi.

Bibliografia

- Aynsley-Green A., Williamson D. H., Gitzelmann R., *Arch. Dis Child.*, 1977, **52**, 573.
 Barnes D., Hughes R. A. C., *J. R. Soc. Med.*, 1993, **86**, 50.
 Bruno C., Servidei S., Shanske S. *et al.*, *Neurology*, 1992, **42** (S3), 230.
 Chen Y. T., Bazarre C., Lee M. M. *et al.*, *Eur. J. Pediatr.*, 1993, **152** (S1), 56.
 Chen Y. T., Burchell A., *Glycogen Storage Disease*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7 ed., vol. I, 1995, McGraw Hill, New York, pp. 935-965.
 Coleman R. A., Winters H. S., Wolf B. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1992, **116**, 896.
 Cornblath M., Schwartz R., *Disorders of glycogen metabolism*, in Cornblath M., Schwartz R. eds., *Disorders of Carbohydrate Metabolism in Infancy*, 3 ed., 1991, Blackwell Scientific, Boston.
 Danon M. J., DiMauro S., Shanske S. *et al.*, *Neurology*, 1986, **36**, 818.
 Danon M. J., Servidei S., DiMauro S., *Neurology*, 1988, **38**, 956.
 De La Marza M., Patten B. M., Williams J. C. *et al.*, *Neurology*, 1980, **30**, 402.
 DiMauro S., Miranda A. F., Khan S. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 1983, **13**, 11.
 Fernandes J., *The Hepatic glycogen storage disease*, in Fernandes J., Bremer H. J., Saudubray J. M. eds., *Inherited Metabolic Disease, Diagnosis and Treatment*, 1989, Springer Verlag, Berlin.
 Greene H. L., Brown B. I., McClenathan D. T. *et al.*, *Hepatology*, 1988, **8** (2), 302.
 Haller R. G., Lewis S. F., *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 364.
 Hendrickx J., Coucke P., Dams E. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1995, **4**, 77.

Hirschhorn R., *Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency*, in Scriver R. C., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7 ed., vol. I, 1995, McGraw Hill, New York, pp. 2443-2464.

- Huie M. L., Chen A. S., Grix A., *Hum. Mol. Genet.*, 1994, **3**, 1081.
 Hurvitz H., Elpeg O. N., Barash V. *et al.*, *Eur. J. Pediatr.*, 1989, **149**, 48.
 Kretzschmar H. A., Wagner H., Hubner G., *J. Neurol. Sci.*, 1990, **98**, 169.
 Labrune Ph., Huguet P., Odievre M., *Pediatr. Cardiol.*, 1991, **12**, 161.
 Lei K.-J., Pan C.-J., Shelley L. L. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1994, **93**, 1994.
 Loonen M. C. B., Schram A. W., Koster J. F. *et al.*, *Clin. Genet.*, 1981, **19**, 55.
 Madlom M., Besley G. T. N., Cohen P. T. W. *et al.*, *Eur. J. Ped.*, 1989, **149**, 52.
 Milstein J. M., Herron T. M., Haas J. E., *J. Child Neurol.*, 1989, **4**, 186.
 Moses S. W., *J. Inherited Metab. Dis.*, 1990, **13**, 452.
 Moses S. W., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1990, **11**, 155.
 Nagata N., Miike T., Matsuda I. *et al.*, *Neuropediatrics*, 1982, **13**, 103.
 Pears J. S., Jung R. T., Hopwood D. *et al.*, *Q. J. Med.*, 1992, **82**, 207.
 Rahen N., Sherman J., Miller F. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 4963.
 Reuser A. J. J., Kroos M., Willemsen R. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1987, **79**, 1689.
 Roe T. F., Coates T. D., Thomas D. W. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 1666.
 Selby R., Starzl T. E., Yunis E. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 39.
 Servidei S., Bonilla E., Diedrich R. G., *Neurology*, 1986, **36**, 1465.
 Shin Y. S., *J. Inherited Metab. Dis.*, 1990, **13**, 419.
 Stroppiano M., Mazzotti R., Filocamo M. *et al.*, *Europ. J. Hum. Genet.*, 1996, **4**, Suppl. 1, 131.
 Suzuki Y., Tsuji A., Omura K. *et al.*, *Clin. Genet.*, 1988, **33**, 376.
 Tachi N., Tachi M., Sasaki K., *Pediatr. Neurol.*, 1989, **5**, 60.
 Tsujino S., Shanske S., DiMauro S. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1993a, **54**, 44.
 Tsujino S., Shanske S., DiMauro S., *N. Engl. J. Med.*, 1993b, **329**, 241.
 Tsujino S., Shanske S., Sakoda S. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1993c, **52**, 472.
 Van Biervliet J. P., Staal G. E., *Acta Paediatr. Scand.*, 1977, **66**, 311.
 Wehner M., Clemens P. R., Engel A. G. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1994, **3**, 1983.
 Willems P. J., Gerver W. J. M., Berger R. *et al.*, *Eur. J. Pediatr.*, 1990, **149**, 268.
 Yang B. Z., Ding J. H., Enghild J. J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 9294.

ROSANNA GATTI

GLICOSO-6-FOSFATODEIDROGENASI [v. vol. VII, coll. 414-418]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2522). - **Metodi di dosaggio** (col. 2523). - **Favismo** (col. 2524). - **Rapporto tra deficit di G6PD e altre patologie** (col. 2526): *G6PD e infezioni batteriche*. - *G6PD e coeliaciti*. - *G6PD e cataratta*. - *G6PD e diabete mellito*. - *G6PD e cancro*.

Introduzione

Il deficit di glicosio-6-fosfatodeidrogenasi (G6PD), geneticamente trasmesso attraverso il cromosoma X, è la più comune anomalia metabolica del globulo rosso. Esso colpisce circa quattrocento milioni di persone al mondo, con una distribuzione variabile nelle diverse aree geografiche. Il difetto enzimatico è eterogeneo dal punto di vista genetico: sono state infatti finora individuate circa 300 diverse varianti dovute a differenti mutazioni alleliche del gene codificante per la G6PD. Nei maschi G6PD carenti (emizigoti), nei quali l'unico cromosoma X è portatore del deficit enzimatico, tutte le emazie sono prive dell'enzima. La stragrande maggioranza delle femmine enzimpopeniche, invece, sono eterozigoti, hanno cioè uno soltanto dei due cromosomi X portatore del difetto e l'altro normale: pertanto esse presentano una doppia popolazione eritrocitaria, una con

l'enzima e l'altra che ne è priva. Solo una piccola percentuale delle femmine enzimopeniche (omozigoti), ossia quelle nelle quali entrambi i cromosomi X sono portatori del difetto, è caratterizzata dall'assenza totale della G6PD in tutte le emazie (Luzzatto e Mehta, 1995). Per l'ipotesi formulata da Mary Lyon nel 1961, nelle femmine eterozigoti la percentuale delle emazie enzimopeniche non è sempre pari alla metà, ma la proporzione fra le due popolazioni cellulari (quella con attività enzimatica normale e quella con assenza dell'attività enzimatica) è estremamente variabile; questo aspetto può portare a livelli di attività enzimatica complessiva che possono essere, in alcuni casi, molto vicini al normale o al deficit totale. Questo fa sì che con le metodiche più comunemente impiegate la diagnosi di deficit di G6PD possa non essere sempre sicura. D'altronde i metodi che danno affidamento per evidenziare il mosaicismo enzimatico nelle femmine sono costosi, necessitano di laboratori particolarmente attrezzati e di tempi e modalità di esecuzione lunghi e complessi.

Metodi di dosaggio

I metodi attualmente impiegati sono qui di seguito elencati.

a) *Metodo spettrofotometrico*. – Esso è basato sulla misurazione del tasso di riduzione del NADP a NADPH quando l'emolisato è incubato con G6P (Beutler, 1975). Poiché i livelli di attività enzimatica negli eritrociti giovani sono più alti rispetto ai più vecchi, una reticolocitosi elevata, come quella che si riscontra comunemente in corso di anemia emolitica, può dare un risultato falsamente normale. Questa difficoltà può essere superata o filtrando i globuli rossi attraverso una microcolonna di cellulosa o ultracentrifugando il campione e misurando l'attività nei globuli rossi del fondo che sono i più vecchi. Con questo metodo, tuttavia, non è possibile individuare le femmine eterozigoti con un numero ridotto di emazie enzimopeniche.

b) *Metodo dello spot-test*. – È utilizzato soprattutto per screening di massa in quanto utilizza piccole quantità di sangue che viene raccolto su carta bibula Whatman n. 1. Quando nel campione è presente la G6PD, il G6P viene ossidato a 6 fosfogluconato e il NADP è ridotto a NADPH e alla luce ultravioletta non si osserva alcuna fluorescenza. Un'intensa fluorescenza si osserva invece nei campioni di soggetti normali (Beutler *et al.*, 1979). Anche questo metodo si è rivelato poco affidabile per una diagnosi di certezza in quelle femmine eterozigoti che presentano una popolazione eritrocitaria con una prevalenza di emazie normali rispetto a quelle enzimopeniche.

c) *Metodo della riduzione della metemoglobina*. – È basato sulla capacità che hanno i globuli rossi normali di trasformare la metemoglobina, che si forma incubando un campione di sangue intero con nitrito di sodio, in presenza di blu di metilene (Brewer *et al.*, 1960). Nelle emazie G6PD carenti, nelle quali come è noto il NADPH e il GSH (glutathione ridotto) indispensabili per questa trasformazione sono ridotti o assenti, questo fenomeno non si verifica, per cui il sangue dopo l'incubazione assume un colorito bruno dovuto alla presenza di metemoglobina. È un metodo poco costoso che viene usato per gli screening di massa. Nella nostra lunga esperienza esso permette di diagnosticare con sicurezza tutti i maschi, tutte le femmine omozigoti e circa il 70% di quelle eterozigoti. V. anche SANGUE, XIII, 1931.

d) *Metodo citochimico*. – Al sangue utilizzato per il test della riduzione della metemoglobina viene aggiunto cianuro di potassio che trasforma l'emoglobina e la metemoglobina rispettivamente in cianemoglobina e cianometemoglobina (Sansone *et al.*, 1963). Viene quindi eseguito uno striscio su vetrino che poi è sottoposto a colorazione con ematossilina acida ed eritrosina. Le emazie contenenti cia-

nemoglobina (normali) appaiono colorate in rosso, quelle contenenti cianometemoglobina (enzimopeniche) non presentano alcuna colorazione. Questo metodo, che ha dei tempi di attuazione piuttosto lunghi e che richiede una certa esperienza di laboratorio, è però affidabile anche per la diagnosi di eterozigosi.

e) *Utilizzazione del 2dG6P*. – Questa metodica è basata sulla diversa utilizzazione del 2dG6P, un analogo del substrato normale G6P, da parte dell'enzima normale e da parte della variante Mediterranea della G6PD (Ferraris *et al.*, 1981). L'enzima normale utilizza infatti il 2dG6P in misura non superiore al 5%, mentre negli emizigoti e nelle omozigoti l'utilizzazione supera il 28%. Nelle femmine eterozigoti, a seconda del grado di mosaicismo, l'utilizzazione della 2dG6PD oscilla tra il 6 e il 27%. Questa tecnica, oltre che sui globuli rossi, è stata utilizzata sulle cellule mononucleari e sulle piastrine per dimostrare l'origine clonale di diverse patologie ematologiche quali la leucemia linfatica (Ferraris *et al.*, 1985) e non (Ferraris *et al.*, 1984) e la piastrinosi (Gaetani *et al.*, 1982).

f) *Diagnosi molecolare attraverso lo studio del DNA*. – Con questa metodica, oltre alla variante Mediterranea e a quella A⁺, è possibile l'identificazione delle mutazioni che sono alla base dell'anemia emolitica cronica associata a deficit di G6PD (Beutler, 1991). Essa consiste nell'amplificazione della regione appropriata del gene mediante una polimerasi e nella digestione del segmento amplificato con endonucleasi di restrizione. Con l'analisi del DNA è possibile anche l'identificazione delle eterozigoti. Tale tecnica è utilizzata solo in pochi e attrezzati laboratori.

Bibliografia

- Beutler E., *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*, 1975, 2 ed., Grune & Stratton, New York, pp. 66-69.
 Beutler E., *N Engl J Med*, 1991, **324**, 169-174.
 Beutler E., Blume K. G. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1979, **43**, 465-467.
 Brewer G. J., Tarlow A. R., Alvin S., *Bull. World. Health Organization*, 1960, **22**, 633-640.
 Ferraris A. M., Broccia G. *et al.*, *Blood*, 1984, **64**, 817-820.
 Ferraris A. M., Canepa L. *et al.*, *Am. J. Hematol.*, 1985, **20**, 81-83.
 Ferraris A. M., Giuntini P. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1981, **33**, 307-313.
 Gaetani G. F., Ferraris A. M. *et al.*, *Blood*, 1982, **59**, 76-78.
 Luzzatto L., Mehta A., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, in: Scriver C. R., Beaudet R. A. L., Sly W. S., Vallet D. eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 7 ed., Mc Graw-Hill, New York, pp. 3367-3398.
 Lyon M. F., *Nature*, 1961, **190**, 272-273.
 Sansone G., Rasore-Quartino A., Veneziano G., *Pathologica*, 1963, **55**, 371-375.

TULLIO MELONI E GIANFRANCO MELONI

Favismo

Con il termine di favismo (v.) viene indicato un quadro clinico caratterizzato da anemia acuta, ittero ed emoglobinuria che può insorgere, nei soggetti G6PD carenti, a distanza di 24-48 h dall'ingestione di fave fresche, secche o congelate. Poiché non sempre l'ingestione di fave determina l'insorgenza di una crisi emolitica acuta in tutti i soggetti enzimopenici, se ne può dedurre che il difetto enzimatico è un fattore necessario, ma di per sé non sufficiente, a produrre l'emolisi. Altri fattori pertanto, siano essi dei fattori intra- e/o extraeritrocitari geneticamente determinati e/o ambientali, svolgerebbero un ruolo importante nella etiopatogenesi del favismo.

Per quanto riguarda i fattori intraeritrocitari, Siniscalco e collaboratori hanno segnalato nel 1961 una minore incidenza del favismo in soggetti G6PD carenti portatori del trait β -talassemico. Successivi studi condotti da Meloni (dati non pubblicati), utilizzando, per la determinazione dell'HbA₂, la cromatografia su colonna, non hanno confermato tale effetto protettivo. Le fosfatasi acide eritrocitarie

dei fenotipi P^a e P^c favorirebbero invece l'insorgenza del favismo nei soggetti G6PD carenti (Bottini *et al.*, 1961).

Per quanto riguarda i fattori extraeritrocitari, invece, è stata evidenziata una ridotta capacità epatica a glicuronare la salicilamide (Cassimos *et al.*, 1974). Tale ridotta glicuronazione è stata successivamente confermata non solo nei bambini durante la crisi fabica, ma anche nei loro genitori con anamnesi positiva per anemia emolitica acuta da ingestione di fave (Cuttillo *et al.*, 1976). È stata inoltre documentata in questi soggetti una ridotta escrezione dell'acido D-glucarico (Cassimos *et al.*, 1974).

In corso di favismo sono stati infine segnalati una riduzione dei linfociti formanti rosette con eritrociti di pecora, un'inversione del rapporto tra T helper e T suppressor nel sangue periferico (Schilirò *et al.*, 1986), un aumento delle SGPT, delle γ -GT, e delle GDLH (Meloni *et al.*, 1979), una riduzione dell'emoglobina glicata (Baule *et al.*, 1983), un aumento del calcio eritrocitario accompagnato da una riduzione del potassio come conseguenza della riduzione della ATPasi di membrana calcio-dipendente (Damonte *et al.*, 1992) ed una diminuzione dei livelli della catalasi (Gaetani *et al.*, 1996).

L'osservazione che i casi di favismo tendono a concentrarsi in alcune famiglie (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1965) ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di due geni, uno dei quali regolerebbe l'assorbimento delle sostanze tossiche per i globuli rossi contenute nelle fave: l'acido ascorbico, la L-dopa, la convicina e la vicina. Queste ultime due molecole sarebbero trasformate, ad opera delle β -glicosidasi intestinali, rispettivamente in isouramide e divicina, sostanze queste considerate responsabili della lisi eritrocitaria mediante un meccanismo di tipo ossidativo (Mager *et al.*, 1965). L'ipotesi che, i soggetti G6PD carenti che sviluppano favismo avessero livelli di attività β -glicosidasiche intestinali più elevati rispetto ai soggetti enzimopenici senza pregressi episodi emolitici non è stata confermata (Mareni *et al.*, 1984).

Il favismo, come è noto, è localizzato ad un'area geografica relativamente ristretta, interessante il bacino del Mediterraneo, l'Estremo Oriente e l'Asia meridionale. La sua maggiore incidenza si riscontra in Sardegna (Sansone *et al.*, 1958). Fino a qualche anno fa nessun caso di favismo era stato segnalato fra i soggetti di razza negra; ultimamente invece sono stati descritti dei casi di anemia emolitica da ingestione di fave in soggetti con variante A⁻ (Calabrò *et al.*, 1989; Galiano *et al.*, 1990). Queste osservazioni possono essere spiegate con le modificazioni delle abitudini alimentari verificatesi in questi anni tra le popolazioni africane al di fuori del loro paese di origine. Le differenti abitudini alimentari spiegano anche il maggior numero dei casi di favismo dovuti all'ingestione di fave secche che si osservano in Grecia rispetto alla Sardegna (Kattamis *et al.*, 1969; Meloni *et al.*, 1983).

I bambini, ed in maniera particolare quelli nella fascia di età compresa tra i 2 e i 6 anni, sono maggiormente suscettibili al favismo rispetto agli individui adulti; da una indagine retrospettiva condotta nella Sardegna settentrionale (Meloni *et al.*, 1983), è risultato infatti che il 70% di tutti i ricoveri per favismo era costituito da bambini.

Fino a qualche anno fa quasi tutti i casi venivano osservati nei mesi di aprile e maggio ed erano causati dall'ingestione di fave fresche. Nella nostra esperienza non è stato osservato nessun caso di favismo durante la fioritura delle fave; questo ci induce ad escludere che l'inalazione del polline della *Vicia faba* possa scatenare una crisi emolitica. Un numero limitato di casi di favismo si osservano durante il periodo invernale a seguito del consumo di fave secche o surgelate (Meloni *et al.*, 1992). Casi di favismo sono stati

inoltre descritti in lattanti allattati al seno le cui madri avevano mangiato fave (Kattamis, 1971; Schilirò *et al.*, 1979). Recentemente è stato segnalato un caso di favismo in utero in una neonata la cui madre aveva consumato fave fresche nell'ultima settimana prima del parto (Corchia *et al.*, 1995).

Il sesso maschile è quello più frequentemente colpito: su 100 casi di favismo in età pediatrica solamente il 30% è infatti costituito da bambine (Meloni *et al.*, 1983). Il favismo, oltre che più frequente, è anche più grave nei maschi, nei quali quasi sempre è necessario ricorrere alla trasfusione di pappia di emazie, che rimane a tutt'oggi l'unica terapia valida, non essendo stata confermata la capacità della desferrossamina di bloccare la crisi emolitica in atto (Meloni *et al.*, 1986).

Negli ultimi 15 anni si è osservato nella Sardegna settentrionale una drastica riduzione dei casi di favismo, passando da una media di 60-70 casi all'anno a circa 10 casi, con una inversione del rapporto maschi/femmine. Tale riduzione è sicuramente da attribuirsi allo screening neonatale per la G6PD che è stato introdotto a partire dal 1970 (Meloni *et al.*, 1992) e che ha consentito di identificare alla nascita la totalità dei soggetti enzimopenici di sesso maschile ed il 70% circa di quelli di sesso femminile, mettendo così in grado i sanitari di fornire alle famiglie degli individui G6PD carenti le informazioni su tale deficit enzimatico, sulle problematiche ad esso correlate e sulle modalità da osservare per evitare le crisi emolitiche.

Bibliografia

- Baule G. M., Onorato D., *et al.*, *Acta Haematol.*, 1983, **69**, 15-18.
 Bottini E., Lucarelli P., *et al.*, *Science*, 1971, **171**, 409-411.
 Calabrò V., Cascone A., *et al.*, *Haematologica*, 1989, **74**, 71-73.
 Cassimos C., Malaka-Zafiriou K., *et al.*, *J. Pediatr.*, 1974, **84**, 110-111.
 Cassimos C., Malaka-Zafiriou K., Tsiures T., *J. Pediatr.*, 1974, **84**, 871-872.
 Corchia C., Balata A., *et al.*, *J. Pediatr.*, 1995, **127**, 807-808.
 Cuttillo S., Costa S., *et al.*, *Acta Haematol.*, 1976, **55**, 296-299.
 Damonte G., Guida L., *et al.*, *Cell Calcium*, 1992, **13**, 649-658.
 Gaetani G. F., Rolfo M., *et al.*, *Blood*, 1996, **88**, 1084-1088.
 Galiano S., Gaetani G. F., *et al.*, *Br. Med. J.*, 1990, **300**, 236.
 Kattamis C. A., *Arch. Dis. Child.*, 1971, **46**, 741.
 Kattamis C. A., Kyriazakou M., Chaidas S., *J. Med. Genet.*, 1969, **6**, 34-41.
 Luzzatto L., Metha A., *Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency*, in Scriver C. R., *et al.*, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, vol. 3, McGraw-Hill, New York, pp. 3367-3398.
 Mager J., Glaser G., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, **20**, 35-40.
 Mareni C., Repetto L., *et al.*, *J. Med. Genet.*, 1984, **21**, 278-280.
 Meloni T., Forteleoni G., *et al.*, *Acta Haematol.*, 1983, **70**, 83-90.
 Meloni T., Forteleoni G., *et al.*, *Acta Haematol.*, 1992, **87**, 29-31.
 Meloni T., Forteleoni G., Gaetani G. F., *Br. J. Haematol.*, 1986, **63**, 394-395.
 Meloni T., Pilo G., *et al.*, *Acta Haematol.*, 1979, **62**, 71-73.
 Sansone G., Piga A. M., Segni G., *Il favismo*, 1958, Minerva Medica, Torino.
 Schilirò G., Minniti C., *et al.*, *Am. J. Hematol.*, 1986, **21**, 173-176.
 Schilirò G., Russo A., *et al.*, *Clin. Genet.*, 1979, **15**, 183-188.
 Siniscalco M., Bernini L., *et al.*, *Nature*, 1961, **190**, 1179-1180.
 Stamatoyannopoulos G., Frazer G. R., *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1966, **18**, 253-263.

LUIGIO MELONI E GIANFRANCO MELONI

Rapporto tra deficit di G6PD ed altre patologie

Il deficit di G6PD può rimanere asintomatico per tutta la vita o dare origine a diverse manifestazioni cliniche: anemia emolitica acuta (da ingestione di fave [v. sopra], da farmaci, da infezioni batteriche o virali), anemia emolitica cronica non sferocitica ed iperbilirubinemia neonatale (Luzzatto, 1993). Recentemente è stata inoltre ipotizzata l'esistenza di correlazioni tra il deficit di G6PD ed altre patologie differenti da quelle precedentemente menzionate.

G6PD e infezioni batteriche

La carenza enzimatica dei soggetti con deficit di G6PD non riguarda solo gli eritrociti ma anche i leucociti e numerosi altri tessuti. È stata riportata da diversi AA. (Lampe *et al.*, 1975; Clark e Root, 1979; Mallouh e Abu-Osba, 1987; Abu-Osba *et al.*, 1989) una maggiore suscettibilità da parte degli individui G6PD carenti alle infezioni da batteri catalasi-positivi, dovuta alla ridotta produzione di NADPH, cofattore nella prima reazione del *burst* ossidativo dei neutrofili: questo porterebbe, nei casi più gravi di deficit di G6PD, a un quadro clinico simile a quello della malattia granulomatosa cronica. In uno studio condotto nel Nord Sardegna (Meloni *et al.*, 1991) è stato dimostrato che i soggetti G6PD carenti non presentano un aumentato rischio di sviluppare infezioni gravi causate da germi catalasi-positivi. Questo può essere spiegato dai livelli dell'attività della G6PD nei granulociti di alcuni soggetti enzimopenici, esaminati nel corso dello stesso studio, i quali sono risultati pari a circa il 25% dei valori normali e dai livelli dell'attività fagocitaria e battericida che erano sovrapponibili a quelli dei granulociti di controlli normali. Questi risultati hanno confermato *in vivo* quanto già dimostrato da Rodey *et al.* (1970) *in vitro*; questi AA. hanno infatti rilevato deficit funzionali a carico dei leucociti di soggetti G6PD carenti soltanto quando i livelli enzimatici leucocitari erano inferiori al 5% dei valori normali.

G6PD e colelitiasi

La calcolosi biliare è una patologia comune, la cui frequenza aumenta col progredire dell'età. Tuttavia, in soggetti con anemia emolitica cronica, essa può insorgere più precocemente e con una maggiore frequenza. Nei pazienti con anemia emolitica cronica associata a deficit di G6PD la formazione di calcoli biliari, costituiti da bilirubina, è stata messa in rapporto con la marcata riduzione della vita media eritrocitaria (Luzzato, 1975). La correlazione tra calcolosi biliare e deficit di G6PD in soggetti sia allo stato di omo- o emizigosi che a quello di eterozigosi senza anemia emolitica cronica è stata recentemente studiata ed è risultata essere statisticamente significativa (Meloni *et al.*, 1991). Nei maschi con calcolosi biliare, tuttavia, la percentuale dei soggetti enzimopenici è risultata maggiore di quella osservata nelle femmine. La più elevata prevalenza di colelitiasi nei maschi è dovuta al fatto che tutte le emazie sono enzimopeniche e, avendo queste una vita media ridotta, si ha una maggiore produzione di bilirubina e quindi una maggiore probabilità che nel tempo si sviluppi una calcolosi. Nelle femmine la più bassa prevalenza rispetto ai maschi si può spiegare con la più elevata frequenza delle eterozigoti rispetto alle omozigoti. Le femmine eterozigoti hanno, com'è noto, una doppia popolazione eritrocitaria, una con livelli enzimatici normali, l'altra totalmente priva di attività enzimatica. Ciò implica una minore produzione di bilirubina e quindi una minore incidenza di calcolosi sia rispetto ai maschi emizigoti che alle femmine omozigoti.

G6PD e cataratta

Una correlazione positiva fra deficit di G6PD e cataratta è stata riportata da alcuni AA. (Orzalesi *et al.*, 1984; Moro *et al.*, 1985). Nei soggetti G6PD carenti, il GSH (glutathione ridotto) presenta livelli più bassi rispetto ai soggetti normali, anche a livello del cristallino. Un blocco dello *shunt* dei pentosi nel cristallino porterebbe a una minor sintesi di riboso, che ha come conseguenza un rallentamento del *turnover* proteico. Inoltre, la ridotta disponibilità di NADPH non permetterebbe la riconversione del GSSG (disolfuro del glutathione) a GSH con riduzione della solubilità delle proteine

di membrana sottoposte all'azione del perossido d'idrogeno e conseguente formazione di cataratta. In altri studi (Addis e Vitali, 1970; Panich e Na-Nakorn, 1970; Meloni *et al.*, 1990), tuttavia, tale correlazione non è stata confermata. In uno di questi ultimi studi (Meloni *et al.*, 1990) sono stati dosati i livelli del GSH nel cristallino: tali livelli sono risultati pari al 20% circa nei maschi emizigoti e intorno al 40% nelle femmine eterozigoti rispetto ai valori riscontrati nei controlli. Tali dati dimostrano che, pur avendo i soggetti enzimopenici bassi livelli di GSH nel cristallino, il numero dei soggetti G6PD carenti con cataratta non differisce da quello della popolazione generale. È perciò ragionevole supporre che il deficit di G6PD non svolga un ruolo determinante nella patogenesi della cataratta rispetto ad altri fattori quali la familiarità, l'altitudine e l'esposizione alla luce solare.

G6PD e diabete mellito

Un'associazione positiva fra diabete mellito e deficit di G6PD è stata riportata da alcuni AA. (Saha, 1979; Saeed *et al.*, 1985). In accordo con altri studi (Channugan e Frumin, 1964; Eppes *et al.*, 1966), tuttavia, non è stata riscontrata nessuna differenza per quanto riguarda la prevalenza del deficit di G6PD fra soggetti diabetici e popolazione generale in una ampia casistica di pazienti sardi con diabete sia insulinodipendente che non-insulinodipendente (Meloni *et al.*, 1992).

Il dato più rilevante che è emerso dagli studi di correlazione tra diabete mellito e deficit di G6PD finora intrapresi è però quello relativo al controllo dell'omeostasi glicidica quale può essere rilevato mediante il dosaggio dell'emoglobina glicata. I valori dell'emoglobina glicata sono infatti risultati significativamente ridotti nei soggetti diabetici G6PD carenti rispetto a quelli non G6PD carenti (Meloni *et al.*, 1994). I più bassi livelli di l'HbA_{1c} negli enzimopenici sono da mettere in relazione con la ridotta vita media degli eritrociti G6PD carenti e pertanto con la presenza in circolo di emazie più giovani rispetto a quanto si osserva nei soggetti normali e non con un migliore controllo metabolico del diabete. Questi risultati dovrebbero suggerire la necessità di effettuare la determinazione dell'attività enzimatica della G6PD in tutti i pazienti diabetici provenienti da zone ad alta prevalenza del deficit enzimatico per una più corretta valutazione del grado di omeostasi glicemica.

G6PD e cancro

Una minore prevalenza del cancro nei soggetti G6PD carenti è stata segnalata per la prima volta da Beauchfield *et al.* (1965). Questa osservazione è stata successivamente confermata da alcuni AA. (Beutler, 1994). Studi successivi, quali quello di Ferraris *et al.* (1988), che hanno esaminato 471 pazienti maschi di origine sarda con tumori dell'apparato emopoietico, e di Forteleoni *et al.* (1988), i quali hanno indagato 150 donne affette da cancro della mammella, hanno portato a ridimensionare l'esistenza di un nesso tra queste neoplasie e deficit di G6PD. Sarebbe auspicabile che venissero condotti studi clinico-epidemiologici mirati a valutare l'esistenza o meno di una correlazione tra il deficit di G6PD ed altri tipi di neoplasie prese singolarmente.

Bibliografia

- Abu-Osba Y. K., Mallouh A. A., Hann. R. W., *J. Pediatr.*, 1989, **114**, 748-752.
 Addis A., Vitali G., *Boll. Ocul.*, 1970, **49**, 374-377.
 Beauchfield P., Rainsbury R., Kalton G., *Oncologia*, 1965, **19**, 11-19.
 Beutler E., *Blood*, 1994, **84**, 3613-3636.
 Channugan D., Frumin A. M., *N. Engl. J. Med.*, 1964, **271**, 1202-1204.
 Clark M., Root R. K., *Yale J. Biol. Med.*, 1979, **52**, 169-179.
 Eppes R. B., Brewer G. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1966, **275**, 855-861.

- Ferraris A. M., Broccia G. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1988, **42**, 516-521.
 Forteleoni G., Argiolas L. et al., *Tumori*, 1988, **74**, 665-667.
 Lampe R. M., Kirdpon S. et al., *J. Pediatr.*, 1975, **87**, 576-578.
 Luzzatto L., *Clin. Hematol.*, 1975, **1** (4), 83-108.
 Luzzatto L., *G6PD deficiency and hemolytic anemia*, in Nathan D. V., Oski F. A. eds., *Hematology of Infancy and Childhood*, 1993, 4 ed., Saunders Philadelphia, 1993, 674-695.
 Mallouh A. A., Abu-Osba Y. K., *J. Pediatr.*, 1987, **111**, 850-852.
 Meloni T., Carta F. et al., *Am. J. Ophthalmol.*, 1990, **110**, 661-664.
 Meloni T., Forteleoni G. et al., *J. Pediatr.*, 1991, **118**, 909-911.
 Meloni T., Forteleoni G. et al., *Acta Haematol.*, 1991, **85**, 76-78.
 Meloni T., Pacifico A. et al., *Huematologica*, 1992, **77**, 94-95.
 Meloni T., Pacifico A. et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1994, **23**, 59-61.
 Moro F., Gorgone G. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1985, **5**, 197-200.
 Orzalesi N., Fossarello M. et al., *Doc Ophthalmol.*, 1984, **57**, 187-201.
 Panich V., Na-Nakorn S., *Hum. Genet.*, 1980, **55**, 123-124.
 Rodey G. H., Jacob H. S. et al., *Lancet*, 1970, **1**, 355.
 Saeed T. K., Hamami H. A., Alwan A. A. S., *Diabet. Med.*, 1985, **2**, 110-112.
 Saha N., *J. Med. Genet.*, 1979, **16**, 431-434.

TULLIO MELONI E GIANFRANCO MELONI

GLUTAMMATO, ANTAGONISTI DEL

F. antagonistes du glutammate. - t. glutamate antagonists. - t. glutamat Antagonisten. - s. glutamato antagonistas del.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2529). - **Eccitotossicità del glutammato** (col. 2529): **Meccanismi coinvolti nell'eccitotossicità**. - **Farmacologia dei recettori del glutammato** (col. 2530): **Recettori per l'NMDA**. - **Recettori AMPA/kainato**. - **Recettori metabotropici**. - **Stadi della morte neuronale indotta dalla stimolazione dei recettori per il glutammato** (col. 2532): **Induzione**. - **Amplificazione**. - **Espressione**. - **Considerazioni conclusive** (col. 2533).

Introduzione

Il glutammato è il più diffuso neurotrasmettitore (v. NEUROTRASMETTITORI*) eccitatorio nel cervello e la sua interazione con specifici recettori è responsabile di una estrema varietà di fenomeni fisiologici quali lo sviluppo neuronale, la sinaptogenesi, la plasticità neuronale, la sopravvivenza post-trauma, la memoria ed i processi di apprendimento (Gasic e Holmann, 1992; Lipton e Kater, 1989).

Eccitotossicità del glutammato

In condizioni fisiologiche sistemi di trasporto e vie metaboliche a livello neuronale e gliale assicurano la rimozione del glutammato dallo spazio extracellulare (Schousboe, 1981). In condizioni patologiche un'eccessiva liberazione o la mancata captazione del glutammato ne determinano un significativo incremento delle concentrazioni extracellulari con successivo danno neuronale. Tale processo, descritto per la prima volta da Olney, è stato identificato come *eccitotossicità* (Olney, 1969). L'eccitotossicità (v. NEUROTOSSINE*, *eccitotossine*) ha una parte rilevante nella patogenesi del danneggiamento neuronale a seguito di ischemia/ipossia, ipoglicemia, epilessia, trauma. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di una stretta correlazione tra processi eccitotossici e malattie neurodegenerative quali la corea di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica, il morbo di Alzheimer e la schizofrenia (Choi, 1988; Choi e Rothman, 1990; Lipton e Rosemberg, 1994).

Meccanismi coinvolti nell'eccitotossicità

Modelli sperimentali *in vitro* in colture neuronali, fettine di tessuto cerebrale e retina hanno permesso l'identificazione di alcuni dei meccanismi coinvolti nel processo degenerativo eccitotossico.

Nel processo neurodegenerativo indotto dall'esposizione al glutammato, si possono individuare 2 componenti caratterizzate da una diversa evoluzione temporale e dipendenza ionica (Choi, 1987).

La prima componente, reversibile e rapida (pochi min) è accompagnata da un massivo influxo dello ione Na^+ seguito da uno squilibrio osmotico dovuto all'ingresso di ioni Cl^- e di acqua nel citoplasma, con conseguente rigonfiamento cellulare (Rothman, 1985).

La seconda componente, invece, irreversibile e lenta nel suo sviluppo (12-24 h), coinvolge l'influxo di ioni calcio e determina una generalizzata morte neuronale (Choi, 1985).

Farmacologia dei recettori del glutammato

La risposta eccitatoria al glutammato è mediata dall'interazione con differenti recettori (v.; v.*): il recettore per l'N-metil-D-aspartato (NMDA), il recettore per il kainato ed il recettore per l'ac. α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico (AMPA) (Watkins e Olverman, 1987), definiti *recettori ionotropici* in quanto associati a canali ionici (v.**); e i *recettori metabotropici* la cui stimolazione è legata all'attivazione di secondi messaggeri intracitoplasmatici in seguito all'idrolisi del GMP ciclico (Nicoletti et al., 1996; Sladeczek et al., 1985; Nakanishi, 1994).

Recettori per l'NMDA

I recettori per l'NMDA sono associati a canali permeabili ai cationi, in special modo al calcio (McDermoth et al., 1986). Come indicato nella tab. I il recettore per l'NMDA si compone, inoltre, di differenti siti ad azione modulatoria che rappresentano possibili bersagli terapeutici.

Il complesso per il recettore NMDA è composto da un sito di legame ad alta affinità per il glutammato, un sito modulatorio attivato dalla glicina e siti connessi con il canale ionico, su ognuno dei quali possono agire composti sia ad azione agonista che antagonista (Choi, 1990). Molto importante dal punto di vista fisiologico è lo ione *magnesio* che, in condizioni di riposo, esercita un blocco sul canale ionico associato con l'NMDA. Tale blocco viene rimosso in seguito alla depolarizzazione della membrana indotta dall'NMDA (Mayer et al., 1984).

TAB. I. FARMACOLOGIA DEL RECETTORE NMDA

Sito	Agonista	Antagonista
Glutammato	Glutammato Aspartato Omocisteato NMDA Quinolinato	AP5, AP7 CGS19755 D-CPP
Glicina	Glicina	5,7 Cl chinurenato
Canale ionico		Magnesio, cobalto
Fenciclidina		Destrofanano Destrometorfano Chetamina Dizocilpina (MK-801)
Poliamine	Spermina Spermidina	Ifenprodil Eliprodil
Redox	Ditiotreitolo Glutazione	DTNB
H ⁺		H ⁺
Zinco		Zinco
Fosforilazione	Tirosina chinasi	Protein fosfatasi

Gli antagonisti possono essere classificati come competitivi e non. Composti ad azione competitiva, quali il D-APV (ac. 2-amino-fosfovalerianico) o l'APH (ac. 2-amino 7-fosfo-eptonico), agiscono in maniera inibitoria direttamente sul sito ad alta affinità per il glutammato. Altresì il legame della glicina sul proprio sito o della D-serina è determinante per l'attivazione del recettore NMDA. Sostanze in grado di bloccare tale interazione, quali l'ac. 7-ciclochinurenico, CI HA-966, la ciclo-leucina, l'ac. 2-carbossi-indolico o vari sali dell'ac. chinolinico, hanno infatti un'azione di inibizione sul recettore NMDA. La maggior parte dei composti non competitivi ad azione antagonista agisce sul sito della fenciclidina (v.*) (PCP). Fra tali sostanze si annoverano la chetamina (v.), il destrorfano, il destrometorfano e la dizocilpina (MK-801 [v.*] Wong *et al.*, 1988). Il blocco prodotto dal MK-801 è uso- e voltaggio-dipendente (Huetner e Bean, 1988).

Gli antagonisti competitivi sul sito delle poliamine (spermina e spermidina), come l'eliprodil, sembrano essere potenzialmente interessanti in una prospettiva terapeutica. Questi farmaci riducono l'area ischemica in modelli animali sperimentali e sono sprovvisti di azione psicomimetica, che rappresenta uno dei più indesiderati effetti collaterali di antagonisti quali l'MK-801.

Il recettore NMDA può essere regolato, inoltre, dallo ione zinco, dalle variazioni del pH, dalla produzione di radicali liberi, che modulano il sito redox, e dai processi di fosforilazione (Collingridge e Lester, 1989; Choi, 1990).

Recettori AMPA/kainato

La maggior parte dei recettori AMPA/kainato è associata a canali ad alta permeabilità per lo ione sodio e a bassa permeabilità per il calcio. L'influsso di calcio, dunque, che si realizza attraverso la stimolazione di tali recettori dipende dalla secondaria attivazione dei canali del calcio voltaggio-sensibili (VSCC) o dall'azione in «reverse mode» dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Choi, 1988).

Recentemente, tuttavia, sono stati identificati recettori AMPA/kainato ad alta permeabilità per il calcio. Tali recettori posseggono una peculiare struttura molecolare caratterizzata dalla mancata espressione della subunità GLUR 2/GLUR-B (Burnashev *et al.*, 1992; Hume *et al.*, 1991; Iino *et al.*, 1990). La presenza di tali recettori in neuroni corticali, ippocampali e Purkinje-cerebellari o, sperimentalmente, la diretta transfezione in linee cellulari di recettori AMPA/kainato privi della subunità GLUR 2/GLUR-B conferisce una peculiare suscettibilità all'azione neurotossica dell'AMPA o del kainato (Brorson *et al.*, 1994).

Gli antagonisti del recettore AMPA/kainato si dividono in due grosse categorie: competitivi ed allosterici. Tra i competitivi i derivati dai sali quinoxalici, come l'ac. 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-dione (CNQX) e il suo derivato tricyclico, 2,3-diidrossi-6-nitro-7-sulfamoi-benzo(F)-quinoxalina (NBQX), sono estremamente efficaci (Sheardown *et al.*, 1990).

Tra gli antagonisti non competitivi una categoria molto promettente è poi quella delle 2,3-benzodiazepine ed in particolare del composto GYKY 52466. Il probabile meccanismo di azione di tali composti è la desensibilizzazione del recettore AMPA/kainato che diventa incapace di risposta all'agonista, agendo in maniera opposta alle benzotiazidi, come la ciclotiazide, che produce un potenziamento della risposta (Yamada e Tang, 1993).

Recettori metabotropici

Studi di biologia molecolare e farmacologici hanno portato all'individuazione di almeno 8 differenti sottotipi di recettori metabotropici, classificabili in base alla sequenza mo-

lecolare ed al meccanismo di azione in tre maggiori famiglie: mGLUR-1 e mGLUR-5, legati all'idrolisi del fosfoinositolo; mGLUR-2 e mGLUR-3, che modulano negativamente la produzione di AMP-ciclico, ed infine mGLUR-4, mGLUR-6, mGLUR-7 e mGLUR-8, che pure inibiscono la produzione di AMP-ciclico, ma sono attivati da differenti agonisti rispetto alla seconda categoria (Pin e Duvoisin, 1995; Nakanishi, 1994).

Tutti i differenti sottotipi di recettori metabotropici sono legati alla trasduzione mediata dalle proteine G (v.**). In colture di neuroni corticali il trattamento con agonisti selettivi per i recettori mGLUR-2 e 3, quali il DCG-IV o il 4C3 HPG, ha mostrato un effetto protettivo contro dosi neurotossiche di NMDA, mentre la stimolazione delle subunità mGLUR-1 e 5 sortiva l'effetto opposto (Bruno *et al.*, 1994; Buisson e Choi, 1995).

Stadi della morte neuronale indotta dalla stimolazione dei recettori per il glutammato

Nell'estrinsecarsi dei meccanismi cellulari di morte neuronale a seguito di sovrastimolazione dei recettori glutammatergici un'utile schematizzazione identifica 3 fasi: induzione, amplificazione ed espressione.

Induzione

Questa fase consiste nella sovrastimolazione dei recettori glutammatergici con le immediate modificazioni del *milieu* intracellulare ad essa conseguente. Come sopra descritto, le differenti sottoclassi recettoriali mediano differenti alterazioni dell'omeostasi ionica intracitosolica ed un differente profilo temporale nei processi di morte neuronale. I recettori NMDA evocano un diretto e massivo influsso di calcio, mentre sono meno implicati nelle fasi precoci di rigonfiamento neuronale. Queste ultime, maggiormente connesse alla sovrastimolazione dei recettori per l'AMPA/kainato, sono solo indirettamente correlate ad un influsso di calcio attraverso l'apertura dei canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. Evidenze sperimentali *in vitro* confermano tale processo. In colture di neuroni corticali murini è stato dimostrato, infatti, come la stimolazione dei recettori NMDA per un breve periodo (5 min) determina la pressoché completa morte neuronale nelle 24 h successive. Al contrario, 5 min di stimolazione dei recettori AMPA/kainato producono, invece, solo una reversibile fase di rigonfiamento cellulare, mentre per un irreversibile danneggiamento è necessaria una stimolazione protratta di 24 h.

Amplificazione

Questa fase è caratterizzata dalla cascata di eventi successiva alla sovrastimolazione recettoriale. Un ruolo chiave sembra essere svolto dall'ulteriore incremento del Ca^{2+} intracellulare, attraverso a) la protratta attivazione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, b) la reversione del fisiologico *modus operandi* dello scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, c) un passivo flusso di Ca^{2+} per il fisico stiramento della membrana neuronale a seguito delle variazioni del volume cellulare ed, infine, d) la mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracitoplasmatici.

Espressione

Tale fase è caratterizzata dalla promozione Ca^{2+} -dipendente di una serie di fenomeni, come l'attivazione di enzimi catabolici, quali le proteasi. L'attivazione di proteasi, quali le calpaine (v. *6139), provoca la degradazione dei neurofilamenti con conseguente alterazione del citoscheletro (v.***) e successivo danneggiamento del bidirezionale flusso neuroumorale di informazioni soma/processi (Siman *et al.*, 1989).

TAB. II. STRATEGIE PER LA RIDUZIONE DEL DETERIORAMENTO NEURONALE IN SEGUITO AD INSULTI ISCHEMICI/POSSIBILI IN VIVO DOVUTI ALLA LIBERAZIONE DI GLUTAMMATO

Approccio	Scopo
Blocco dei VSCC presinaptici	Riduzione della liberazione di glutammato
Blocco dei recettori NMDA	Riduzione dell'influsso di Ca^{2+}
Blocco dei recettori AMPA	Riduzione dell'influsso di Na^+ e quindi di Ca^{2+}
Blocco dei canali del Na^+	Riduzione dell'influsso di Ca^{2+} Na^+ dipendente
Blocco dei VSCC postsinaptici	Riduzione dell'influsso di Ca^{2+} postsinaptico
Uso di chelanti del Ca^{2+}	Riduzione del Ca^{2+} intracellulare
Blocco dei radicali liberi	Riduzione della generazione di radicali tossici
Inibizione delle calpaine	Riduzione della degradazione delle proteine del citoscheletro
Inibizione della sintesi dell'ossido nitrico	Riduzione della produzione di NO e $\cdot OH$

L'eccessivo accumulo di calcio può scatenare la produzione di radicali liberi (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]) attraverso specifici meccanismi (Siesjö, 1989) come:

- a) l'attivazione delle fosfolipasi con produzione di ac. arachidonico;
- b) la conversione della xantina deidrogenasi a xantina ossidasi, una ricca fonte di radicali liberi;
- c) l'attivazione dell'enzima nitrico ossidasi con produzione di una cospicua quantità di ossido nitrico (v. MONOSSIDO DI AZOTO**) e superossido che reagendo con i metalli di transizione provocano la liberazione di composti ossidanti reattivi.

Questi composti vengono prodotti e nel citoplasma e nei mitocondri. Recenti evidenze sperimentali *in vitro* hanno dimostrato un ruolo determinante e specifico di tali organelli nello sviluppo della neurotossicità legata alla selettiva stimolazione dei recettori NMDA (Dugan *et al.*, 1995).

Considerazioni conclusive

L'immensa mole di studi dell'ultimo decennio sulla patogenesi dei meccanismi di morte neuronale indica come la liberazione di aminoacidi eccitatori e la sovrastimolazione dei recettori glutammatergici, con le conseguenti variazioni dell'ambiente intracellulare, condizionino fasi fondamentali nell'estrinsecarsi di tale fenomeno, sia a seguito di eventi acuti come nell'insulto ischemico sia nel lento dispiegarsi di processi neurodegenerativi (morbo di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica, morbo di Alzheimer). Si profilano, quindi, a tutt'oggi tre principali aree di intervento terapeutico:

- a) inibizione della liberazione degli aminoacidi eccitatori o l'immediato blocco dell'agonista sui recettori;
- b) inibizione delle fasi precoci ed intermedie legate soprattutto alle variazioni dell'ambiente ionico intracellulare;
- c) inibizione della terza fase del processo neurodegenerativo:

la fase di espressione, legata probabilmente all'espressione di geni che mediano la produzione di proteine catalizzanti reazioni enzimatiche che, attivate, porterebbero alla realizzazione di un vero e proprio programma di morte cellulare.

Nella tab. II sono sintetizzate alcune delle strategie che hanno mostrato positivi effetti neuroprotettivi *in vivo* (Choi, 1995).

Il calcio sembra svolgere un ruolo prioritario nella cascata di eventi che inducono la morte neuronale. Esso, pertanto, rappresenta un cruciale bersaglio, aggredibile sul piano terapeutico, sia attraverso farmaci in grado di inibire l'influsso mediato dai VSCC o dai recettori del glutammato sia attraverso composti che agiscono su fenomeni Ca^{2+} -dipendenti, come la formazione di radicali liberi, l'attivazione di enzimi proteolitici e la formazione di ossido nitrico.

V. anche: CANALI IONICI*; GLUTAMMICO ACIDO, VII, 487; MEDIATORI CHIMICI (v.; v.*); NEUROTOSSINE*, eccitotossine; NEUOTRASMETTITORI*; RECETTORI (v.; v.*; v.**).

Bibliografia

- Brorson J. R., Manziolillo P. A., Miller R. J., *J. Neurosci.*, 1994, **14**, 187.
 Bruno V., Copani A., Battaglia G. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, **256**, 109.
 Buisson A., Choi D. W., *Neuropharmacol.*, 1995, **34**, 1081.
 Burnashev N., Monyer H., Seeburg P. H., Sakmann B., *Neuron*, 1992, **8**, 189.
 Choi D. W., *Neurosci. Lett.*, 1985, **58**, 293.
 Choi D. W., *J. Neurosci.*, 1987, **7**, 369.
 Choi D. W., *Neuron*, 1988, **1**, 623.
 Choi D. W., *Trends Neurosci.*, 1988, **11**, 465.
 Choi D. W., *Trends Neurosci.*, 1995, **18**, 58.
 Choi D. W., *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1990, **2**, 105.
 Choi D. W., Rothman S. A., *Ann. Rev. Neurosci.*, 1990, **13**, 171.
 Collingridge G. L., Lester R. A., *Pharmacol. Rev.*, 1989, **40**, 143.
 Dugan L. L., Sensi S. L., Canzoniero L. M. T. *et al.*, *J. Neurosci.*, 1995, **15**, 6377.
 Gasic G. P., Holmann M., *Ann. Rev. Physiol.*, 1992, **54**, 507.
 Huettnner J. E., Bean B. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 1307.
 Hume R. I., Dingledine R., Heinemann S. F., *Science*, 1991, **253**, 1028-1031.
 Iino M., Ozawa S., Tsuzuki K., *J. Physiol. (London)*, 1990, **424**, 151.
 Lipton S. A., Kater S. B., *Trends Neurosci.*, 1989, **12**, 265.
 Lipton S. A., Rosenberg A., *New Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 613.
 Mac Dermott A. B., Mayer M. L., Westbrook G. L., *et al.*, *Nature*, 1986, **321**, 519.
 Mayer M. L., Miller R. J., *Trend. Pharmacol. Sci.*, 1990, **11**, 254.
 Mayer M. L., Westbrook G. L., Guthrie P. B., *Nature*, 1984, **309**, 261-263.
 Nakanishi S., *Neuron*, 1994, **13**, 1031.
 Nicoletti F., Bruno V., Copani A. *et al.*, *Trends Neurosci.*, 1996, **19** (7), 267.
 Olney J. W., *Science*, 1969, **164**, 719.
 Pellegrini-Giampietro D. E., Zukin R. S., Bennet M. V. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89**, 10499.
 Pin J. P., Duvoisin R., *Neuropharmacology*, 1995, **34**, 1.
 Rothman S. A., *J. Neurosci.*, 1985, **5**, 1483.
 Schousboe A., *Int. Rev. Neurobiol.*, 1981, **22**, 1.
 Sheardown M. J., Nielsen E. O., Hansen A. J., *et al.*, *Science*, 1990, **247**, 571.
 Siesjö B. K., *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1989, **1**, 165.
 Siman R., Noszek J. C., Kegerise C. J., *J. Neurosci.*, 1989, **9**, 1579.
 Sladeczek F., Pin J. P., Recasens M., *et al.*, *Nature*, 1985, **317**, 717.
 Watkins J. C., Olverman H. J., *Trends Neurosci.*, 1987, **10**, 265.
 Westbrook G. L., Mayer M. L., *Nature*, 1987, **328**, 640.
 Wong E. H., Kemp J. A., Priestley T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 1307.
 Yamada K. A., Tang C. M., *J. Neurosci.*, 1993, **13**, 3904.

DENNIS W. CHOI,
 LORELLA M. T. CANZONIERO E STEFANO L. SENSI

GLUTAMMICO ACIDO DECARBOSSILASI

1. glutamic acid decarboxylase.

L'enzima glutammico acido decarbossilasi (GAD) o glutammico decarbossilasi (L-glutammico-1-carbossil-liasi) ca-

talizza la decarbossilazione dell'ac. glutammico ad ac. γ -aminobutirrico (GABA), con l'intervento del piridossalfosfato come coenzima.

Il ruolo della GAD assume particolare rilievo nel S.N.C. per la nota funzione di neurotrasmettitore svolta dal GABA (v. GAMMA-AMINOBUTIRICO ACIDO [v.; v.*]). Si riscontra nel S.N.C. un comportamento parallelo tra la distribuzione della GAD e quella del GABA, anche a livello subcellulare, essendo l'enzima e il suo prodotto di sintesi selettivamente concentrati nelle sinapsi GABAergiche.

Negli ultimi anni l'interesse per questo enzima si è ancor più accresciuto in relazione a recenti osservazioni che assegnano alla GAD un importante ruolo nella patogenesi di alcune malattie per le quali si riconosce o si suggerisce un meccanismo autoimmune. In particolare, per quanto riguarda il *diabete mellito insulino dipendente* (IDDM), nello studio dei processi di autoimmunità anti-insula pancreatica è stata identificata tra vari autoantigeni anche la GAD. In soggetti affetti da questo tipo di diabete è stata, anzi, segnalata la presenza di anticorpi diretti contro due diversi isoenzimi, GAD65 e GAD67, anche se appare oramai accertato che il vero autoantigene insulare è la GAD65 (v. DIABETE MELLITO**, *etiopatogenesi del diabete mellito di tipo I* [IDDM]). Altro caso è quello della *sindrome dell'uomo rigido*, nella quale in un certo numero di pazienti sono stati riscontrati autoanticorpi anti-neuroni GABAergici che riconoscono come antigene la GAD (v. UOMO RIGIDO, SINDROME DELL'*, coll. *7449-7453).

V. anche: GLUTAMMICO ACIDO.

RED.

GONADORELINA (LHRH; GnRH), ANALOGHI DELLA

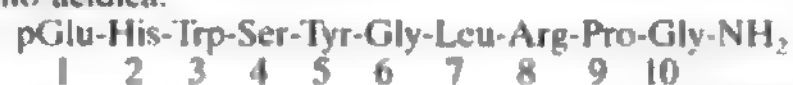
SOMMARIO

Introduzione (col. 2535). - **Struttura degli analoghi dell'LHRH e loro meccanismo d'azione** (col. 2536). - **Studi sperimentali sull'azione degli analoghi dell'LHRH** (col. 2537). - **Applicazioni cliniche degli analoghi dell'LHRH** (col. 2538): *Cancro della prostata*. - *Pubertà precoce*. - *Cancro della mammella*. - *Contraccezione*. - *Altre indicazioni all'uso degli analoghi della gonadorelina*.

Introduzione

L'isolamento e l'identificazione della struttura dell'LHRH (o GnRH) porcino da parte di Schally e collaboratori (1971) ha dato la possibilità, modificando alcuni aminoacidi, di sintetizzare molecole analoghe, con azione più potente e in grado di interferire con l'azione dell'LHRH naturale.

L'LHRH è un decapeptide, con la seguente struttura amino acidica:



Analogamente ad altri neuropeptidi, viene sintetizzato come parte di una molecola più grande (pro-ormone), dalla quale viene scisso e modificato nei granuli secretori. La sua secrezione pulsatile, con ritmo di 60-120 min, regola la sintesi e la liberazione di entrambe le gonadotropine (FSH e LH). L'LHRH si lega a recettori specifici delle cellule gonadotrope, dando inizio ai processi di aumento della concentrazione del calcio intracellulare, idrolisi dell'inositolo-P, fosforilazione della proteinchinasi C e quindi avvio della sintesi delle gonadotropine. L'ambiente ormonale (estrogeni, androgeni, inibina), che determina il numero di recettori e la diversa risposta delle cellule gonadotrope all'LHRH, è il fattore che modula il variabile rapporto secreto di FSH e LH (v. anche, GONADOTROPI ORMONI, VII, 559;

*3427; IPOFISI, VIII, 331; *4087; IPOTALAMICI FATTORI, VIII, 439; *4163).

Struttura degli analoghi dell'LHRH e loro meccanismo d'azione

Gli studi sulla struttura dell'LHRH naturale ed i rapporti con l'attività biologica hanno permesso di identificare il ruolo dei vari aminoacidi costituenti:

- l'aminoacido in posizione 1 e quelli dalla posizione 4 alla 10 sono implicati nel legame con il recettore;
- gli aminoacidi 2 e 3 sono responsabili dell'attività biologica;
- gli aminoacidi 6 e 10 sono importanti per la conformazione sterica.

Al fine di rendere meglio utilizzabile l'LHRH a scopo terapeutico, si cercò di ottenere degli analoghi con una azione biologica più potente e più prolungata nel tempo (analoghi agonisti dell'LHRH). Il primo prodotto ottenuto, da Fujino *et al.* nel 1972, sostituendo la glicinamide C-terminale con delle alchil-ammine (nel caso particolare con l'etil-amide), si dimostrò più attivo dell'LHRH. Anche la sostituzione della glicina in posizione 6 con un D-aminoacido (Monahan *et al.*, 1974) indusse un aumento dell'attività biologica, la quale risultò ulteriormente esaltata dalla combinazione delle due modifiche (Coy *et al.*, 1974). Fin dall'inizio si prospettò la possibilità di sintetizzare analoghi con azione antagonista dell'LHRH naturale. Il primo antagonista (des-His¹-LHRH, Vale *et al.*, 1972) aveva una debole attività inibitoria. Inibitori più potenti furono ottenuti sostituendo la glicina in posizione 6 con la D-alanina, oppure sostituendo la istidina con la D-fenilalanina, o anche operando sostituzioni del triptofano in posizione 3; la maggiore attività antagonista è stata raggiunta sommando le sostituzioni in posizione 1,2,3 e 6 oppure 1,2,3,6 e 10 o ancora 1,2,3,6,7 e 10. Da allora sono stati sintetizzati oltre duemila analoghi, fra agonisti e antagonisti, alcuni dei quali hanno ampio utilizzo nella pratica clinica (tab. I).

L'aumento dell'attività biologica degli analoghi agonisti dell'LHRH viene riferito ad una loro maggiore capacità di legame alla cellula gonadotropa e alla resistenza alla inattivazione. Sia nell'ipotalamo che nell'antero-ipofisi sono presenti endopeptidasi che scindono l'LHRH a livello degli aminoacidi in posizione 6-7 e 9-10; la sostituzione con D-aminoacidi e con etil-amide rispettivamente in posizione

TAB. I. ESEMPLIFICAZIONE DI ALCUNI ANALOGHI DI GONADORELINA DI PIÙ COMUNE USO CLINICO

(da Furr B. J. A. e Woodburn J. R., 1988, modificata)

Struttura abbreviata	Nome comune o registrato
LHRH (o GnRH)	Gonadorelina
D-Ser(Bu) ¹ AzaGly ¹⁰ -LHRH	Zoladex*
D-Ser(Bu) ¹ desGly ¹⁰ Pro ⁹ NEt-LHRH	Buserelin*
D-Leu ⁶ desGly ¹⁰ Pro ⁹ NEt-LHRH	leuprolide
D-Trp ⁶ -LHRH	decapeptyl
D-Nal(2) ⁶ -LHRH	nafarelin
D-Trp ⁶ NMeLeu ⁷ desGly ¹⁰ Pro ⁹ NEt-LHRH	lutrelin

6 e 10 non permette l'azione delle peptidasi; la resistenza alla degradazione è parallela all'aumento dell'attività biologica. L'aumentata attività biologica è ugualmente correlata con la maggiore affinità recettoriale. Ma dopo una iniziale fase di stimolazione, l'ulteriore prolungata somministrazione di agonisti dell'LHRH blocca la funzione gonadotropica: i meccanismi evocati sono diversi, quali la *down-regulation* recettoriale (v. RECETTORI, XIII, 194-195; *6326) e la desensibilizzazione post-recettoriale dovuta al non avvio dei meccanismi che mediano il metabolismo fosfolipidico, l'attivazione e la redistribuzione della proteina chinasi C, la mobilitazione del calcio e la deplezione del «pool» delle gonadotropine. Un'altra azione degli analoghi agonisti, quando usati cronicamente, è quella di indurre la sintesi di forme di LH con ridotta attività biologica, con conseguente effetto di non stimolazione delle gonadi.

Gli analoghi agonisti dell'LHRH raggiungono la soppressione della funzione gonadotropica dopo una stimolazione transitoria dell'asse ipofisi-gonadi; questo effetto potrebbe essere non desiderato nel trattamento, ad es., di tumori ormono-dipendenti, in quanto determina, nella fase di stimolazione, una riacutizzazione del processo. Anche gli agonisti più efficaci e le preparazioni a lento rilascio più avanzate hanno una latenza di azione, prima di raggiungere la soppressione ipofisaria, che varia da alcuni giorni ad alcune settimane.

Il meccanismo d'azione degli analoghi *antagonisti* è il legame, a lungo permanente, con i recettori dell'LHRH, con il vantaggio di inibire la secrezione di gonadotropine fin dall'inizio della somministrazione. L'uso clinico dei primi antagonisti sintetizzati è stato limitato dalla comparsa di reazioni anafilattoidi accompagnate da edema del volto e delle estremità; problema in parte superato dagli antagonisti di seconda e terza generazione. Le nuove formulazioni di antagonisti dell'LHRH, ottenute mediante sostituzione con D-ureldoalchil-aminoacidi o altre modificazioni, sono in fase di sperimentazione.

Studi sperimentali sull'azione degli analoghi dell'LHRH

Nel ratto maschio sono presenti recettori per l'LHRH non solo a livello ipofisario, ma anche testicolare, questi ultimi mediatori dell'attività di fattori LHRH-simili prodotti dalle cellule del Sertoli ed implicati, molto verosimilmente, nel controllo paracrino della steroidogenesi. L'azione degli analoghi si esplica quindi a livello ipofisario e gonadico. Nei *ratti maschi prepuberi* il trattamento cronico con agonisti inibisce la crescita e lo sviluppo dei testicoli, delle vescichette seminali, del lobo ventrale della prostata e del muscolo elevatore dell'ano; gli effetti sono reversibili alcune settimane dopo la sospensione del trattamento. Nei *ratti maschi adulti* la somministrazione cronica di agonisti determina la caduta di secrezione di testosterone ed il concomitante aumento di progesterone e 5 α -pregnandione, come da blocco dell'attività enzimatica della 17,20-desmolasi e della 17 α -idrossilasi. Al blocco della steroidogenesi si accompagna la riduzione di volume dei testicoli, delle vescichette seminali, della prostata ventrale e la distruzione della morfologia tubulare con soppressione della spermatogenesi. Nel *ratto femmina prepubere* la somministrazione cronica dei più potenti agonisti inibisce la crescita e la maturazione delle gonadi, la crescita dell'utero e la comparsa dei cicli; nell'*animale maturo* interrompe la funzione ovarica e la regolare ciclicità. La somministrazione dell'analogo agonista, protratta a lungo, porta anche nel ratto femmina adulto all'involutione delle gonadi e dell'utero fino a dimensioni paragonabili allo stato prepubere.

Nei *primati di sesso femminile* (Babbuini, *Macacus rhesus*), il trattamento cronico con un potente agonista dell'LHRH inibisce l'ovulazione nella maggior parte, ma non nella totalità, dei casi trattati, mentre la somministrazione in fase follicolare o pre-ovulatoria ritarda ma non inibisce l'ovulazione. Nei *primati di sesso maschile*, la somministrazione cronica inibisce completamente la spermatogenesi, determina riduzione del volume testicolare e interrompe l'attività sessuale. Il recupero dell'attività gonadica si verifica dopo parecchie settimane dall'interruzione del trattamento. Nei primati è stata osservata una certa resistenza agli agonisti dell'LHRH, la cui azione si esplica solo a livello dei recettori ipofisari, senza un effetto diretto sulle gonadi.

Per quanto riguarda gli studi condotti con analoghi antagonisti dell'LHRH, la loro somministrazione nel ratto femmina adulto determina la soppressione dei picchi secretivi di FSH e LH del proestro e il blocco dell'ovulazione spontanea. Con gli antagonisti più potenti, come quelli ottenuti con tre o quattro sostituzioni, si ottiene, sempre nell'animale da esperimento, l'inibizione completa dell'ovulazione e, con la somministrazione durante la gravidanza, l'arresto dello sviluppo del feto. Nei *primati* gli effetti ottenibili con gli antagonisti sono meno marcati, determinando, solo in una parte dei casi trattati, il blocco dell'ovulazione; la soppressione della secrezione di gonadotropine risulta comunque ridotta, ma non inibita completamente.

Applicazioni cliniche degli analoghi dell'LHRH

La disponibilità di sostanze in grado di inibire, in maniera comunque reversibile, la funzione gonadotropica e gonadica, come dimostrato nell'animale da esperimento, ha aperto il campo al loro uso nelle patologie umane ove si ritiene necessario, a scopo terapeutico, sopprimere tale funzione. Le indicazioni principali all'uso degli analoghi agonisti dell'LHRH nella pratica clinica sono il cancro della prostata e la pubertà precoce. Di seguito viene comunque discussa anche l'utilizzazione in altre patologie o condizioni particolari, non di uso corrente.

Cancro della prostata

Numerosi studi sul cancro avanzato della prostata hanno dimostrato l'efficacia della castrazione farmacologica al pari della castrazione chirurgica. Studi su ratti, nei quali erano stati indotti tumori della prostata e che venivano trattati con potenti agonisti, hanno confermato la riduzione di volume del tumore, come conseguenza dell'inibizione della secrezione di FSH, LH e testosterone. Negli studi clinici sono state utilizzate formulazioni di agonisti di LHRH sottoforma di spray nasale, di preparati da iniettare sottocute e di preparati deposito a lento rilascio, da iniettare intramuscolo. In tutti gli studi, nei primi giorni di trattamento, si è verificata in una trascurabile parte dei casi trattati la stimolazione della funzione gonadotropica con conseguente transitorio aumento del testosterone, accompagnato talvolta dalla recrudescenza della malattia. Il proseguimento del trattamento, con la soppressione delle gonadotropine e del testosterone, ha portato in circa il 50% alla remissione della malattia e nel 30-40% alla sua stabilizzazione. La documentazione clinica dell'effetto benefico dell'agonista è data dalla riduzione o dalla scomparsa del dolore osseo, dalla riduzione del valore delle fosfatasi acida ed alcalina e dalla remissione delle metastasi. È stato anche proposto di associare al trattamento con agonisti dell'LHRH un antian-drogeno (v. *595), soprattutto nella fase iniziale, quando si verifica il transitorio effetto stimolatorio. Tuttavia non ci

GONADORELINA (LHRH; GnRH)

sono ancora studi adeguati che dimostrino che l'associazione dei due farmaci realmente migliori la percentuale di remissione e le prospettive di vita rispetto alla castrazione chirurgica o al monotrattamento.

Anche l'*ipertrofia prostatica benigna* risponde positivamente alla somministrazione cronica degli agonisti LH-RH; tuttavia entro sei mesi dalla sospensione del trattamento il volume prostatico ritorna alle dimensioni di partenza. In questa patologia il beneficio della terapia è comunque associato all'ipogonadismo e alla perdita della libido; ne consegue che per questi effetti indesiderati il trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna con agonisti dell'LHRH non costituisce una prima scelta, quanto piuttosto un ripiego con indicazioni particolari, come può verificarsi per uomini molto anziani, nei quali non sono proponibili altre scelte terapeutiche.

Di questi ultimi anni sono gli studi con cetrorelix, un potente analogo antagonista dell'LHRH, che ha dato buoni risultati nella soppressione di LH e testosterone in uomini giovani e sani, nel trattamento prolungato della iperplasia prostatica benigna e come coadiuvante nel trattamento del cancro della prostata.

V. anche PROSTATA*, coll. *6122-6133.

Pubertà precoce

Il trattamento della pubertà precoce centrale, idiopatica, con analoghi agonisti dell'LHRH permette di ottenere l'arresto della secrezione di gonadotropine e degli steroidi gonadici (estradiolo o testosterone), le cui concentrazioni plasmatiche ritornano a livelli pre-puberi con conseguente arresto dello sviluppo puberale. Nelle bambine, ove si fosse già manifestato il menarca, segue l'arresto dei cicli mestruali. Contemporaneamente viene rallentata la velocità di crescita e la maturazione ossea, accelerate dall'evento puberale. Da una recente rassegna della letteratura (Kletter e Kelch, 1994) risulta che il trattamento della pubertà precoce idiopatica con agonisti dell'LHRH in bambine, di età superiore ai 6 anni, non altera in maniera significativa l'altezza adulta finale, mentre addirittura la migliora qualora la diagnosi sia stata posta in età antecedente. Alla sospensione del trattamento, la funzione gonadotropica e quindi lo sviluppo puberale riprendono entro poche settimane.

La pubertà precoce vera viene anche trattata con una formulazione di LHRH, sottoforma di spray nasale, con ripetute somministrazioni giornaliere, che permettono di arrestare la secrezione gonadotropica endogena per saturazione dei recettori. Lo spray nasale è ben accettato dai bambini, ma la variabilità di assorbimento ed il quantitativo notevole di farmaco richiesto ne rendono l'uso meno attendibile rispetto agli analoghi.

V. anche PUBERTÀ, XII, 2012; PUBERTÀ*, col. *6231.

Cancro della mammella

Il cancro della mammella, con recettori positivi per gli estrogeni, si giova del trattamento con gli agonisti dell'LHRH, con risultati paragonabili alla castrazione chirurgica o radiologica. L'associazione con il tamoxifene (v. XIV, 1836; v. MAMMELLA*, col. *4836) è possibile per la complementarietà dei due farmaci: il tamoxifene blocca i recettori per gli estrogeni anche a livello del SNC e dell'ipofisi, con conseguente stimolazione dell'LHRH endogeno, che l'analogo agonista viene a sua volta ad inibire; del resto il tamoxifene protegge verso l'iniziale stimolazione dell'agonista. Dai lavori sull'uso dell'antagonista cetrorelix sul tumore della mammella, emergono delle potenzialità cliniche, sostenute anche dall'evidenza che per il cancro della mammella gli antagonisti dell'LHRH possono inibire direttamente la proliferazione di certe linee di cellule cancerogene.

L'uso degli analoghi dell'LHRH nel cancro della mammella è limitato, a parità di risultati, dall'elevato costo rispetto alla castrazione chirurgica o radiologica.

Contraccezione

La capacità degli agonisti dell'LHRH di bloccare la secrezione di gonadotropine e la funzione gonadica è stata utilizzata anche a scopo contraccettivo, sia nella donna che nell'uomo, senza tuttavia ottenere il successo desiderato.

La donna risponde al trattamento in maniera variabile; in alcuni casi viene raggiunta l'amenorrea, mentre in altri solo oligomenorrea o addirittura permangono dei cicli regolari. Allo scopo di prevenire i disturbi legati al deficit di estrogeni, è stata saggiata anche l'associazione dell'analogo agonista, somministrato nella prima parte del ciclo, con un progestinico. Nella pratica clinica, tuttavia, la contraccezione estroprogestinica rimane la più utilizzata sia per la facilità di somministrazione, che per il basso costo, mentre la contraccezione con agonisti dell'LHRH è stata prospettata in casi limitati, ove vi fosse una controindicazione agli estroprogestinici e nel periodo *post partum*, come rafforzamento dell'azione contraccettiva della iperprolattinemia fisiologica.

Nell'uomo gli agonisti LHRH sopprimono la spermatogenesi e la steroidogenesi, con conseguente oligozoospermia, riduzione della libido e della potenza sessuale. Anche l'antagonista cetrorelix, per l'azione di soppressione della secrezione di gonadotropine e testosterone, è potenzialmente utilizzabile per la contraccezione maschile. L'utilizzo degli analoghi nella contraccezione maschile è quindi limitato dalla necessità di una terapia suppletiva con testosterone, senza tuttavia raggiungere la sicurezza della contraccezione. È stato anche ipotizzato, ma senza ulteriore conferma da altri studi, che l'ipogonadismo successivo alla somministrazione di analoghi agonisti potesse costituire una condizione di resistenza verso gli effetti citotossici della chemioterapia antitumorale.

V. anche ANTICONCEZIONALI FARMACI*, col. *655.

Altre indicazioni all'uso degli analoghi della gonadorelina

Nella donna, pur con il limite dell'ipoestrogenismo secondario e del ristretto tempo di somministrazione, è possibile la somministrazione di agonisti dell'LHRH in alcune patologie, quali i fibromiomi uterini, l'endometriosi, la sindrome dell'ovaio policistico, le menometrorragie funzionali, la dismenorrea e la sindrome pre-mestruale.

Per quanto riguarda i *fibromiomi uterini*, la cui crescita è estrogeno-dipendente, la limitazione all'uso degli analoghi LHRH è data dalla recidiva della neoplasia con la sospensione del trattamento e dalla impossibilità di protrarre quest'ultimo a lungo, per l'ipogonadismo secondario. La somministrazione degli analoghi agonisti è quindi effettuata solo allo scopo di ottenere la riduzione del fibroma uterino, per facilitare l'intervento chirurgico, oppure nella fase perimenopausale nelle donne ad alto rischio operatorio, sempre al fine di arrestare la crescita del fibroma in attesa della regressione post-menopausale (v. UTERO, XV, 1455).

Anche nell'*endometriosi*, in cui la crescita del tessuto ectopico viene arrestata dall'ipoestrogenismo indotto dagli analoghi agonisti dell'LHRH, l'uso di questi (v. ENDOMETRIOSI*, *2730-2731) è limitato dalla impossibilità di una somministrazione protratta e dall'elevato costo, tanto più che è possibile ottenere effetti paragonabili con altri farmaci (ad es., danazolo). Infatti, la somministrazione dell'analogo agonista porta inizialmente a risultati eclatanti (scomparsa del dolore, riduzione delle dimensioni dei focolai di endometriosi, recupero della fertilità), ma dopo 3-6 mesi di trattamento si presentano i primi segni dell'osteop-

porosi, che induce alla sospensione del trattamento stesso o alla sua associazione con danazolo o progestinici.

L'uso degli analoghi agonisti dell'LHRH nelle *metrorragie, nella dismenorrea e nella sindrome premestruale* è limitato a singoli episodi, quando si voglia ottenere l'amenorrea e la soppressione della funzione ovarica, per attenuare i sintomi di tali disturbi.

Nell'ovaio policistico (v. XI, 503) la somministrazione temporanea degli agonisti dell'LHRH, per l'ipogonadismo che induce, ha effetti paragonabili a quelli dell'intervento di resezione cuneiforme: la steroidogenesi, ed in particolare la secrezione di androgeni, si riduce con conseguente miglioramento dell'acne e dell'irsutismo. Anche in questa patologia, una somministrazione protratta non è effettuabile.

Un utilizzo recente degli agonisti dell'LHRH si ritrova nei programmi di induzione dell'ovulazione nella fecondazione assistita (v. FECONDAZIONE ARTIFICIALE*, coll. *3009-3010; FECONDAZIONE ASSISTITA**, coll. **2189-2191). La loro somministrazione ha lo scopo di sopprimere le gonadotropine endogene della donna: su questa base di ipogonadismo vengono poi somministrate gonadotropine esogene, monitorizzando i tempi di induzione dell'ovulazione. Si ricordano però i rischi dell'induzione dell'ovulazione: la sindrome da iperstimolazione ovarica (v. OVARICA IPERSTIMOLAZIONE, SINDROME DA**) e le gravidanze multifetali (v. GRAVIDANZA**, coll. **2550-2560).

Un nuovo campo di applicazione degli analoghi dell'LHRH, sia agonisti che antagonisti, è nel controllo della crescita di neoplasie (mammella, pancreas, ovaio, ipofisi), che presentano recettori sensibili al farmaco: una prospettiva che attende la verifica sperimentale e clinica.

Bibliografia

- Conn P. M., Crowley W. F., *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 93-103.
Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **57**, 335-340.
Filiconi M., *Drugs*, 1994, **48**, 41-58.
Forti G., *J. Endocrinol. Invest.*, 1988, **11**, 745-754.
Fraser H. M., Baird D. T., *Clinical applications of LHRH analogues*, in *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1987, vol. 1, 43-70.
Fujino M., Kobayashi S., Ohayashi M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **49**, 863-869.
Furr B. J. A., Woodburn J. R., *J. Endocrinol. Invest.*, 1988, **11**, 535-557.
Kletter G. B., Kelch R. P., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, **79**, 331-334.
Monahan M. W., Amoss M. S., Anderson H. A., Vale W., *Biochemistry*, 1973, **12**, 4616-4620.
Nililus S. J., *New approaches to female contraception: LHRH*, in Benagiano G., Diczfalusy E. eds., *Endocrine mechanisms in Fertility regulation*, 1983, Raven Press, New York, pp. 163-193.
Vale W., Grant G., Rivier J. et al., *Science*, 1972, **176**, 933-934.

GABRIELLA ANGELETTI

GRAFFIO DI GATTO, MALATTIA DA [v. LINFORETICULOSI BENIGNA DA INOCULAZIONE, VIII, coll. 2007-2010; v. anche LINFADENTI INFETTIVE DISTRETTUALI SUPERFICIALI*, coll. *4623-4631]

f. maladie des griffes du chat. - i. cat-scratch disease. - t. gutartige Lymphoretikulose. - s. linforeticolosis benigna de inoculación.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2541). - **Epidemiologia** (col. 2542). - **Etiologia** (col. 2542). - **Quadro clinico** (col. 2544). - **Istopatologia e patogenesi** (col. 2545). - **Terapia** (col. 2546).

Introduzione

La malattia da graffio di gatto [M.G.G.], nota in passato come *linforeticolosi benigna da inoculazione* (v.*), è un'af-

fezione che si presenta abitualmente con una linfadenite regionale che compare, il più delle volte, dopo una lesione cutanea primaria determinata dal graffio o dal morso di un gatto. La M.G.G. è causata prevalentemente, se non esclusivamente, da un piccolo bacillo gramnegativo appartenente al genere *Rochalimaea* (v. ROCHALIMAEA GENERE [v.**]), *R. henselae*, ritenuto essere responsabile, tra l'altro, anche dell'angiomatosi bacillare (v. ANGIOMATOSI BACILLARE**).

La M.G.G. fu riconosciuta come entità clinica da R. Debré agli inizi degli anni '30, sebbene le prime descrizioni della malattia da parte dello stesso Autore siano state riportate solo nel 1950. Nel 1945, F. Hanger e H. Rosy, utilizzando il pus aspirato da un linfonodo di un paziente con una adenite suppurativa da M.G.G., prepararono un antigene per un test cutaneo che dava reazioni positive nei soggetti che presentavano la malattia. Dopo le prime segnalazioni, numerosi articoli sull'argomento sono comparsi fino agli inizi degli anni '80. Solo di recente, tuttavia, sono stati pubblicati alcuni studi che hanno permesso di chiarire l'etiologia e l'epidemiologia della M.G.G. (Dolan et al., 1993; Zangwill et al., 1993; Koehler et al., 1994; Bergmans et al., 1995).

Epidemiologia

La M.G.G. ha una distribuzione ubiquitaria e, nelle aree geografiche a clima temperato, ha un andamento stagionale, presentandosi con maggiore frequenza in autunno ed in inverno. La malattia colpisce soggetti immunocompetenti di tutte le età ma, soprattutto, bambini e adolescenti, senza differenze tra i due sessi. Sebbene da vari studi risulti che circa l'80% dei pazienti con M.G.G. abbia un'età inferiore a 21 anni, una recente indagine condotta da Zangwill et al. ha evidenziato che i soggetti adulti affetti dalla malattia rappresentavano il 43% della casistica. Si stima che ogni anno si verifichino negli U.S.A. circa 22.000 casi di M.G.G., con oltre 2.000 soggetti ospedalizzati (Jackson et al., 1993). In Italia la casistica più vasta è stata riportata da Cheli et al. e riguarda soprattutto soggetti in età pediatrica (cfr. capitolo *Malattia da graffio di gatto*, in LINFADENTI INFETTIVE DISTRETTUALI SUPERFICIALI* [Agg. I, coll. *4623-4631]).

In circa il 90% dei pazienti con M.G.G. è possibile rilevare un contatto con gatti e in più del 75% dei casi viene riferito un graffio o un morso di gatto. Abitualmente sono in causa gattini o gatti di età inferiore ad un anno che, peraltro, non presentano alcun segno di malattia; l'agente etiologico, tuttavia, è stato isolato dal sangue di gatti implicati nella trasmissione della malattia (Kordick et al., 1995). Sono stati osservati più casi di malattia tra i componenti della stessa famiglia che possedeva un gatto: quando una simile evenienza si è verificata, i vari soggetti si sono ammalati nell'arco di poche settimane, suggerendo l'ipotesi che l'animale possa trasmettere l'infezione solo per un lasso di tempo limitato.

Probabilmente la modalità di trasmissione è rappresentata dal contatto diretto, dato che la malattia segue in genere un graffio, un morso o una leccata di un gatto. È anche stata suggerita la possibilità che la trasmissione avvenga attraverso la puntura di insetti ematofagi e, in particolare, della pulce del gatto, *Ctenocephalides felis* (Koehler et al., 1994). In rari casi la M.G.G. è dovuta a lesioni cutanee determinate da cani, scimmie o altri animali così come a ferite con spine o a lesioni di continuo della cute imbrattate di terriccio (Fischer, 1995).

Etiologia

Recenti studi sembrano aver risolto le incertezze relative alla etiologia della M.G.G., patologia per la quale, da sem-

pre, le ricerche epidemiologiche avevano fatto sospettare la natura infettiva. Nel corso degli anni sono stati proposti come agenti etiologici della malattia virus, batteri grampositivi, micobatteri, clamidie.

Nel 1983, Wear *et al.* dell'Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) di Washington, esaminando 39 linfonodi asportati ad altrettanti soggetti con M.G.G., identificarono in 34 campioni un piccolo bacillo gramnegativo, dimostrabile con metodiche di impregnazione argentea e, in particolare, con la colorazione di Warthin-Starry. Negli anni successivi altri AA. confermarono queste osservazioni (Kitchell *et al.*, 1985; Cotter *et al.*, 1986) e, inoltre, batteri simili furono riscontrati anche nella cute e nella congiuntiva di alcuni pazienti con M.G.G. (Margileth *et al.*, 1984; Wear *et al.*, 1985). I tentativi di coltivare il bacillo si rivelarono infruttuosi fino al 1988 quando, sempre presso l'AFIP, English *et al.* riuscirono ad isolare e coltivare dai linfonodi di 10 pazienti con M.G.G., sui 19 esaminati, un piccolo bacillo gramnegativo che fu ritenuto responsabile della malattia e denominato, secondo la terminologia anglosassone, *cat scratch disease bacillus* (CSDB). In seguito, per questo agente fu coniato il nome di *Afipia felis*, dalla sigla AFIP dell'Istituto dove erano state condotte le ricerche che avevano portato all'identificazione e all'isolamento del batterio (Brenner *et al.*, 1991) (v. AFIPIA GENERE**).

Negli anni successivi, tuttavia, ulteriori studi hanno ridimensionato il ruolo di *A. felis* come agente etiologico della M.G.G. ed hanno evidenziato che la maggioranza dei casi della malattia sono dovuti ad un bacillo gramnegativo appartenente al genere *Rochalimaea* (v. ROCHALIMAEA GENERE**), *R. henselae*, ritenuto responsabile anche di altre manifestazioni cliniche sia in soggetti immunocompromessi che in ospiti immunocompetenti (v. ANGIOMATOSI BACILLARE**).

A. felis e *R. henselae* appaiono molto simili morfologicamente se colorati con il metodo di Warthin-Starry; i due batteri, tuttavia, sono assegnati a generi diversi nel sottogruppo α -2 della classe dei *Proteobacteria* in base a differenze sostanziali nella grandezza del genoma, per il contenuto totale di basi azotate, per la scarsa correlazione del DNA e per il basso livello di omologia del gene che codifica per l'RNA ribosomiale 16S (Adal *et al.*, 1994).

Nel 1992, Regnery *et al.*, usando un test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca di anticorpi contro *R. henselae*, trovarono che, su 41 pazienti con sospetta M.G.G., 36 (88%) presentavano un titolo significativo di anticorpi per *R. henselae* mentre solo 10 soggetti avevano anticorpi a basso titolo per *A. felis*. Utilizzando lo stesso test su 45 pazienti, Zangwill *et al.* (1993) ottennero risultati analoghi e dimostrarono anche una maggiore prevalenza di anticorpi contro *R. henselae* nei gatti a contatto con i soggetti con M.G.G. rispetto ai gatti appartenenti al gruppo di controllo. Inoltre, con la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), è stato dimostrato che l'antigene utilizzato per il test cutaneo della M.G.G. contiene sequenze di DNA di *R. henselae* ma non di *A. felis* (Perkins *et al.*, 1992).

Dolan *et al.*, nel 1993, riuscirono a coltivare *R. henselae* dai linfonodi di due soggetti con M.G.G.; entrambi i pazienti avevano avuto contatti con gatti ed uno presentava elevati titoli anticorpali contro *R. henselae*. Infine, in un recente studio, Bergmans *et al.* (1995) hanno impiegato la reazione di polimerizzazione a catena per la ricerca del DNA di *R. henselae* e di *A. felis* nel pus aspirato da linfonodi e in biopsie linfonodali. La ricerca è stata effettuata su un gruppo di 89 pazienti con M.G.G. accertata e su un secondo gruppo di 137 soggetti con sospetta M.G.G.:

DNA di *R. henselae* è stato riscontrato nel 96% dei campioni del primo gruppo e nel 60% di quelli del secondo gruppo mentre in nessuno dei campioni esaminati è stata dimostrata la presenza di DNA di *A. felis*. Nello stesso studio, inoltre, è stata evidenziata una stretta correlazione tra presenza di DNA e titolo anticorpale contro *R. henselae* ed una minore sensibilità del test cutaneo rispetto alla reazione di polimerizzazione a catena.

In conclusione, i dati oggi a disposizione fanno ritenere che la stragrande maggioranza dei casi di M.G.G. sia dovuta a *R. henselae*. Allo stato attuale delle conoscenze, tuttavia, non è possibile escludere che più di un agente patogeno possa causare il quadro clinico della M.G.G. e, in tal senso, solo ulteriori ricerche potranno chiarire definitivamente il ruolo svolto da *A. felis* (Margileth e Hayden, 1993).

Quadro clinico

La linfadenopatia regionale è la caratteristica clinica più frequente della M.G.G. La tumefazione linfonodale interessa le stazioni tributarie di una lesione cutanea dovuta solitamente al graffio o al morso di un gatto. Tipicamente, dopo tre-dieci giorni dall'esposizione, in circa i due terzi dei casi, è possibile rilevare in corrispondenza della porta di entrata una manifestazione primaria costituita da una macchia eritematosa e dolente che gradualmente si trasforma in papula o pustola. La lesione primaria persiste per una-tre settimane e quindi regredisce spontaneamente.

Dopo circa due settimane dalla comparsa della manifestazione primaria, si sviluppa la linfadenopatia distrettuale non associata a linfoangite. La tumefazione linfonodale è in genere monolaterale ed interessa abitualmente un solo linfonodo; nel 20% dei casi sono colpiti più linfonodi della stessa sede e in circa un terzo dei soggetti viene coinvolta più di una sede. Le stazioni linfonodali più comunemente interessate sono, in ordine di frequenza, quelle ascellari, cervicali, sottomandibolari, retroauricolari ed inguinali, dal momento che la sede della lesione cutanea primitiva è generalmente agli arti superiori, al volto o alla regione cervicale e, molto più raramente, agli arti inferiori (cfr. fig. 1, Agg. I, col. *4625-4626). Tipico della M.G.G., anche se non frequente, è l'interessamento concomitante dei linfonodi epitrocleari ed ascellari quando la lesione primaria sia localizzata alla mano o all'avambraccio.

I linfonodi interessati possono raggiungere il volume di un uovo, sono mobili, molto dolenti alla palpazione e ricoperti da cute arrossata. Abitualmente la linfadenopatia regredisce spontaneamente in alcune settimane; talora, peraltro, scompaiono i segni di flogosi ma la tumefazione persiste per molte settimane o addirittura per diversi mesi. In circa il 10% dei casi il linfonodo va incontro a suppurazione, con svuotamento all'esterno del pus e formazione di fistole che successivamente guariscono lasciando una cicatrice.

La sintomatologia generale è di solito modesta: si possono avere febbre non elevata, cefalea, malessere, faringodinia e, occasionalmente, anoressia e vomito. In circa il 15% dei casi compare un esantema diffuso, di tipo eritematoso, eritemato-papuloso o con le caratteristiche dell'eritema nodoso o polimorfo che dura in genere meno di due settimane.

Le alterazioni dei parametri di laboratorio sono del tutto aspecifiche: è possibile osservare un modesto aumento della velocità di eritrosedimentazione, leucocitosi neutrofila, ipergammaglobulinemia.

Forme atipiche di M.G.G. si verificano in circa il 10% dei casi (Schwartzmann, 1992): tra queste, la più frequente è la *sindrome oculoghiandolare di Parinaud* caratterizzata dalla comparsa di un granuloma oculare o di congiuntivite e da linfadenopatia preauricolare, manifestazioni che regrediscono in genere in alcune settimane senza alcun postumo. Sono state anche descritte sindromi meningoencefaliche ad andamento grave ma con prognosi favorevole, radicoliti, tonsilliti, lesioni osteolitiche, artriti, polmoniti, epatiti granulomatose e forme di porpora trombocitopenica.

Classicamente la diagnosi di M.G.G. con presentazione tipica richiede che vengano soddisfatti tre dei seguenti quattro criteri: 1) una storia di recenti contatti con animali (abituamente un gatto o un cane), con presenza di un graffio o di una lesione primaria; 2) un test cutaneo positivo con l'antigene specifico; 3) l'esclusione di altre cause di linfadenopatia; 4) un quadro istopatologico di biopsia linfonodale compatibile con la malattia. Per i casi con presentazione atipica è necessario il rispetto di tutti e quattro i criteri. Il test cutaneo per la diagnosi di M.G.G. è praticamente uguale a quello descritto da Hanger e Rose ed utilizza un antigene preparato dal pus aspirato dal linfonodo di un soggetto con la malattia. Il test, tuttavia, non è disponibile in commercio, non è standardizzato e non è biologicamente sicuro.

Più recentemente, presso i CDC (*Centers for Disease Control*) di Atlanta, è stato approntato un test sierologico di immunofluorescenza indiretta per la ricerca di anticorpi contro *R. henselae*, dotato di elevata sensibilità e specificità (Regnery *et al.*, 1992). Questo test, quando sarà disponibile su larga scala, consentirà di porre una diagnosi di certezza di M.G.G. senza dover necessariamente ricorrere alla biopsia linfonodale ed all'esecuzione del test cutaneo (Dalton *et al.*, 1995). È attualmente in corso di allestimento anche un test immunoenzimatico che sembra possedere una sensibilità maggiore rispetto al test di immunofluorescenza, così come sono in fase di sviluppo metodi che utilizzano sonde di DNA o la reazione di polimerizzazione a catena (Adal *et al.*, 1994).

Nel caso si faccia ricorso alla biopsia linfonodale, si può utilizzare la colorazione di Warthin-Starry per mettere in evidenza i batteri. La coltivazione di *R. henselae* richiede particolari accorgimenti (v. ROCHALIMAEA GENERE**).

La diagnosi differenziale deve prendere in considerazione molte delle malattie che causano linfadenopatia.

La prognosi è abitualmente benigna, anche se in alcuni casi la linfadenopatia può protrarsi per uno-due anni.

Istopatologia e patogenesi

Il quadro anatomopatologico dei linfonodi interessati, pur non essendo specifico, è abbastanza caratteristico. Macroscopicamente i linfonodi richiamano l'aspetto della tubercolosi linfonodale. Microscopicamente (cfr. fig. 3, Agg. I, coll. *4627-4628), nella fase iniziale, il reperto tipico della M.G.G. è quello di una linfadenite reticolare iperplastica reattiva granulomatosa con infiltrazione di polimorfonucleati, plasmacellule, eosinofili, linfociti e con presenza di cellule giganti multinucleate. Successivamente compaiono focolai di necrosi coagulativa che subiscono un processo di colliquazione. Si assiste così alla comparsa di microascessi confluenti, senza caseosi, che portano alla formazione di cavità anfrattuose, spesso arginate da un ampio vallo di voluminosi macrofagi frammisti, più all'esterno, a linfociti, plasmacellule, granulociti eosinofili e cellule giganti tipo Langhans. Infine, il processo colliquativo può estendersi

alla capsula ed al tessuto pericapsulare con formazione di fistole e fuoriuscita di materiale purulento e con successiva proliferazione fibroblastica e fibrosi.

Il quadro anatomopatologico descritto non è diagnostico della M.G.G. potendo ricordare quello della tularemia, del linfogranuloma venereo, di infezioni da miceti o da micobatteri. Le forme batteriche sono evidenziabili con la colorazione di Warthin-Starry solo nelle fasi iniziali della malattia.

Lo stato immunitario del paziente, ed in particolare la risposta dei linfociti T, sembra essere il fattore più importante nel determinare la comparsa di quadri clinici ed istopatologici tanto diversi, come la M.G.G. e l'angiomatosi bacillare, da parte dello stesso agente patogeno (v. ANGIOMATOSI BACILLARE**). Mentre nei soggetti con malattia da HIV o con immunocompromissione da altre condizioni patologiche, l'infezione da *R. henselae* provoca una proliferazione vasale intensa con infiltrato infiammatorio, nel soggetto immunocompetente la risposta si esprime con la formazione di granulomi e microascessi senza neoformazione vasale. Nei pazienti con infezione da HIV un ruolo favorente nell'orientare la risposta verso l'angiogenesi potrebbe essere rivestito anche da concomitanti infezioni opportunistiche attraverso la produzione di citochine e fattori di crescita (Loutit e Tompkins, 1994).

Terapia

Non è disponibile una terapia specifica per la M.G.G. Abituamente l'adenopatia regredisce spontaneamente ma, nel caso di evoluzione suppurativa, si deve prendere in considerazione l'aspirazione o l'asportazione chirurgica al fine di ridurre il dolore ed accelerare il processo di guarigione.

La terapia antibiotica non è efficace nella M.G.G., sebbene *R. henselae* mostri sensibilità *in vitro* alla maggior parte dei chemioantibiotici e nonostante la risposta favorevole osservata in altre malattie dovute allo stesso agente patogeno. In letteratura sono state riportate segnalazioni di risultati soddisfacenti con l'uso di rifampicina, ciprofloxacina, gentamicina e cotrimossazolo (Schwartzman, 1992).

Bibliografia

- Adal K. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1509.
- Bergmans A. M. C. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1995, **171**, 692.
- Brenner D. J. *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2450.
- Cotter B. *et al.*, *Vichow's Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 1986, **410**, 103.
- Dalton M. J. *et al.*, *Arch. Inter. Med.*, 1995, **155**, 1670.
- Dolan M. J. *et al.*, *Ann. Inter. Med.*, 1993, **118**, 331.
- English C. K. *et al.*, *JAMA*, 1988, **259**, 1347.
- Fischer G. W., in Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. eds., *Principles and practice of infectious diseases*, 1995, 4 ed., Churchill Livingstone, New York.
- Jackson L. A. *et al.*, *Am. J. Public Health*, 1993, **83**, 1707.
- Kitchell C. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1985, **221**, 1090.
- Koehler J. E. *et al.*, *JAMA*, 1994, **271**, 531.
- Kordick D. E. *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 3245.
- Loutit J. S., Tompkins L. S., in Broder S., Merigan T. C., Bolognesi D. eds., *Textbook of AIDS Medicine*, 1994, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Margileth A. M. *et al.*, *JAMA*, 1984, **252**, 928.
- Margileth A. M., Hayden G. F., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 53.
- Perkins B. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1599.
- Regnery R. *et al.*, *Lancet*, 1992, **339**, 1443.
- Schwartzman W. A., *Clin. Infect. Dis.*, 1992, **15**, 893.
- Wear D. J. *et al.*, *Science*, 1983, **221**, 1403.
- Wear D. J. *et al.*, *Ophthalmology*, 1985, **92**, 1282.
- Zangwill K. M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 8.

ORLANDO ARMIGNACCO

GRAVIDANZA

GRAVIDANZA [v. vol. VII, coll. 670-932; Agg. I, coll. *3438-3497]

SOMMARIO GENERALE

AGGIORNAMENTO SULLA GRAVIDANZA GEMELLARE	col. 2547
GRAVIDANZE MULTIFETALI DOPO TRATTAMENTO DELLA STERILITÀ	col. 2550
EMBRIORIDUZIONE	col. 2560

AGGIORNAMENTO SULLA GRAVIDANZA GEMELLARE

SOMMARIO

Gravidanza gemellare complicata dalla morte di un feto (col. 2547): *Incidenza della complicanza e cause. - Complicanze per il feto sopravvissuto. - Ripetuto controllo fetale e materno. - Modalità e conduzione del parto. - Sindrome trasfusione-trasfuso* (col. 2549).

Gravidanza gemellare complicata dalla morte di un feto

Incidenza della complicanza e cause

La gravidanza [g.] gemellare è un evento piuttosto comune la cui incidenza è all'incirca di 1 ogni 80 g. Recentemente, tuttavia, per il diffondersi delle tecniche di fecondazione assistita (v.***) il numero delle g. gemellari è in aumento ed è certamente destinato ad accrescersi (v. sotto, coll. **2550-2560).

La g. gemellare, come è noto, si associa ad un maggior numero di complicanze, rispetto ad una g. singola, sia in termini di mortalità fetale, 3 o 4 volte maggiore, sia in termini di morbidità neonatale, che risulta aumentata soprattutto per l'alta incidenza di nascite premature.

In una g. gemellare, inoltre, si può verificare la morte di uno dei feti, che benché sia un evento raro comporta importanti problemi per il successivo decorso della g. Ci si trova, infatti, di fronte ad un aumentato rischio di mortalità e morbidità non solo fetale e neonatale ma anche materna. La reale incidenza con cui questo fenomeno si verifica è molto difficile da valutare essendo estremamente variabile nelle diverse casistiche. Si verificherebbe, infatti, per alcuni AA. nello 0,5% delle g. gemellari, nel 6,8% per altri e nel 2,2% per altri ancora. Dalla letteratura risulta, inoltre, un'incidenza variabile a seconda dell'epoca di g. in cui si effettua il primo esame ecografico. La frequenza con cui si verifica la morte di un gemello risulta essere del 67%, se il primo esame ecografico viene eseguito in una fase di g. molto precoce, del 21%, se al momento della prima ecografia erano stati visualizzati i due poli embrionali dotati di attività cardiaca, e dello 0,68-5% nelle fasi tardive della g.

Le cause che portano alla morte di uno dei feti sono molto complesse e spesso rimangono sconosciute. Tra le più frequenti sono comunque da considerare le alterazioni a livello del funicolo e la sindrome da trasfusione intergemellare nei gemelli monocoriali (v. sotto), la separazione prematura della placenta e malformazioni fetali incompatibili con la vita.

La maggiore frequenza, 3 volte superiore, si osserva tuttavia nelle g. monocoriali, monoamniotiche, rispetto a quelle bicoriali.

Complicanze per il feto sopravvissuto

Sarebbero più comuni in caso di monocorialità. Si osservano, infatti, con maggiore frequenza alterazioni del S.N.C., della

cute, dell'apparato urinario, del ritmo cardiaco, sofferenza fetale, ritardo di crescita intrauterina e iperbilirubinemia neonatale.

Per quanto riguarda l'etiologia dei danni d'organo sono state avanzate diverse ipotesi ma nessuna di esse può essere considerata conclusiva.

I danni d'organo potrebbero essere, infatti, dovuti al passaggio di sangue ricco di tromboplastina dal feto morto al gemello sopravvissuto, attraverso anastomosi placentari, oppure essere il risultato di una alterazione vascolare dovuta ad un evento embolico o a una coagulazione intravasale disseminata, o infine potrebbero riconoscere come causa alterazioni intrinseche legate allo stato di monozigosi.

Ripetuto controllo fetale e materno

Nell'eventualità che si verifichi la morte di uno dei gemelli è necessario mettere in atto precocemente uno stretto controllo sia fetale che materno.

Sarà necessario determinare se ci si trova di fronte ad una g. monocoriale, che si associa con maggior frequenza ai fenomeni tromboembolici già accennati. Dovranno essere eseguiti controlli ecografici seriati, ogni 2 o 3 settimane, per valutare l'accrescimento fetale ed il volume del liquido amniotico, e controlli flussimetrici che potrebbero svelare precocemente l'insorgere della sindrome da trasfusione intergemellare. Per la maggiore incidenza di emorragie e danni ischemici dovranno essere attentamente valutate le condizioni di sviluppo del S.N.C. sia del feto che del neonato attraverso controlli ecografici (dotati tuttavia di scarsa attendibilità) e possibilmente con l'esecuzione di un esame RMN.

Anche le condizioni materne andranno attentamente monitorate. La morte di un gemello può, infatti, essere accompagnata in una piccola percentuale dei casi da una coagulopatia da consumo (v.; v.*), con diminuzione del fibrinogeno plasmatico e delle piastrine, dovuta al passaggio di tromboplastina nella circolazione materna. Sarà quindi necessario determinare con frequenza settimanale i parametri coagulativi materni (tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale, fibrinogeno, prodotti di degradazione del fibrinogeno, piastrine) ed eventualmente instaurare una terapia eparinica.

Modalità e conduzione del parto

Per quanto riguarda le modalità del parto non ci sono controindicazioni al parto per via vaginale salvo in caso di malposizioni del feto vivo o in presenza di un feto papiraceo che impedisca l'espletamento del parto.

Il momento del parto dovrà essere determinato primariamente in base alla maturità polmonare fetale ed al tipo di placenta. In presenza di una g. bicoriale si può considerare che non vi sia un aumentato rischio fetale e si può aspettare, monitorando le condizioni materne e fetali, l'insorgere di un travaglio spontaneo. Se ci si trova, invece, di fronte ad una g. monocoriale il rischio di una coagulopatia da consumo è realmente elevato ed è necessario indurre il parto non appena il feto raggiunga la maturità polmonare.

Dopo la nascita anche il neonato dovrà essere attentamente controllato con particolare attenzione al S.N.C. e all'apparato genito-urinario.

In conclusione, una g. gemellare complicata dalla morte di uno dei gemelli, se strettamente sorvegliata, non sembra associata a un reale elevato rischio materno ed anche l'aumentato rischio di mortalità e morbidità fetale e neonatale può essere sostanzialmente ridotto. La morte di uno dei gemelli non rappresenta, dunque, un'indicazione all'interruzione della g. dell'altro feto.

Bibliografia

- Ben-Sholmo I., Alcalay M., Lipitz S. *et al.*, *J. Reprod. Med.*, 1995, 40, 458-462.
 Burke M. S., *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1990, 33, 69-78.
 Gaucherand P., Rudigoz R. C., Piacenza J. M., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1994, 111, 115.
 Harrison M. R. *et al.*, *The Unborn Patient. Prenatal diagnosis and Treatment*, 1984, Grune Stratton, Orlando.
 Santema J. G., Swaak A. M., Wallemburg H. C. S., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, 102, 26-30.
 Wessel J., Schmidt-Gollwitzer K., *J. Perinat. Med.*, 1988, 16, 467-473.

CARLO ROMANINI

Sindrome trasfusore-trasfuso

La sindrome trasfusore-trasfuso (STT; anche definita sindrome da trasfusione fetto-fetale, sindrome da trasfusione intergemellare) è una grave, ma fortunatamente rara, complicanza della g. gemellare e consiste nel passaggio di sangue da un gemello (donatore) all'altro (ricevente). È associata con un tasso di mortalità perinatale superiore all'80%.

I gemelli (v.) possono essere classificati in bizigotici e monoizigotici: i primi si sviluppano a partire da due diverse uova fecondate mentre i secondi da un unico uovo fecondato che successivamente si divide in due abbozzi embrionari distinti. Le placente nel caso dei gemelli bizigotici sono sempre nettamente distinte dal punto di vista dell'origine (anche se possono essere adiacenti ed a stretto contatto a tal punto da sembrare una) e quindi i gemelli si definiscono bicoriali. Nel caso di gemelli monoizigotici si può avere o una singola placenta (gemelli monocoriali) o due diverse placente (bicoriali), a seconda del momento in cui è avvenuta la separazione dei due abbozzi embrionari (se prima o dopo la formazione del trofoblasto).

Affinché la STT abbia luogo devono necessariamente essere presenti dei collegamenti (anastomosi) fra i vasi di una placenta e quelli dell'altra. Ben si comprende a questo punto come nel caso dei gemelli monocoriali le probabilità che tali anastomosi siano presenti sono più alte che negli altri casi, ma raramente può accadere che tali collegamenti si formino fra due placente separate. Ci sono studi che mettono in risalto la maggior frequenza di insorgenza di tale sindrome in placente con inserzione velamentosa del funicolo: probabilmente la causa è da addebitarsi al fatto che in questi casi si può facilmente verificare la compressione dei vasi di un funicolo facilitando il passaggio di sangue attraverso le anastomosi già presenti (Fries *et al.*, 1993). I tipi di anastomosi possono essere in ordine di frequenza: artero-arteriose, artero-venose, veno-venose; inoltre, ci possono essere diverse associazioni fra queste. La presenza di tali anastomosi non è però sinonimo di STT in quanto esse si possono trovare anche in placente monocoriali senza però determinare alcun problema. Secondo un recente lavoro, nella STT le anastomosi risulterebbero essere in numero minore e più profonde che negli altri casi (Bajoria *et al.*, 1995). La gravità della sindrome sarà determinata dalla entità degli scambi di sangue fra l'uno e l'altro gemello.

Le conseguenze della STT sono a carico di entrambi i gemelli (donatore e ricevente). Il problema principale è che uno dei due gemelli (il ricevente) «riceverà» più sangue del normale, di conseguenza il suo cuore dovrà far fronte ad un lavoro maggiore e quindi andrà incontro ad una ipertrofia tanto più grave quanto maggiore è la quantità di sangue che viene trasfusa. Tale ipertrofia può raggiungere gradi talmente elevati da essere definita *cardiomegalia*, e può condurre a scompenso cardio-circolatorio. Nell'altro gemello, per contro, avviene l'esatto contrario e di conseguenza si avrà ipoplasia cardiaca e anemia, e nei casi più gravi si

potrà arrivare all'*acardia*, malformazione incompatibile con la vita.

Ma non è solo il cuore ad essere interessato in questa sindrome. Si può verificare che uno dei due gemelli muoia in utero e allora esso si comporterà come una grossa anastomosi inducendo una perdita ingente di sangue da parte del gemello sopravvissuto, con conseguenti forti danni iposici che possono arrivare fino all'ischemia di organi periferici: ad es., si può verificare la necrosi cerebrale (Grafe, 1993) che può condurre a microcefalia, porencefalia, *widespread necroses*, aplasia della cute. Inoltre, può essere colpito anche il rene, che potrà presentare delle cisti a probabile origine ischemica, o ancora si potranno verificare infarti a livello epatico e splenico.

La diagnosi di STT è prettamente ultrasonografica (ecografia ed eco-Doppler). Con l'ecografia si potranno riscontrare nel gemello ricevente l'idrope, il polidramnios e in alcuni casi la cardiomegalia; nel donatore si osserverà il ritardo di crescita, la ipoplasia cardiaca o la eventuale *acardia*. Quindi, quello che sicuramente attirerà subito l'attenzione del medico è la forte sproporzione fra i due gemelli. Per quanto concerne l'eco-Doppler (Hecher *et al.*, 1995), questo esame sarà estremamente utile in quanto permette il riscontro di alterazioni di flusso della circolazione fetale: nella STT si può osservare, infatti, un incremento dell'indice di pulsatilità dell'arteria ombelicale e riduzione della velocità media di flusso dell'aorta sia nel feto donatore che nel ricevente, riduzione dell'indice di pulsatilità dell'arteria cerebrale media nel feto ricevente e riduzione della velocità media di flusso nel feto donatore. Tali alterazioni sono in relazione con l'ipovolemia nel feto donatore e l'insufficienza cardiaca congestizia del ricevente (Grafe, 1993).

Riguardo alla terapia, non esistono in realtà dei veri protocolli terapeutici per questa sindrome, ma sono stati via via tentati diversi approcci più o meno conservativi. Uno di questi consiste nell'aborto selettivo, tramite embolizzazione vascolare della vena ombelicale, del feto maggiormente compromesso, tentando così di salvare quello in migliori condizioni di salute (Dommergues *et al.*, 1995). Un altro tipo di terapia sperimentata si avvale dell'uso del laser, con il quale viene effettuata l'interruzione per via endoscopica della anastomosi incriminata, con ottimi risultati (De Lia *et al.*, 1995; Ville *et al.*, 1995); per altre notizie a questo riguardo v. FETO**, *sindrome da trasfusione intergemellare* (col. **2284-2285).

Bibliografia

- Bajoria R., Wigglesworth J., Fisk N. M., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, 172 (3), 856-863.
 De Lia J. E., Kuhlman R. S., Harstad T. W., Cruikshank D. P., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, 172 (4), 1202-1208.
 Dommergues M., Mandelbrot L., Deleziode A. L. *et al.*, *Fetal Diagn. Ther.*, 1995, 10 (1), 26-31.
 Fries M. H., Goldstein R. B., Kilpatrick S. J. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1993, 81 (4), 569-574.
 Grafe M. R., *Pediatr. Pathol.*, 1993, 13 (1), 15-19.
 Hecher K., Ville Y., Nicolaides K. H., *Ultrasound Med.*, 1995, 14 (2), 101-108.
 Ville Y., Hyett J., Hecher K., Nicolaides K., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 (4), 224-227.

CARLO ROMANINI

GRAVIDANZE MULTIFETALI DOPO TRATTAMENTO DELLA STERILITÀ**SOMMARIO**

Incidenza (col. 2551). - **Cause** (col. 2553): *Posologia dei farmaci*. - *Cause della sterilità*. - *Costituzionalità delle pazienti*. - **Esiti delle**

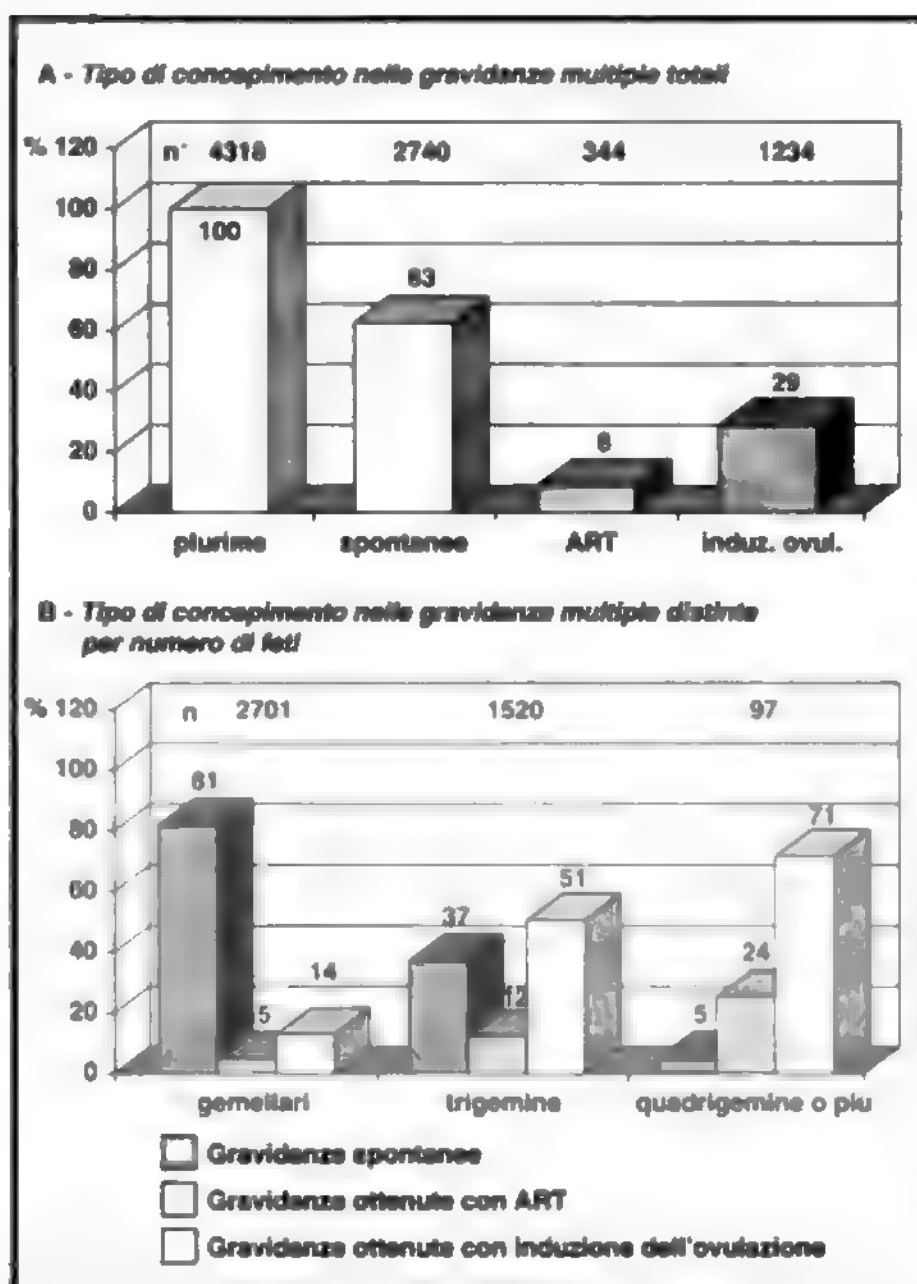


Fig. 1. Tipi di concepimento nelle g. multiple. (Realizzata con la somma dei dati riportati nella tab. I).

gravidanze multiple (col. 2557): *Complicazioni ostetriche. - Morbosità fetale. - Malformazioni congenite. - Basso peso alla nascita. - Mortalità precoce e perinatale.*

Incidenza

L'incidenza delle g. multiple nei concepimenti spontanei è molto bassa e si può calcolare genericamente con la formula di Hellin: $g. \text{ multiple} = 1 : 80^{(n-1)}$, in cui n è il numero dei feti. Il calcolo in questo modo risulta però approssimativo: l'incidenza reale per le g. gemellari è 1,05-1,35 per 100 concepimenti spontanei e per le g. trigemine di 0,010-0,017. Per le g. con un numero superiore di feti l'insorgenza spontanea è veramente eccezionale.

In effetti se noi consideriamo le g. multiple in totale (fig. 1, A) ci accorgiamo che la maggioranza di esse (63%) è rappresentata da g. spontanee e solo l'8% sono dovute a ART (*Assisted Reproductive Technologies*; v. FECONDAZIONE ASSISTITA**). Il 29% delle g. multiple è la conseguenza di ovulazioni indotte con farmaci, quali il clomifene (v.) o, specialmente, le gonadotropine. Tuttavia se si analizzano in dettaglio queste g. multiple (fig. 1, B) ci accorgiamo che la maggiore incidenza di g. multiple nei concepimenti spontanei è valida solo per quelle gemellari, come poteva essere intuitivo, mentre le g. trigemine o più ancora le quadrigemine sono dovute prevalentemente alla induzione dell'ovulazione e all'ART. Nella tab. I è riportata una analisi degli AA. più recenti che hanno studiato questo problema.

Bisogna sottolineare che è l'induzione dell'ovulazione (Corchia *et al.*, 1996) con farmaci la maggiore responsabile delle g. multiple e non l'ART. Si sarebbe potuto pensare il contrario, dato l'elevato numero di follicoli che si cerca di ottenere nell'induzione dell'ovulazione multipla per ART. Tuttavia questi follicoli vengono poi aspirati e l'incidenza delle g. multiple è in funzione degli embrioni trasferiti e non dei follicoli originali. Diverso è nell'induzione dell'ovulazione con clomifene o con gonadotropine.

Nel primo caso l'ovulazione avviene dopo 3-10 giorni dalla fine della terapia e quindi una volta dato lo stimolo ipotalamico è impossibile intervenire per «controllare» l'ovulazione o il numero dei follicoli che si sviluppano. Fortunatamente di solito è un solo follicolo che matura, raramente 2 o 3, quando si inizia precocemente la somministrazione del farmaco (in 2° o 3° giornata del ciclo). Infatti dopo la terapia con Clomifene Citrato (CC) le g. multiple sono comprese tra il 5 e il 10% delle g. e sono quasi sempre gemellari, eccezionalmente trigemine o più (Mac Gregor *et al.*, 1968; Ahlgren *et al.*, 1976; Adashi *et al.*, 1979; Gysler *et al.*, 1982; Gorlitsky *et al.*, 1978). Nei primi rapporti della Marrell (Asch e Greenblatt, 1976), viene riportata, su 2.369 g., una incidenza di g. multiple variabile dal 6,25 al 12,30%, mediamente del 7,9%. Di queste l'88% è rappresentato da g. gemellari, talvolta ricercate e comunque gradite dalla coppia; il 6% da g. trigemine; il 4% da g. quadrigemine e il 2% da quintuple o più.

Quando si induce l'ovulazione con gonadotropine (Gn; v. GONADORELINA, ANALOGHI DELLA**) i risultati possono essere in tal senso disastrosi, se non si controlla accuratamente la risposta della paziente allo stimolo ovarico e non si interrompe la stimolazione quando si constata che sono troppi i follicoli cresciuti e troppo elevati risultano i valori raggiunti dell'estradiolo plasmatico. Questa interruzione della stimolazione ovarica può anche risultare inefficace per l'induzione di un picco endogeno di LH da parte del *feed-back* positivo dell'estradiolo sull'ipotalamo. L'incidenza di g. multiple in questo tipo di stimolazione oscilla tra il 10 e il 30% (Gemzell, 1969; Thompson e Hansen, 1970; Oelsner *et al.*, 1978; Schwarts

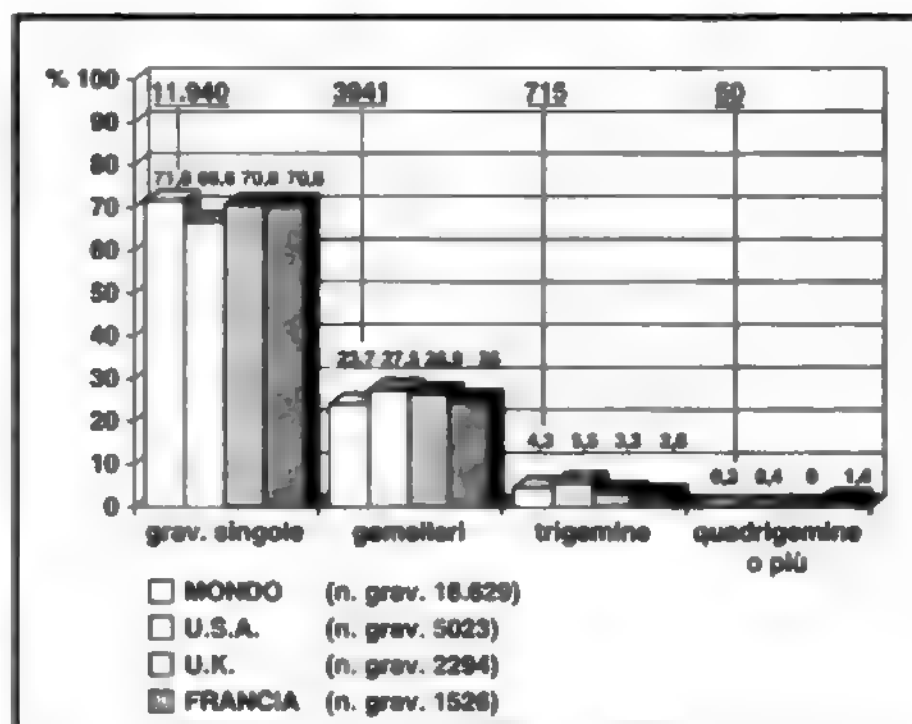


Fig. 2. G. plurime in FIV-ET (1993 ART World Collaborative Report). Dati percentuali mondiali e dei tre Stati che insieme superano la metà della casistica. (Da Mouzon J., Lancaster P., International Working Group for Registers on Assisted Reproduction [IWGROAR], 15° Congresso Mondiale di Fertilità e Sterilità, 15-22 settembre 1995, Montpellier, Francia).

TAB. I. TIPO DI CONCEPIMENTO NELLE GRAVIDANZE MULTIPLE

(da Wilcox L. S. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1996, 63, 361, modificata)

Autori	Anno	Nazione	Periodo indagato	Tipo di g.	N. di g.	Tipo del concepimento (%)		
						Spontaneo	ART*	Induzione
Vervliet <i>et al.</i>	1989	Belgio	1985-88	trigemine quadrigem.	15 6	1 (7) — (0)	3 (20) — (0)	11 (73) 6 (100)
Lipitz <i>et al.</i>	1989	Israele	1975-88	trigemine	78	9 (12)	7 (9)	62 (79)
Sasson <i>et al.</i>	1990	U.S.A.	1981-89	trigemine	15	7 (47)	3 (20)	5 (33)
Rein <i>et al.</i>	1990	U.S.A.	1983-86	trigemine quadrigem.	13 2	3 (23) —	1 (8) —	9 (69) 2 (100)
Collins <i>et al.</i>	1990	U.S.A./Canada	1980-89	quadrigem.	71	4 (6)	18 (25)	49 (69)
Gonen <i>et al.</i>	1990	Canada	1978-88	trigemine quadrigem. quintuple	24 5 1	14 (58) 1 (20) — (0)	— (0) — (0) 1 (100)	10 (42) 4 (80) — (0)
Elster <i>et al.</i>	1991	U.S.A.	1984-89	trigemine	1103	432 (38)	102 (9)	569 (50)
Weissman <i>et al.</i>	1991	Israele	1978-87	trigemine	29	5 (17)	4 (14)	20 (69)
Garel <i>et al.</i>	1992	Francia	1988-90	trigemine	12	1 (8)	9 (75)	2 (17)
Mordel <i>et al.</i>	1992	Israele	1978-87	trigemine	36	7 (19)	— (0)	29 (81)
Boulot <i>et al.</i>	1992	Francia	1985-90	trigemine	19	13 (68)	— (0)	6 (32)
Levene <i>et al.</i>	1992	Gran Bret.	1989	trigemine quadrigem. o più	144 12	48 (33) — (0)	51 (35) 4 (33)	45 (31) 8 (67)
Detom <i>et al.</i>	1993	Belgio	1976-92	gemellari	2480	2034 (82)	99 (4)	347 (14)
Byrne <i>et al.</i>	1993	Irlanda	1980-90	trigemine	19	13 (68)	— (0)	6 (32)
Callahan <i>et al.</i>	1994	U.S.A.	1991	gemellari trigemine	221 13	145 (65) 3 (23)	38 (17) 4 (31)	38 (17) 6 (46)

* Assisted Reproductive Technologies.

et al., 1980; Lunenfel *et al.*, 1982; Kurachi *et al.*, 1985) e spesso si tratta di g. plurifetali.

Il numero di g. multiple è elevato anche con le tecniche di fecondazione assistita (v.***) ed è compreso tra il 20 e il 30% delle g. Nella fig. 2 sono riportati i dati di uno studio pluricentrico mondiale diffuso al Congresso Mondiale di Fertilità e Sterilità di Montpellier (15-22 settembre 1995) e riferentesi all'anno 1993.

L'incidenza di g. multiple è stata del 28,3% (pari a 4.706 concepimenti plurimi su 16.629 g.) e di queste l'83,7% era rappresentato da g. gemellari, il 15,2% da g. trigemine e solo l'1,1% da g. quadrigemine o più. Questi dati si riferiscono in particolare alla FIV-ET (*Fecondation In Vitro/Embryo Transfer*), ma sono simili anche per le altre tecniche di procreazione assistita.

Cause

Posologia dei farmaci

Nell'induzione dell'ovulazione con CC la g. multipla può essere causata dall'eccessiva quantità di farmaco o dalla precoce somministrazione di esso. Nei cicli ovulatori, quando si voglia migliorare l'efficienza del corpo luteo, per esempio, è opportuno iniziare al 5° giorno del ciclo, quando è cominciata la selezione del follicolo dominante e con la posologia più bassa (50 mg per 5 giorni). Se si inizia prima o con posologie più elevate è più frequente l'incidenza di ovulazioni multiple e la possibilità di g. multiple.

Nella stimolazione con gonadotropine la posologia del farmaco è ancora più importante, sia se utilizzate da sole che in associazione con GnRH-Analogo (GnRH-A; v. GONADOTROPINA, ANALOGHI DELLA**). La risposta ovarica è ormono-dipendente e quindi maggiore è lo stimolo, maggiore è il numero di follicoli che vengono reclutati e portati a maturazione.

TAB. II. DISTRIBUZIONE DELLE GRAVIDANZE MULTIPLE, INDOTTE DA Gn OPPURE GnRH, DISTINTE PER CAUSA DI STERILITÀ

(da Farhi J. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 429, modificata)

Causa di sterilità	Numero dei feti			
	2	3	4	5
Ipot. ipotat.-ipof.	6	2		
Sindrome dell'ovaio policistico	12	3	1	1
Amenorrea da eccessivo dimagrimento	2			
Iperplasia surrenale congenita	1			
Totale	21	5	1	1

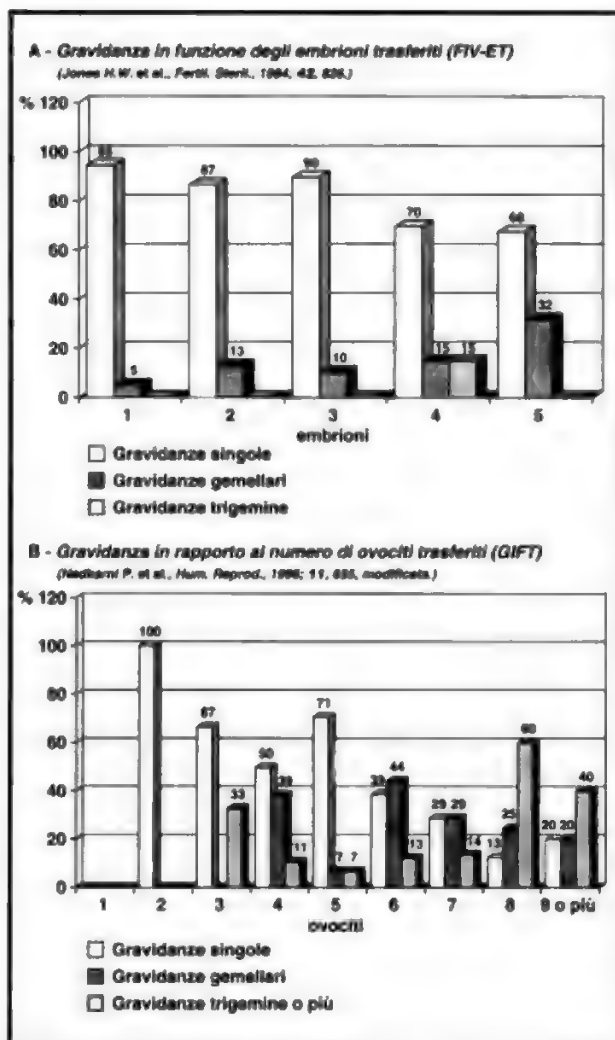


Fig. 3. G. in rapporto alla FIV-ET e al GIFT.

Lo stesso vale per le ART in riferimento però al numero degli embrioni (FIV-ET, PRO.S.T. [Pronuclear Stage Transfer] o TET [Tubal Embryo Transfer], etc.) o di ovociti trasferiti (GIFT; *Gametes Intrafallopian Transfer*) nell'utero o nelle tube (Walters, 1996) (fig. 3). V. FECONDAZIONE ASSISTITA**.

Causa della sterilità

La causa della sterilità è importante o addirittura determinante nella incidenza delle g. multiple. La ipofunzione ipotalamo-ipofisaria è molto sensibile al tipo dei farmaci utilizzati e alla loro posologia. Per es. risponde poco alla terapia con CC; bene a quella con GnRH e con scarso numero di g. plurime, per lo più gemellari; altrettanto bene in modo proporzionale alla terapia, con Gn e spesso con g. plurime, talvolta plurifetali (Garcea et al., 1986). Nella sindrome dell'ovaio policistico invece il CC è di buona efficacia e può dare g. multiple in un numero limitato di casi. Se si usano le Gn, invece, anche se utilizzate con precauzione (*low dose*) o selezionate (FSH purificato) (Garcea et al., 1985), la risposta può essere improvvisa ed eccessiva e tradursi in g. multiple spesso placentali. Questo può verificarsi

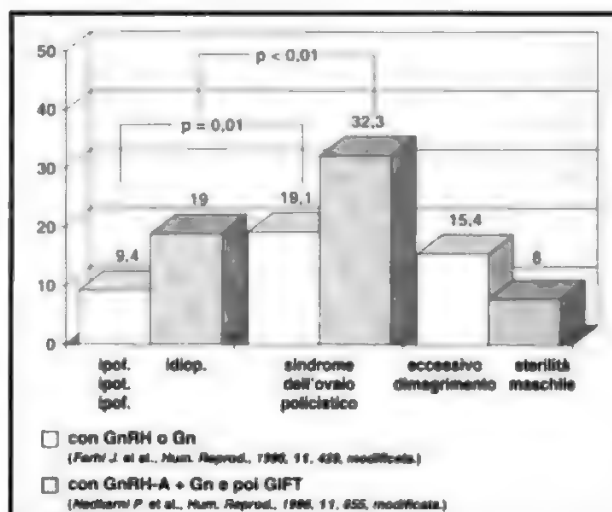


Fig. 4. Distribuzione percentuale delle g. multiple rispetto alle g. singole distinte per causa di sterilità.

anche con il GnRH (Nadkarni et al., 1996; Farhi et al., 1996) anche se si è predesensibilizzata l'ipofisi con GnRH-A (Filocori et al., 1996) (tab. II e fig. 4).

Costituzionalità delle pazienti

Alcune pazienti, appartenenti a famiglie con ripetuti parti gemellari o plurimi, rispondono in modo improvviso ed eccessivo all'induzione dell'ovulazione, anche a piccole dosi di farmaci. Negli anni '80 una donna, con 2 sorelle gemelle e la cui madre era gemella, ebbe una g. pentagemellare con 16 fiale di HMG e 10.000 unità di HCG (Garcea e Sgreccia, 1984). Il fatto sembrò allora eclatante e tenne la copertina di un settimanale italiano al momento della nascita e al compimento del primo anno di vita dei 5 fratelli (*Oggi*, n. 4 e 50, anno 1982). Per sottolineare la vivacità della risposta individuale su base genetica di questa paziente basta ricordare che quando si induce l'ovulazione multipla per ART,

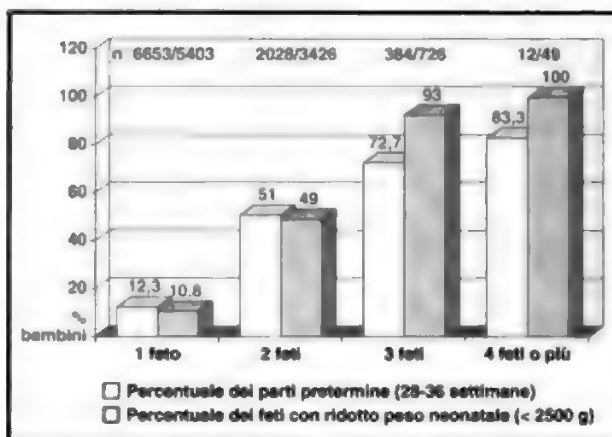


Fig. 5. Percentuale dei parti pretermine (28-36 settimane) e percentuale dei feti con ridotto peso neonatale (< 2500 g) nella FIV-ET a seconda del numero di feti partoriti. (1993, ART World Collaborative Report).

TAB. III. ESITI DELLE GRAVIDANZE MULTIPLE INDOTTE DA Gn O DA GnRH

(da Farhi *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1996, 1, 429, modificata)

N. sacchi ecografici	1	2	3	4	5	N. feti iniziali 66
N. gravidanze iniziali	--	21	5	1	1	28
N. aborti spontanei		2				
N. riduzioni spontanee		5 (a 1)	1 (a 2)	1 (a 3)	1 (a 4)	
N. parti	5	15	5	1		26
N. feti partoriti	5	30	15	4	—	N. bambini in braccio 54 (-18%)

usualmente non si effettua il controllo prima della somministrazione di 18 fiale di Gn (7 giorni).

Esiti delle gravidanze multiple

Le g. plurifetali sono soggette a una sequenza di patologie ostetriche e perinatali, spesso in rapporto al numero dei feti presenti. Si osserva infatti un incremento di aborti globali, di aborti selettivi, di parti pretermine e un ridotto peso neonatale. Dopo la nascita i bambini sono soggetti a una più alta morbosità neonatale e una più elevata mortalità fetale, perinatale e infantile (IVF and IFT pregnancies, 1990; Australian in vitro fertilization Collaborative Group, 1985; Motta *et al.*, 1991; Piro *et al.*, 1991; Seoud *et al.*, 1992). Tali patologie non differiscono se la plurifetalità è spontanea o indotta da terapie o da ART (Piro *et al.*, 1991; Olivennes *et al.*, 1996).

Complicazioni ostetriche

L'incidenza di ipertensione e di diabete indotti dalla g. è fortemente aumentata nelle donne portatrici di g. multiple come anche la pre-eclampsia e l'eclampsia (Chamberlain, 1991; Douglas e Redman, 1994; Hardardottir *et al.*, 1996) e le emorragie da placenta previa o da atonia *post partum* (Beral *et al.*, 1987; Tan *et al.*, 1992). Un ritardo di accrescimento fetale si può verificare in ogni epoca, ma specialmente nel terzo trimestre di g., quando il feto richiede un maggior rifornimento di sostanze energetiche dalla placenta spesso relativamente insufficiente (Chamberlain, 1991). È facile che si verifichi un parto pretermine (fig. 5). I parti assistiti o anche i tagli cesarei sono più frequenti che nelle g. singole (Gissler *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996).

Morbosità fetale

La prematurità fetale e il basso peso alla nascita sono fattori di rischio elevato di morbosità fetale quali ischemia ed emorragie cerebrali con conseguenti paralisi o ritardato sviluppo psichico. Frequenti sono anche le cataratte. Petterson *et al.* (1993) riferiscono che il rischio di paralisi cerebrali è 5 volte maggiore nelle g. gemellari e 17 volte nelle g. trigemine rispetto alle g. singole; mentre Yokoyama *et al.* (1995) stimano il rischio di paralisi cerebrale per i nati da g. gemellare pari all'1,5%, per quelli da g. trigemina all'8% e per i nati da g. quadrigemina al 50%.

Malformazioni congenite

L'incidenza di malformazioni congenite è maggiore nei bambini nati da g. multiple, specie se monocoriali (Doyle, 1996). In particolare sono aumentati i difetti del tubo neurale e le malformazioni strutturali del tratto gastrointestinale.

Basso peso alla nascita

Il peso neonatale alla nascita, specie per l'incidenza dei parti prematuri, è di solito basso per i bambini nati da g. plurime, tanto più quanto maggiore è il numero dei feti (fig. 5). Il peso medio per i bambini nati da g. singole è di 3300 g. circa, quello dei gemelli di 2500 g. dei trigemini di 1800 g. e dei quadrigemini di 1500 g. o meno (Manzur *et al.*, 1995). Questa riduzione è dovuta solo in parte alla prematuranza.

Mortalità precoce e perinatale

La scomparsa di un sacco o l'aborto totale è frequente nelle g. multiple (tab. III). Questa riduzione fetale spontanea interessa fino al 50% delle g. e per almeno 1 feto, come è stato osservato nelle gravidanze indotte (Manzur *et al.*, 1995). È probabile che lo stesso fenomeno si verifichi nelle g. multiple spontanee, ma non viene usualmente evidenziato per il ritardo relativo nell'esecuzione dell'indagine ultrasonografica.

La mortalità fetale tardiva è mediamente tre volte più elevata nelle g. gemellari rispetto alle g. singole e almeno quattro volte più frequente nelle g. trigemine o più (Doyle, 1996).

La mortalità neonatale (0-27 giorni) dimostra la maggiore differenza: i bambini nati da parti gemellari hanno una mortalità sette volte maggiore di quelli nati da parti semplici e quelli nati da g. trigemine superiore a 20 volte (Doyle, 1996). Pertanto, malgrado le nascite da g. multiple abbiano rappresentato il 2,5% dei parti in Inghilterra e nel Galles nel 1991, esse hanno inciso per l'8% di tutta la natalità, per il 19% delle mortalità neonatali e per il 7% delle morti post-natali (Manzur *et al.*, 1995; Office of Population Censuses and Surveys, Series DH3).

Negli ultimi anni si è proposta e tende a imporsi la tecnica di riduzione fetale, che consiste nell'uccidere uno o più feti per lasciarne sopravvivere usualmente 2, al fine di eliminare gli inconvenienti e i rischi materni e fetali delle g. multiple (v. sotto capitolo *Embrioiduzione*). Ma gli aspetti etici e psicologici di queste tecniche di embrioiduzione rimangono fortemente problematici e la strada maestra dovrebbe essere rappresentata dalla *prevenzione delle gravidanze multiple*. Almeno nelle tecniche ART questo può essere ottenuto con il trasferimento in utero o nelle tube di 2 o al massimo di 3 embrioni o di 2-3 ovociti e spermatozoi in caso di GIFT o con l'interruzione della stimolazione o con l'astensione dai rapporti in caso di induzione dell'ovulazione, che abbia provocato un esagerato effetto maturativo dei follicoli ovarici. Se gli embrioni scelti sono di buona qualità, il trasferimento anche di 2 soltanto di essi in utero riduce drasticamente il numero

delle g. multiple senza ridurre il numero di g. per coppie stimulate (Nijs *et al.*, 1993; Staessen *et al.*, 1993; Kodama *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1995).

Questo a nostro avviso deve essere l'atteggiamento futuro nella induzione dell'ovulazione o nelle ART per contenere l'incidenza delle g. multifetali e dei relativi rischi in esse presenti per la donna, per i feti e per i bambini. Le coppie, che da anni cercano una g. e spesso sono in età avanzata, accettano volentieri una g. gemellare, con maggiore difficoltà una g. con un più alto numero di feti. Sono queste ultime le più pericolose per le madri e per i figli e devono essere evitate con ogni sforzo da parte del terapeuta.

Bibliografia

- Adashi E. Y., Rock J. A., Sapp K. L. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1979, **31**, 620.
- Ahlgren M., Kallen B., Rannevik G., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1976, **55**, 371.
- Asch R. H., Greenblatt R. B., *J. Reprod. Med.*, 1976, **17**, 175.
- Australian In Vitro Fertilization Collaborative Group, *B.M.J.*, 1985, **291**, 1160-1163.
- Beral V., Doyle P., Tan S. L. *et al.*, *Br. Med. Bull.*, 1987, **46**, 753-768.
- Boulot P., Hedon B., Pelliccia G. *et al.*, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1992, **43**, 123-129.
- Byrne B. M., Rasmussen M. J., Stronge J. M., *Jr. Med. J.*, 1993, **86**, 55-57.
- Callahan T. L., Hall J. E., Ettner S. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 244-249.
- Chamberlain G., *Br. Med. J.*, 1991, **303**, 111-115.
- Collins M. S., Bleyl J. A., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990, **162**, 1384-1392.
- Corchia C., Mastroiacovo P., Lanni R. *et al.*, *Am. J. Public Health.*, 1996, **86**, 851-844.
- Derom C., Derom R., Vlietinck R. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1993, **60**, 493-496.
- Douglas K. A., Redman C. W., *Br. Med. J.*, 1994, **309**, 1395-1400.
- Doyle P., *Hum. Reprod.*, 1996, **11** (Suppl. 4), 110-120.
- Elster A. D., Bleyl J. L., Craven T. E., *Obstet. Gynecol.*, 1991, **77**, 387-393.
- Evans M. I., Littman L., Louis L. S. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, **172**, 1750-1757.
- Farhi J., West C., Patel A., Jacobs H. S., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 429-434.
- Filicori M., Cognigni G. E., Arnone R. *et al.*, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1996, **65**, S19-21.
- Garcea N., Sgreccia M., *Minerva Ginecologica*, 1984, **36**, 299.
- Garcea N., Campo S., Panetta V., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1985, **151**, 635.
- Garcea N., Dargenio R., Campo S., *Minerva Ginecologica*, 1986, **38**, 285.
- Garel M., Blondel B., *Hum. Reprod.*, 1992, **7**, 729-732.
- Gemzell C., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1969, **68** (Suppl. 1), 1.
- Gissler M., Silvero M., Hemminki E., *Hum. Reprod.*, 1995, **10**, 1856-1861.
- Gonen R., Heyman E., Asztalos E. V. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990, **162**, 454-459.
- Gorlitsky G. A., Kase N. G., Speroff L., *Obstet. Gynecol.*, 1978, **51**, 265.
- Gysler M., March C. M., Mishell D. R. Jr. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1982, **37**, 161.
- Hardardottir H., Kelly K., Bork M. D. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1996, **87**, 370-374.
- IVF and IUI pregnancies, Australia and New Zealand 1988. National Perinatal Statistics Unit Fertility Society for Australia, Sydney. National Perinatal Unit ISSN, 1990, p. 1030.
- Jones H. W., Acosta A. A., Rews M. C. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1984, **42**, 826.
- Kodama H., Fukuda J., Kambe H. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1995, **10**, 2909-2913.
- Kinuchi K., Anno T., Suzuki M. *et al.*, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1985, **19**, 43.
- Levene M. I., Wild J., Steer P., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1992, **99**, 825-833.
- Lipitz S., Reichman B., Paret G. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1989, **161**, 1284-1287.
- Lunenfel B., Ishke A., Tikotzky D. *et al.*, *hMG-hCG therapy for ovulation*, in Van der Hoven H., Klopper A., Lunenfel B. eds., *Hormonal factors in fertility, infertility and contraception*, 1982, Excerpta Medica, Amsterdam, p. 289.
- MacGregor A. H., Johnson J. E., Bunde C. A., *Fertil. Steril.*, 1968, **19**, 616.
- Manzur A., Goldsman M. P., Stone S. C. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1995, **63**, 252-257.
- Mordel N., Ezra Y., Dorembus D. *et al.*, *J. Perinat. Med.*, 1992, **20**, 117-122.
- Motta G., Satolli E., Prudenziati A., *Gravidanze multiple: morbosità e mortalità*. Relazione presentata al IV Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Perinatale, Montecatini 22-24 aprile 1991, Volume I Atti (G. P. Donzelli), 1991, Monduzzi, Bologna, pp. 27-37.
- Nadkarni P., Shrivastav P., Bharath M., Craft L., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 655-659.
- Nijs M., Geerts L., Van Roosendaal E. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1993, **59**, 1245-1250.
- Oelsner G., Serr D. M., Mashiach S. *et al.*, *Fertil. Steril.*, 1978, **30**, 583.
- Office of Population Censuses and Surveys, *Mortality statistics, perinatal and infant, social and biological factors*, HMSO, London, U.K. Series DH3, No. 26.
- Olivettes F., Kadhel P., Rufat P., *Fertil. Steril.*, 1996, **66**, 105-109.
- Petterson B., Nelson K. B., Watson L., Stanley F., *Br. Med. J.*, 1993, **307**, 1239-1243.
- Piro E., Attardo G., Corsello G., La Grutta S., Petrotto G., Piccione M., Vitaliti S. M., Giuffrè L., *Sviluppo psicomotorio dei nati da gravidanza plurima*. Comunicazione presentata al IV Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Perinatale, Montecatini 22-24 aprile 1991, Volume II Atti. Comunicazioni (Brancioni F., Donzelli G. P.), 1991, Monduzzi, Bologna, pp. 263-266.
- Rein M. S., Barbieri R. L., Greene M. F., *Int. J. Fertil.*, 1990, **35**, 154-156.
- Sassoon D. A., Castro L. C., Davys J. L., Hobel C. J., *Obstet. Gynecol.*, 1990, **75**, 817-820.
- Schwartz M., Jewelewicz R., Dyrenfurth I. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1980, **134**, 80.
- Scoud M. A. F., Toner J. P., Kruthoff C., Muasher S. J., *Fertil. Steril.*, 1992, **57**, 825-834.
- Staessen C., Janssenswillen C., Van den Abbeel E. *et al.*, *Hum. Reprod.*, 1993, **8**, 1650-1653.
- Tan S. L., Doyle P., Campbell S. *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992, **167**, 778-784.
- Thompson C. R., Hansen L. M., *Fertil. Steril.*, 1970, **21**, 844.
- Vervliet J., De Cleyn K., Renier M. *et al.*, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1989, **33**, 61-69.
- Walters D. E., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 10-12.
- Weissman A., Yoffe N., Jakobi P. *et al.*, *Am. J. Perinatol.*, 1991, **8**, 333-337.
- Wilcox L. S., Kiely J. L., Melvin C. L., Martin M. C., *Fertil. Steril.*, 1996, **65**, 361-366.
- Yokoyama Y., Shimizu T., Hayakawa K., *Int. J. Epidemiol.*, 1995, **24**, 943-948.
- Zhang J., Bowes W. A. Jr., Grey T. W., McMahon M. J., *Obstet. Gynecol.*, 1996, **88**, 593-598.

NIKOLA GARCEA

EMBRIORIDUZIONE

SOMMARIO

Introduzione (col. 2560). - **Tecniche di embrioriduzione** (col. 2561): *Brevi cenni storici*. - *Aspirazione o iniezione transvaginale*. - *Iniezione intracardica o intratoracica di cloruro di potassio per via transaddominale*. - **Risultati** (col. 2564). - **Commento e conclusioni** (col. 2564).

Introduzione

L'incidenza delle g. multiple, che rispetto alle semplici, prima degli anni '60, era molto bassa, ha presentato un netto aumento con l'avvento dei farmaci induttori dell'ovulazione, il clomifene prima e le gonadotropine poi, e, negli anni '80, con l'introduzione delle tecniche di procreazione assistita (ART, *Assisted Reproductive Technologies*) (Groutz *et al.*, 1996; Smith-Levitin *et al.*, 1996; Rådestad *et al.*, 1996; Walters, 1996; Farhi *et al.*, 1996; Wilcox *et al.*, 1996; Nadkarni *et al.*, 1996). Di pari passo ha assunto speciale rilevanza il problema della prevenzione e del trattamento delle varie patologie ostetriche e perinatali cui sono sog-

TAB. IV. RIDUZIONE EMBRIONARIA TRANSADDOMINALE O TRANSVAGINALE

(da Evans *et al.*, 1994, modificata).

Riduzione embrionaria	N.	Embrioni iniziali N.	Embrioni finali	Settimana alla riduzione
Transaddominale	846	3,7 ± 1,0 p < 0,01	2,0 ± 0,5 p < 0,00001	11,3 ± 1,9 p < 0,00002
Transvaginale	238	3,5 ± 1,1	1,7 ± 0,5	9,2 ± 1,8

gette le g. plurifetali (v. sopra il capitolo *gravidanze multi-fetali dopo trattamento della sterilità*).

Negli anni in cui il fenomeno delle g. plurigemellari era naturale ed eccezionale, vi erano due sole alternative per il comportamento medico: la prima era quella di lasciare evolvere naturalmente la g. cercando di ridurre al minimo i danni per la madre e per i feti; la seconda era rappresentata dall'interruzione totale delle g. Negli ultimi 15 anni si è posta una terza possibilità, realizzabile grazie ai progressi dell'ultrasonografia gravidica, e cioè la «riduzione embrionaria selettiva».

Questa consiste nella interruzione parziale di una o più g., per mezzo dell'uccisione fetale con somministrazione di soluzione ipertonica intracardiaca o intratoracica o per fetto-distruzione o suzione (v. dopo), sotto stretto controllo ecografico, tra la 9ª e la 12ª settimana di amenorrea gravidica. La «riduzione embrionaria» usualmente viene ripetuta fino a ridurre la g. plurigemellare a una g. bigemina. In casi particolari, per particolari esigenze o problematiche materne o malformazioni fetali, la g. è stata ridotta a trigenina o a singola (Brambati *et al.*, 1994). Queste tecniche sono abbastanza sicure per la madre. Un certo pericolo esiste per i o il feto residuo che nell'11 o nel 16% dei casi, a seconda che si utilizza la tecnica vaginale o addominale (v. sotto) (Timor-Trisch *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1993), va incontro ad aborto. Tale percentuale di aborti sembra inversamente proporzionale all'esperienza dell'équipe medica (Evans *et al.*, 1994) tanto è vero che molti propongono di indirizzare presso un ristretto numero di centri le g. plurigemellari da sottoporre a tali metodiche (Rådestad *et al.*, 1994). La perdita di tutti i feti, evento di per sé particolarmente doloroso, lo è in modo speciale per la maggior parte di queste coppie che si sono sottoposte a ripetuti e stressanti tentativi di procreazione assistita prima di ottenere il risultato, a lungo agognato, di una g.

Ovviamente in casi di riduzione embrionaria «felicemente» riusciti le complicanze materne o fetali sono minori e paragonabili a quelle di una gravidanza semplice o gemellare.

Tecniche di embrioiduzione

Brevi cenni storici

Il primo pionieristico tentativo di embrioiduzione risale al 1978 quando Aberg *et al.* (1978) riuscirono a «ridurre» un feto di una g. gemellare affetto da morbo di Hurler, salvando il fratello sano, per mezzo di puntura cardiaca e dis-sanguamento del gemello ammalato.

Nel 1981 è stata proposta l'embolizzazione con aria iniettata nel cuore fetale (Petrus e Redwine, 1981) e questo è stato riproposto anche in anni successivi (Redwine e Hays, 1986). Altri tentativi sono stati effettuati con embolizzazione di aria nella vena ombelicale sotto guida fetoscopica (Rodeck *et al.*, 1982; Rodeck, 1984) o con iniezione intracardiaca di formaldeide (Rodeck *et al.*, 1982) e di calcio gluconato (Antasklis *et al.*, 1984).

Dagli anni '80, però, due metodiche si sono affermate e sono la tecnica transvaginale e quella transaddominale ed ancora oggi è difficile stabilire quale presenti i maggiori vantaggi (Evans *et al.*, 1994; Maymon *et al.*, 1995).

Aspirazione o iniezione transvaginale

La prima segnalazione di embrioiduzione per aspirazione embrionaria parziale transvaginale e transcervicale è stata effettuata nel 1983 (Martene-Duplan *et al.*, 1983). Essa ha trovato inizialmente scarsi seguaci (Dumez e Oury, 1986; Salat-Baroux *et al.*, 1988; Dommergues *et al.*, 1991) perché si accompagnava a perdite di tutte le g. nel 50% dei casi (Bronsteen e Evans, 1989). È stata perciò abbandonata e sostituita dalla iniezione transaddominale di cloruro di potassio sotto controllo ecografico. Più recentemente è stata ripresa in alcuni centri con elevata esperienza di ecografia transvaginale e di fecondazione *in vitro* e si è sviluppato un sistema caricato a molla, per l'iniezione transvaginale automatica di KCl e la distruzione meccanica dell'embrione (Timor-Trisch *et al.*, 1993). Tale metodo di solito è applicato in epoche più precoci di g. (tab. IV) (Evans *et al.*, 1994; Maymon *et al.*, 1995).

Iniezione intracardiaca o intratoracica di cloruro di potassio per via transaddominale

La tecnica prevede l'inserzione transaddominale, sotto guida ultrasonografica, di un ago spinale di solito di 22 gauge. L'addome è disinfettato e preparato come per un'amniocentesi.

L'ago viene infilato in modo che esso sia diretto e perpendicolare al torace fetale. La posizione viene controllata ecograficamente secondo piani longitudinali e trasversali e quando si è sicuri di essere vicini al torace fetale si infila rapidamente l'ago nel torace. Se la puntura viene eseguita lentamente, il feto per riflesso si sposta o gira su se stesso e tutta la procedura di allineamento deve essere completamente rifatta. L'ideale è iniettare il cloruro di potassio nel cuore fetale, eventualmente nel torace fetale. Se invece il KCl viene iniettato per errore sotto il diaframma può non aversi la morte fetale ed è necessario ripetere l'operazione. L'insuccesso di solito si verifica nell'1% delle procedure e usualmente all'inizio dell'esperienza (Evans *et al.*, 1994).

Una volta che si è sicuri di essere nel cuore o nel torace fetale si rimuove il mandrino dell'ago e questo si collega con una siringa di 3 ml contenente il KCl. Se ne iniettano circa 0,5 ml pari a 2 o 3 mEq di KCl. Entro 1-2 min il battito cardiaco si arresta. Può succedere che il cuore continui a pulsare con una frequenza ridotta e, in tal caso, di solito dopo alcuni minuti avviene l'arresto definitivo. Bisogna controllare l'asistolia del cuore fetale per almeno 3 minuti prima di togliere l'ago (Berkowitz *et al.*, 1996).

Per la embrioiduzione si scelgono gli embrioni che sembrano peggiori (con oligoamnios, con malformazioni, più piccoli, etc.) o i più vicini alla parete addominale o al fondo dell'utero (Berkowitz *et al.*, 1996). Quando si uccidono gli

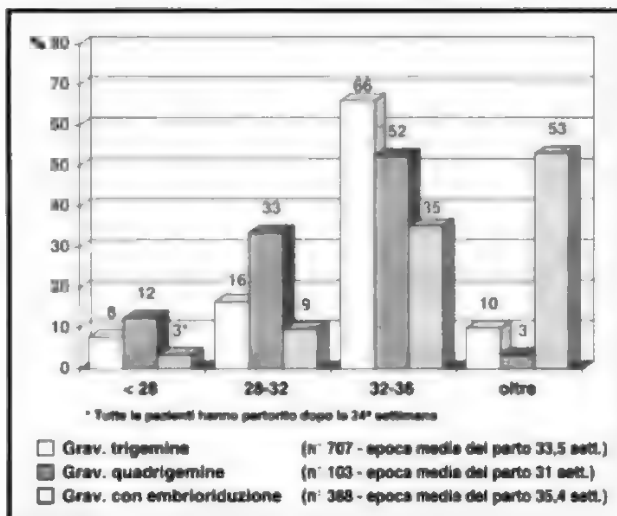


Fig. 6. Esito delle g. trigemine e quadrigemine non sottoposte ad embrioiduzione, confrontate a quelle sottoposte a tale metodica. (Ottenuta dai dati riportati da Berkowitz *et al.*, 1996).

embrioni più vicini alla cervice, come avviene con la tecnica precedente, è possibile avere delle perdite ematiche. È pericoloso rimuovere il liquido amniotico perché la brusca riduzione del volume dell'utero che ne consegue può determinare l'insorgenza di contrazioni uterine e un aborto totale. Anche per questo motivo, quando l'embrioiduzione riguarda gravidanze con 7-8 feti, di solito viene effettuata in due tempi con l'intervallo di una settimana (Evans *et al.*, 1992).

Il tempo medio per eseguire la riduzione embrionaria varia con il grado di «collaborazione» della paziente e dei feti e con l'esperienza dell'operatore. In casi fortunati e con operatori di larga esperienza, in 30 min è possibile ridurre una gravidanza con 7 feti in una gravidanza con 2 feti; altre volte in 30 min si riesce a «ridurre» un solo embrione (Evans *et al.*, 1992).

La tecnica transaddominale usualmente viene effettuata verso la 10ª-12ª settimana di gravidanza (tab. IV) perché in questa epoca l'esecuzione è tecnicamente più facile. Inoltre entro la 12ª settimana si verificano molti aborti spontanei che potrebbero rendere inutile l'embrioiduzione. Infine, l'occasionale perdita dell'embrione o degli embrioni lasciati vivi è più rara (Berkowitz *et al.*, 1996).

È opinione comune degli operatori che praticano la tecnica di embrioiduzione che è opportuno lasciare sopravvivere 2 embrioni, per evitare che poi, per un aborto spontaneo, non si abbia nemmeno la nascita di un bambino (Evans *et al.*, 1994).

Tuttavia molti ritengono utile effettuare l'embrioiduzione solo nelle g. con un numero di feti superiore a tre. Infatti nella fig. 6, costruita dai dati di più autori riportati da Berkowitz *et al.* (1996), appare evidente che il parto delle g. trigemine avviene per il 76% tra la 32ª settimana e il termine di g., mentre nelle g. con embrioiduzione il parto in questo intervallo di tempo si verifica nell'88% delle g. In centri con una buona assistenza neonatale i bambini nati a quest'epoca di g. usualmente hanno una scarsissima morbosità e una mortalità praticamente assente.

Ma non tutti condividono questa opinione e consigliano l'embrioiduzione anche in caso di g. trigemine (Smith-Levitin *et al.*, 1996; Mantzavinos *et al.*, 1996). In studi di confronto diretto, i primi propugnano l'embrioiduzione

anche in caso di gravidanze trigemine perché sembra che la mortalità perinatale e la morbosità a breve termine sia maggiore nei bambini nati da g. trigemine non «ridotte» (Boulot *et al.*, 1993; Lipitz *et al.*, 1994; Maccones *et al.*, 1993; Porreco *et al.*, 1991), mentre in quelle ridotte la durata della g. è maggiore e quindi il grado di prematurità fetale con le relative complicanze è minore (Haning *et al.*, 1996).

Tuttavia si tratta di casistiche scarse e non ancora esaurienti.

Inoltre sembra che l'embrioiduzione non renda reversibile completamente la tendenza alla nascita prematura dei feti superstiti e il loro ridotto peso al parto. Quest'ultimo sembra non sia correlabile con il peso dei bambini di pari età gestazionale ma nati da g. che non abbiano subito l'embrioiduzione (Alexander *et al.*, 1995; Depp *et al.*, 1996). Tuttavia più recenti casistiche, anche se altrettanto limitate, dimostrerebbero che l'esito delle g. trigemine ridotte a bigemine non differisca sostanzialmente da quello delle g. originariamente bigemine (Lipitz *et al.*, 1996).

Risultati

Viene considerata soddisfacente una nascita di bambini vivi nell'80% delle donne sottoposte ad embrioiduzione (Rådestad *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1992). Nella esperienza multicentrica riportata da Evans *et al.* (1994), gli aborti tardivi dei feti lasciati vivi si verificano nel 13,1% delle riduzioni embrionarie praticate per via vaginale e nel 16,2% di quelle addominali nei primi anni di esperienza delle *équipe*. Quando i medici hanno acquistato una maggiore pratica, l'incidenza di aborti totali dopo embrioiduzione effettuata per via transaddominale è scesa all'8,8%, o meno. Essa sembra direttamente proporzionale al numero dei feti ridotti (Evans *et al.*, 1994; Berkowitz *et al.*, 1996). Però forse non tutti questi aborti sono imputabili soltanto alla tecnica di riduzione embrionaria poiché la maggior parte di essi si verificano dopo un intervallo dall'embrioiduzione di più di 8 settimane (Berkowitz *et al.*, 1996).

Uno dei principali motivi per l'esecuzione della riduzione della g. multipla è la prevenzione della prematurità con la sequela della morbosità e della mortalità che ne consegue o dei danni cerebrali permanenti. L'esperienza multicentrica di embrioiduzioni di Evans *et al.* (1994) eseguite su 1.074 donne è riportata nella fig. 7. Nell'84% dei casi la g. raggiunge o supera la 33ª settimana e questo significa sopravvivenza di questi neonati in buone condizioni di salute quasi nella totalità dei casi.

I risultati peggiori in termine di prematuranza si hanno nelle g. multigemellari con maggior numero di feti, anche se la embrioiduzione è stata effettuata con successo. Solo se il numero finale di embrioni è molto contenuto allora l'epoca del parto è indipendente dal numero di partenza dei feti.

L'incidenza delle malformazioni è dell'1%, simile se non inferiore a quella della popolazione normale.

La preeclampsia si verifica mediamente nell'1% delle pazienti (Evans *et al.*, 1994) e patologie coagulatorie gravi, quale la CID (coagulazione intravascolare disseminata [v.*]), non sono ancora riportate in letteratura.

L'uso della metodica transaddominale o transvaginale (fig. 7) non sembra determinante ai fini dei risultati finali, per cui ogni clinico deve utilizzare quella tecnica in cui ha più pratica e si sente più sicuro (Lipitz *et al.*, 1994).

Commento e conclusioni

Le g. multifetali sono una conseguenza di un uso improprio dei farmaci induttori dell'ovulazione e delle tecniche di procreazione assistita. È necessario che i medici che praticano le terapie della fertilità tengano sempre in debita

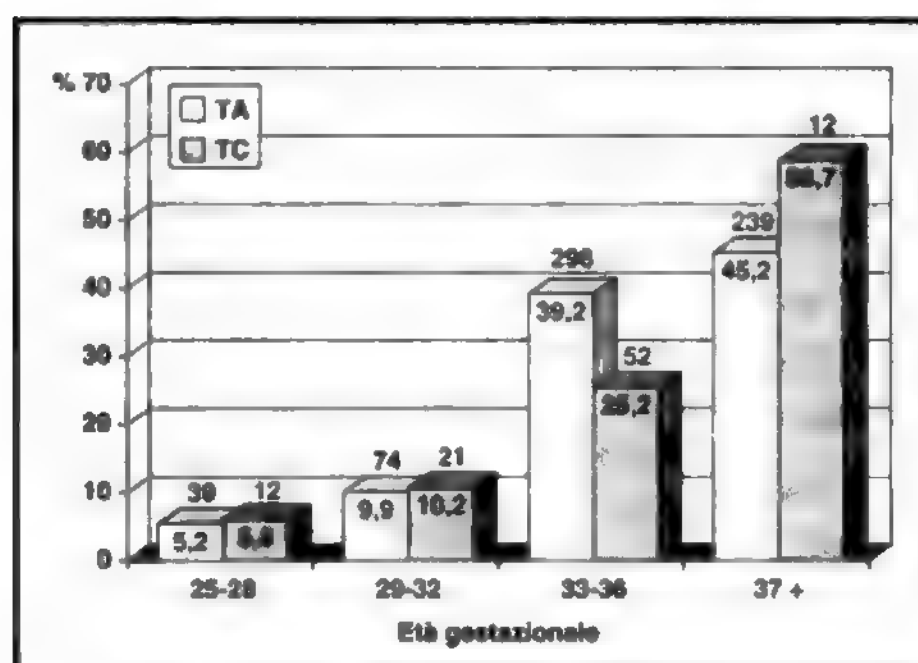


Fig. 7. Istogramma dell'età gestazionale al momento del parto delle g. soggette a embrioriduzione. Il numero dei casi è riportato nella parte superiore di ogni colonna e la percentuale all'interno. TA) transaddominale; TC) transcervicale. (Da Evans et al., 1994, modificata).

considerazione il rischio di g. multigemellari e si attengano a quei parametri di sicurezza ormai da anni standardizzati. Tuttavia non sempre può essere previsto con esattezza il rischio di g. multifetali (Ben-Nun et al., 1993) ed esse in casi particolari possono essere conseguenza di una risposta esagerata, spesso su base ereditaria, della donna alle terapie effettuate con molta circospezione. Questi casi sono rari e non fanno storia e spesso possono essere risolti in modo naturale e fisiologico (Garcea e Sgreccia, 1984). In effetti sarebbe necessario interrompere l'induzione dell'ovulazione quando ci si accorge che l'ovaio ha una risposta vivace ed esagerata allo stimolo ovulatorio. In caso di FIV-ET o di ICSI (v. FECONDAZIONE ASSISTITA**) non bisognerebbe riporre in utero più di 3 embrioni se non meno (Staessen et al., 1995; Nijs et al., 1993; Cohen, 1991) o, in caso di GIFT, più di 3 ovociti insieme agli spermatozoi dentro le tube. Infine si dovrebbe accettare il rischio di una g. plurigemellare quando occasionalmente questa insorge dopo ripetuti tentativi terapeutici.

Non si può essere d'accordo con terapie estremamente aggressive effettuate per le tecniche di procreazione assistita, con conseguente elevata incidenza di g. pluriembrionali e con la previsione dell'esecuzione dell'embrioriduzione come parte integrante di un programma terapeutico senza considerare le conseguenze mediche, etiche e psicologiche sulle pazienti (Ayers et al., 1991; Lipitz et al., 1994). Tale modo di pensare è stato recentemente condannato anche dalla Commissione Etica della Società Americana di Medicina Riproduttiva (Ethics Committee of the American Fertility Society, 1990).

Alcuni studi hanno dimostrato l'impatto psichico che consegue a interventi di embrioriduzione per cui spesso è necessario un adeguato sostegno psicologico delle donne (Schreiner-Engel et al., 1995).

Ma è il problema etico che spaventa. Il medico, al di là del suo credo religioso, usualmente cerca di salvare e conservare la vita, non di distruggerla. Ci si chiede allora come possa essere accettabile sul piano della deontologia medica il sacrificio di feti vivi e presumibilmente sani per aumentare presuntivamente il potenziale di vita e di salute di altri feti? Si potrebbe pensare che una società che accetta l'aborto non necessita di ulteriori giustificazioni di carattere etico. Ma l'aborto terapeutico o l'interruzione volontaria di

gravidenza — a stretti termini di legge — si presentano con una motivazione medica tesa ad eliminare una patologia in atto, fosse anche psichica. Questo non significa che perciò l'aborto, da un punto di vista etico, sia pure con tale motivazione, sia lecito. Qui invece l'azione « terapeutica » viene effettuata per una ipotetica previsione di malattia, non sempre grave o irrisolvibile.

Ancora più grave è l'atto se si considera la « riduzione » di g. gemellari in g. semplici o di trigemine in g. gemellari o semplici. In quest'ultimo caso non sembrano molto valide le motivazioni mediche della riduzione embrionaria (Santema et al., 1995; Goldfarb et al., 1996), specie se si ricorda che il 10-20% delle embrioriduzioni finisce con l'interruzione di tutte le g. in coppie che da anni cercano un figlio e senza nessuna garanzia di un nuovo risultato favorevole in ulteriori tentativi terapeutici.

Una sola motivazione è possibile trovare nell'etica laica alla embrioriduzione: e cioè è stato ed è un atto necessario dettato da un particolare momento storico, in cui l'esplosione dell'uso spesso non prudente e ancora non perfettamente conosciuto dei farmaci induttori dell'ovulazione e delle tecniche di procreazione assistita hanno determinato l'insorgenza di un fenomeno innaturale, quale è la g. plurigemellare, per la quale nei casi più eclatanti non si è trovata altra possibilità terapeutica. Tuttavia questo « presidio terapeutico » dovrebbe, entro breve tempo, diventare desueto grazie ad una sana prevenzione realizzata dalla ormai perfetta conoscenza e padronanza delle terapie adoperate e dalla prudenza nella esecuzione delle tecniche di procreazione assistita, in cui non si dovrebbe consentire la riposizione in utero di più di 3 embrioni se non addirittura meno (Lipitz et al., 1994; Nijs et al., 1993). Si avrebbe così al massimo un piccolo numero di gravidanze trigemine (salvo occasionali fenomeni di divisione omozigote degli embrioni riposti [Wenstrom et al., 1993]) che possono essere condotte con molta prudenza anche felicemente ad epoca avanzata e sicura di gestazione, e quindi a un felice parto conclusivo.

Bibliografia

- Aberg A., Mitelman F., Cantz M., Gehler J., *Lancet*, 1978, II, 990-991.
 Alexander J. M., Hammond K. R., Steinkampf M. P., *Fertil. Steril.*, 1995, 64, 1201-1203.
 Antasklis A., Politis J., Karagiannopoulos C., Kaskarelis D., *Prenat. Diagn.*, 1984, 4, 289-296.
 Ayers J. W. Y., Petersen E. P., Knight L., Petersen S., *Fertil. Steril.*, 1991, 56, 5173.
 Ben-Nun I., Cohen I., Shulman A. et al., *Fertil. Steril.*, 1993, 60, 781-785.
 Berkowitz R. L., Lynch L., Stone J., Alvarez M., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, 174, 1265-1272.
 Boulot P., Hedon B., Pelliccia G. et al., *Fertil. Steril.*, 1993, 60, 497-503.
 Brambati B., Formigli L., Mori M., Tului L., *Hum. Reprod.*, 1994, 4, 746-749.
 Bronsteen R. A., Evans M. I., *Multiple gestation*, in Evans M. I., Fletcher J. C., Dixler A. O. et al., *Fetal diagnosis and therapy: Science, Ethics and the Law*, 1989, Lippincott, Philadelphia.
 Cohen J., *Hum. Reprod.*, 1991, 6, 613-618.
 Depp R., Macones G. A., Rosenn M. F. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, 174, 1233-1240.
 Dommergues M., Nisand I., Mandelbrot L. et al., *Fertil. Steril.*, 1991, 55, 805-811.
 Dumer Y., Oury J. F., *Contrib. Gynecol. Obstet.*, 1986, 15, 50.
 Ethics Committee of the American Fertility Society, *Fertil. Steril.*, 1990, 53, 6.
 Evans M. I., Littman L., Kings M., Fletcher J. C., *Clinics and Perinatology*, 1992, 19, 345.
 Evans M. I., Dommergues M., Wapner R. J. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1993, 82, 61.
 Evans M. I., Dommergues M., Timor-Tritsch I. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 170, 902-909.

GRAVIDANZA

- Farhi J., West C., Patel A., Jacobs H. S., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 429-434.
- Garcea N., Sgreccia M., *Minerva Ginecologica*, 1984, **36**, 299.
- Goldfarb J., Kinzer D. J., Boyle M., Kurit D., *Fertil. Steril.*, 1996, **65**, 815-820.
- Groultz A., Yovel I., Amit A. et al., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 1334-1336.
- Haning R. V., Seifer D. B., Wheeler C. A. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1996, **87**, 964-968.
- Lipitz S., Mashlach S., Seidman D. S., *Hum. Reprod.*, 1994, **11**, 1978-1979.
- Lipitz S., Reichman B. N., Uval J. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, **170**, 874-879.
- Lipitz S., Yaron Y., Shalev J. et al., *Fertil. Steril.*, 1994, **61**, 59-61.
- Lipitz S., Uval J., Achiron R. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1996, **87**, 511-514.
- Macones G. A., Schemmer G., Pritts E. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, **169**, 982-986.
- Mantzavinos T., Kanakas N., Dimitriadou F. et al., *Clin. Exp. Obst. Gyn.*, 1996, **XXIII** (1), 48-50.
- Martens-Duplan J., Aknin A. J., Alamowitch R., *Contracept. Fertil. Sexual.*, 1983, **11**, 745-748.
- Maymon R., Herman A., Shulman A. et al., *Hum. Reprod.*, 1995, **10**, 668-673.
- Nadkarni P., Shrivastav P., Bharath M., Craft L., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 655-659.
- Nijs M., Geerts L., van Roosendaal E. et al., *Fertil. Steril.*, 1993, **59**, 1245-1250.
- Petres R., Redwine F., *N. Engl. J. Med.*, 1981, **305**, 1218-1219.
- Porreco R. P., Shannon Burke M., Hendrix M. L., *Obstet. Gynecol.*, 1991, **78**, 335.
- Rådestad A., Bui T. H., Nygren K. G., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1994, **73**, 403-406.
- Rådestad A., Bui T. H., Nygren K. G. et al., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1996, **75**, 651-653.
- Redwine F. O., Hays P., *Semin. Perinatol.*, 1986, **10**, 73-81.
- Rodeck C. H., Mibashan R. S., Abramowicz J., Campbell S., *Prenat. Diag.*, 1982, **2**, 189-194.
- Rodeck C. H., *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 1984, **33**, 57-60.
- Salat-Baroux J., Aknin J., Antoine J. M., Alamowitch R., *Hum. Reprod.*, 1988, **3**, 399-401.
- Santema J. G., Bourdrez P., Wallenburg H. C. S., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1995, **60**, 143-147.
- Schreiner-Engel D., Walther V. N., Mindes J. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, **172**, 541.
- Smith-Levitin M., Kowalik A., Birnholz J. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, **175**, 878-882.
- Staessen C., Nagy Z. P., Liu J. et al., *Hum. Reprod.*, 1995, **10**, 3305-3312.
- Timor-Trisch I. E., Peisner D. B., Monteagudo A. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, **168**, 799-804.
- Walters D. E., *Hum. Reprod.*, 1996, **11**, 10-12.
- Wenstrom K. D., Syrop C. H., Hammatt D. G., Van Voorhis B. J., *Fertil. Steril.*, 1993, **60**, 510-514.
- Wilcox L. S., Kiely J. L., Melvin C. L., Martin M. C., *Fertil. Steril.*, 1996, **65**, 361-366.

NICOLA GARCEA

GUILLAIN-BARRÉ, SINDROME DI [v. vol. VII, coll. 955-964; Agg. I, coll. *3513-3518]

SOMMARIO

Trattamento generale (col. 2568): *Insufficienza respiratoria*. - *Disfunzioni autonome*. - **Immunoterapia e plasmateresi** (col. 2568): *Steroidi*. - *Plasmateresi*. - *Immunoglobuline E.V. (IGEV)*.

La sindrome di Guillain Barré [s. G.-B.] è una poliradiculoneurite acuta che in circa il 60% dei casi è preceduta da episodi infettivi acuti generici per lo più a carico delle vie respiratorie. Altre volte la malattia compare dopo specifiche infezioni virali (virus di Epstein-Barr, Citomegalovirus, HIV), interventi chirurgici toracici, addominali, intracranici, artroscopici ed interventi ortopedici con possibile danno del plexus nervoso. È stato inoltre segnalato che precedenti infezioni da *Campylobacter jejuni* (Rhodes e Tattersfield, 1989) e *Campylobacter jejuni* (Rhodes e Tattersfield, 1989) sono state associate a casi di s. G.-B., in particolare per quanto riguarda il tipo di batterio

gram-negativo) si verifica con una frequenza che varia dal 12 al 60% dei casi di s. G.-B. (Yuky et al., 1990).

Trattamento generale

I pazienti allettati sono particolarmente inclini ad infezioni nosocomiali (tracheobronchiti, polmoniti, infezioni urinarie e più raramente sepsi) e trombosi venose agli arti con possibile embolia polmonare; pertanto l'uso precoce di antibiotici e anticoagulanti (eparina calcica 5000 U. s.c. ogni 12 ore) possono adeguatamente prevenire le suddette complicanze. Una corretta assistenza e mobilizzazioni passive possono inoltre impedire lesioni da compressione su nervi già compromessi (Ravn, 1967).

Insufficienza respiratoria

È una temibile complicanza in corso di s. G.-B.; particolarmente utili a questo proposito sono da ritenersi i criteri che Ropper ha definito per l'ammissione in terapia intensiva per la respirazione artificiale. I pazienti devono essere intubati se la capacità vitale scende sotto i 12-15 mL/kg e l'emogasanalisi indica $\text{PaO}_2 < 80 \text{ mEq/L}$, $\text{PaCO}_2 < 45 \text{ mEq/L}$. In presenza di paralisi bulbare si deve procedere ad intubare già con una capacità vitale tra i 15-18 mL/kg.

Disfunzioni autonome

Disturbi a carico del S.N. vegetativo sono comuni anche se soltanto occasionalmente sono correlati al decesso. I più frequenti sono la tachicardia sinusale, la ritenzione urinaria, le crisi ipertensive, l'ipotensione ortostatica e l'ileo paralitico. In genere tendono a risolversi spontaneamente per cui in casi di ipotensione l'infusione di liquidi dovrebbe essere sufficiente e comunque preferibile alla somministrazione di simpatico-mimetici che dovrebbe essere evitata. Gravi stati ipertensivi e ridotte variazioni nell'intervallo P-R possono precedere gravi aritmie e comunque il riscontro di episodi di blocco AV di 2° e 3° e severe bradicardie devono suggerire il posizionamento temporaneo del *pacemaker* a richiesta (Pace, 1976).

Immunoterapia e plasmateresi

Nella tab. I sono riportati i risultati dei recenti *trials* clinici sul trattamento della s. G.-B.

Steroidi

L'uso degli steroidi non risulta più raccomandato nel trattamento della poliradiculoneurite acuta secondo i più recenti *trial* randomizzati tra i quali quello condotto da Hughes in doppio cieco che prevedeva l'uso di 250 mg c.v. di metilprednisolone/die per cinque giorni e quello condotto dal GBS Steroid Trial Group che prevedeva l'impiego di 500 mg c.v. di metilprednisolone associato o meno a plasmateresi versus placebo associato o meno a plasmateresi.

Plasmateresi

Successivamente ai primi positivi risultati riportati in letteratura da Brettle e colleghi nel 1978 circa l'uso della plasmateresi nella s. G.-B., numerosi altri gruppi di studio hanno ottenuto discreti successi mediante il trattamento aferetico entro le due settimane dall'esordio. Lo schema abitualmente utilizzato è costituito da una serie di 3-5 scambi (40-50 mL/kg di peso corporeo/die) a giorni alterni (Bosch e Mitsumoto, 1991). Fattori umorali implicati nella patogenesi della s. G.-B., quali anticorpi diretti contro componenti della mielina del nervo periferico, citochine, componenti del complemento ed altri mediatori dell'infiamma-

TAB. I. TRATTAMENTO DELLA SINDROME DI GUILLAIN-BARRÉ: REVISIONE DEI RECENTI TRIALS CLINICI

Autori	Numero pazienti	Trattamento	Risultati
French Cooperative Group, 1987	220	Plasmaferesi <i>versus</i> Terapia convenzionale	Superiorità della plasmaferesi
van der Meché e Schmitz (Dutch GBS Study Group), 1992	147	Immunoglobuline e.v. <i>versus</i> Plasmaferesi	Pari efficacia
GBS Steroid Trial Group, 1993	242	Steroide +/- Plasmaferesi <i>versus</i> Placebo +/- Plasmaferesi	Nessuna significativa differenza

zione, risultano palesemente ridotti dopo trattamento afe-retico; le eventuali rapide ricadute che si verificano con frequenza dal 6% al 11% dei casi tra i 12 e 30 giorni dopo il primo trattamento (French Cooperative Group, 1987) (Kleyweg e van der Meché, 1991) e che possono agevolmente essere controllate da nuovi cicli di plasmaferesi, sono correlate ad un alto titolo di anticorpi anti-mielina quale probabile risultato *rebound* (Uhr e Moller, 1968). In considerazione delle complicanze (tab. II) la plasmaferesi dovrà essere evitata in caso di disturbi del Sistema Nervoso Vegetativo e di stati settici.

Immunoglobuline E.V. (IGEV)

In seguito ad un preliminare studio sull'efficacia nella s. G.-B. dell'infusione venosa di alte dosi di immunoglobuline G (Kleyweg *et al.*, 1988), van der Meché e Schmitz (1992) hanno confermato l'utilità del trattamento con immunoglobuline e.v. (400 mg/kg/die per cinque giorni) giudicandolo di efficacia pari e probabilmente superiore alla plasmaferesi. È però utile a questo proposito sottolineare che da una attenta analisi del suddetto lavoro emerge che i pazienti sottoposti a plasmaferesi risultavano più anziani e trattati mediamente un giorno più tardi rispetto a quelli che avevano ricevuto le IGEV. Il meccanismo attraverso il quale sembra dimostrarsi l'efficacia delle IGEV non risulta al momento del tutto chiaro; probabile sono la neutralizzazione di citochine patogene, il blocco del recettore Fc e l'immunoregolazione dei linfociti B e T. Cautela deve tuttavia essere mantenuta circa la preferenza delle IGEV rispetto alla plasmaferesi, considerando anche l'alta incidenza di ricadute e/o peggioramenti (Castro e Ropper, 1993; Irani *et al.*, 1993). Le IGEV non devono essere somministrate in caso di scompenso cardiaco, alterazione dei parametri di funzionalità renale (Tan *et al.*, 1993) ed in pazienti con immuno-

deficienza di IgA e/o presenza di anticorpi anti-IgA (Thorn-torn e Ballow, 1993).

Infine, le IGEV non sono prive di effetti indesiderati (tab. II) quali ad es. iperpiressia, reazione meningeale, rachialgie, tachicardia, attacchi emicranici e ischemici cerebrali (Costantinescu *et al.*, 1993; Dalakas, 1994).

In conclusione è utile ricordare che soltanto il 50% circa dei pazienti affetti da s. G.-B. trae beneficio dal trattamento di plasmaferesi o dalla somministrazione e.v. di immunoglobuline G, poiché esiste una restante percentuale che sviluppa un severo danno assonale. Sono in corso *trials* che prevedono l'impiego combinato di plasmaferesi e IGEV.

In futuro l'immunoterapia della s. G.-B. potrà anche prevedere l'uso singolo o combinato di citochine (ad es. IL-10) anticorpi anti-citochine infiammatorie (es. anti TNF- α), anti-recettori solubili delle citochine, etc.

Bibliografia

- Bosch E. P., Mitsumoto H., *Neurology in clinical practice*, 1991, Butterworth - Heinemann, Boston.
 Brettle R. P., Gross M., Legg N. J. *et al.*, *Lancet*, 1978, 2, 1100.
 Castro L. H., Ropper A. H., *Neurology*, 1993, 43, 1034.
 Costantinescu C. S., Chang A. P., McCluskey L. F., *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 583.
 Dalakas M. C., *Neurology*, 1994, 44, 223.
 French Cooperative Group on Plasma Exchange in GBS, *Ann. Neurol.*, 1987, 22, 753.
 GBS Steroid Trial Group, *Lancet*, 1993, 341, 586.
 Hughes R. A. C., *Lancet*, 1991, 338, 1142.
 Irani D. N., Cornblath D. R., Chaudhary V. *et al.*, *Neurology*, 1993, 43, 872.
 Kleyweg R. P., van der Meché F. G. A., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1991, 54, 957.
 Kleyweg R. P., van der Meché F. G. A., Meulstee J., *Neurology*, 1988, 38, 1639.
 Mancardi G. L., Del Sette M., Primavera A., Farinelli M., Fumarola D., *Lancet*, 1989, 21, 285.

TAB. II. IMMUNOTERAPIA NELLA SINDROME DI GUILLAIN-BARRÉ E NELLA POLIRADICOLONEURITE DEMIELINIZZANTE CRONICA

	Plasmaferesi	Immunoglobuline E.V.
Efficacia certa	Sindrome di Guillain-Barré Poliradicoloneurite demielinizzante cronica	Sindrome di Guillain-Barré
Efficacia probabile		Poliradicoloneurite demielinizzante cronica
Complicanze comuni	Ipotensione, reazione ai citrati	Cefalea, febbre, mialgie, tromboflebiti superficiali
Complicanze meno comuni	Aritmie cardiache, sepsi del catetere venoso, trombosi venosa	Reazione meningeale, insufficienza renale ipotensione, reazioni anafilattiche, emolisi, infarto cerebrale e del miocardio
Limiti	Disponibilità, stati ipotensivi, accesso venoso difficile	Insufficienza renale, deficit di IgA, scompenso cardiaco

GUILLAIN-BARRÉ

- N. L., *Arch. Neurol.*, 1976, **33**, 374.
 Ravn H., *Acta Neurol. Scand.*, 1967, **43** (Suppl. 30), 1.
 Rhodes K. M., Tattersfield A. E., *Br. Med. J.*, 1982, **285**, 173.
 Ropper A. H., Wijdicks E. F. M., Truax B. T., *Guillain Barré Syndrome*, 1991, Davis F. A., Philadelphia.
 Tan E., Hajnazarian M., Bay W. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 1993, **50**, 137.
 Thornton G. A., Ballou M., *Arch. Neurol.*, 1993, **50**, 135.
 Uhr J. W., Moller G., *Adv. Immunol.*, 1968, **8**, 81.
 van der Meché F. G. A., Schmitz P. I. M., Dutch GBS Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326** (17), 1123.
 Yuki N., Yoshino H., Sato S., Miyatake T., *Neurology*, 1990, **40**, 1900.
 Yuki N., Taki T., Takahashi M. *et al.*, *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 2101.

MARCELLO FARINELLI E ANTONINO LEONARDI

HAEMOPHILUS GENERE [v. vol. VII, coll. 985-989; Agg. I, coll. *3519-3522]

SOMMARIO

Patologia da *Haemophilus influenzae* (col. 2573): *Epidemiologia*. - *Meningite*. - *Profilassi*.

Le più importanti e recenti acquisizioni scientifiche relativamente ai membri del genere *Haemophilus* riguardano proprio la specie principe, cioè *H. influenzae*, particolarmente nella sua interazione con l'uomo. Esse consistono in pratica in un approfondimento notevole delle conoscenze, sia sotto l'aspetto clinico-patogenetico che per quello epidemiologico, sulla patologia umana sostenuta da tale schizomicete, nonché nelle migliorate prospettive di prevenzione della forma clinica più grave e diffusa ad esso riferibile, cioè la meningite.

Patologia da *Haemophilus influenzae*
Epidemiologia

H. influenzae è patogeno esclusivamente per l'uomo. Gli stipiti non capsulati possono sostenere nell'infanzia e in adulti immunocompromessi forme superficiali a carico di mucose (sinusite, otite media, bronchite, etc.), ma solo raramente sono in causa quali agenti dell'infezione invasiva setticemica, assai frequente nei neonati, soprattutto immaturi, sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati. Ciò dimostra l'importanza, da tempo nota, della capsula come fattore d'invasività, tanto che l'azione protettiva degli anticorpi anticapsulari è stata alla base della sieroterapia in epoca preantibiotica ed è oggi premessa per gli interventi più moderni di immunoprofilassi specifica.

Il tipo capsulare b rappresenta di gran lunga quello più virulento; esso è oggi riconosciuto, in assoluto, come il batterio più spesso in causa nelle infezioni invasive dell'età pediatrica, sostenendo del resto da solo il 90-95% della globale patologia infettiva da emofili: questa si estrinseca, in particolare, nella grave meningite batterica suppurativa, con frequenza almeno superiore al 50% dei casi, oppure in

altre impegnative forme cliniche, quali epiglottiti, polmoniti, pericarditi, celluliti, artriti, empiemi ed osteomieliti, oltreché in evoluzione setticemica pura.

Almeno l'85% dei casi sostenuti dal tipo sierologico b (Hib) si verificano in soggetti di età inferiore ai 5 anni e più del 65% nei primi due anni d'età, con particolare incidenza tra i 6 ed i 16 mesi di vita. Assai meno importanti risultano invece i ceppi provvisti di capsula diversa dal tipo b.

Elevata (80%) è la frequenza dello stato di portatore asintomatico nel tratto respiratorio superiore, specialmente in età infantile e soprattutto per ceppi non capsulati; ancora più alta può essere nei bambini che frequentano istituzioni come gli asili nido e le scuole materne, tra i quali anche l'Hib è presente in percentuali di solito inferiori al 5%. La colonizzazione può persistere per mesi; ad essa consegue la trasmissione interumana per goccioline (*droplet nuclei*) o contatto diretto con le secrezioni. Benché la patogenesi della forma invasiva sia ancora da definire, sembra probabile che essa presupponga l'invasione del torrente ematico a partire dalla localizzazione nasofaringea. L'emocoltura, peraltro, non sempre è positiva.

La malattia invasiva da *H. influenzae* è compresa, in U.S.A., tra quelle notificabili al NNDSS (*National Notifiable Diseases Surveillance System*), dal 1991.

Meningite

È la più frequente tra tutte le meningiti batteriche suppurative del bambino, fatti salvi i periodi epidemici di quella meningococcica dalla quale, come peraltro da quella pneumococcica, non è facilmente distinguibile clinicamente. Essa presenta stagionalità bifasica con due picchi ad ottobre-novembre e a marzo-aprile, differenziandosi in ciò dalle altre due principali meningiti batteriche che mostrano un unico picco a gennaio-marzo.

Gli studi epidemiologici più accurati sono stati condotti in U.S.A., nel Regno Unito e nei Paesi scandinavi, nei quali ultimi l'incidenza appare più bassa che in U.S.A. e più spostata verso età superiori a quella di 3 mesi/3 anni. Dai pochi studi relativi ai Paesi in via di sviluppo l'incidenza, pur sottostimata, appare almeno uguale a quella degli U.S.A.

Molto scarsi sono i dati epidemiologici concernenti la situazione italiana, rilevati specialmente in Lombardia ed in Toscana: da essi emerge, peraltro, l'importante ruolo etiological dell'Hib, rispetto ad altri batteri, come causa di meningite e di broncopolmonite nel bambino. Da varie parti, del resto, viene prospettato che l'epidemiologia delle infezioni invasive da Hib in Italia ricalchi sostanzialmente quella di altri Paesi europei industrializzati ed in particolare quella del Regno Unito ove, prima dell'introduzione della vaccinazione anti-Hib nella schedula di immunizzazione routinaria risalente all'Ottobre '92, si verificavano circa 1300 casi annui, dei quali 900 meningiti.

Per quanto emerge dai primi recenti dati del *Sistema di sorveglianza nazionale delle meningiti batteriche* attivato dal nostro Ministero della Sanità, risulta che nel 1994 le meningiti ad etiologia accertata da Hib assommano a 85 casi (quasi il 70% nel primo biennio di vita), su un totale di 631 meningiti batteriche (134 delle quali a etiologia non ulteriormente precisata); i dati sono peraltro incompleti e sussistono motivi per ipotizzare un'incidenza ben più elevata, specialmente in alcune regioni.

La morbosità risulta molto elevata in alcune popolazioni native di Continenti diversi, come ad es. gli Eschimesi dell'Alaska, i Navajos e gli Inuits nord-americani e gli Aborigeni australiani, per le quali è stato valutato un rischio superiore alla norma, da 4 a 20 volte. Tra i fattori di rischio, oltre l'età (massima incidenza tra 6 e 11 mesi mentre, ad es., l'epiglottite è più frequente sopra i 2 anni), sono poi da menzionare tutte le situazioni di immunodeficienza, il sovraffollamento e la frequenza in asili, mentre più discussi sono l'allattamento artificiale e l'esposizione al fumo; enormemente più elevato (fino a 500 volte) è il rischio d'infezione secondaria nei bambini conviventi con un caso indice.

Il periodo d'incubazione della malattia non è ancora ben definito: si tratta indicativamente di 4-6 giorni.

La diagnosi etiologica poggia in primo luogo sull'osservazione di piccoli batteri gramnegativi nel liquor e sulla successiva conferma dell'esame colturale; essa si avvale anche della ricerca dell'antigene capsulare, di natura polisaccaridica, cioè il poliribosil-ribitol-fosfato (PRP), nei vari materiali patologici e nelle urine, a mezzo di tecniche diverse quali l'ELISA, l'immuno-elettroforesi, l'agglutinazione con lattice, etc.

Il trattamento chemio-antibiotico è rappresentato dall'associazione ampicillina-cloramfenicolo, ma in caso di ampicillino-resistenza dello stipite, documentata dall'antibiogramma, è valido il ricorso ad una cefalosporina di terza generazione (cefotassim, cefotazidima, ceftriaxone) per via endovenosa per 7 giorni, eventualmente associata a desametasone.

Assai elevata, dal 2% al 5% ed oltre, è la letalità; alta è poi, nei sopravvissuti, la frequenza (10%-30%) di gravi sequele irreversibili, quali *handicap* neurologici e perdita dell'udito.

Profilassi

È previsto l'isolamento ospedaliero fino a 24 ore dall'inizio della terapia antibiotica efficace; per i bambini conviventi, o comunque a rischio, è poi indicata la chemioprophilassi con rifampicina per os per 4 giorni, in dose di 20 mg/kg fino ad un massimo di 600 mg.

Le più importanti misure di prevenzione sono però rappresentate dall'adozione dei efficaci vaccini.

Il primo vaccino, costituito da un 77 purificato, risale ad oltre 20 anni, ma solo nel 1985, in U.S.A., l'FDA ne licenziò uno di questo tipo, indicato a dose unica per bambini di 24

mesi ed oltre. Fu subito evidente, infatti, che solo i bambini di età superiore ai 18-24 mesi rispondono adeguatamente, giacché, in età più precoce, PRP, come altri polisaccaridi, evoca risposte T-indipendenti, perciò con bassissimi livelli anticorpali e senza efficacia anamnestic. Questo spiega la differenza tra i risultati ottenuti in Finlandia (protezione di oltre il 90% in età > 18 mesi) e quelli assai deludenti ottenuti nelle prime sperimentazioni in U.S.A. (ad età inferiore).

Un passo decisivo per la protezione dell'età più a rischio (< 18 mesi) fu compiuto con l'introduzione di vaccini a risposta T-dipendente, attraverso la coniugazione di PRP con proteine vettrici: tali *vaccini coniugati*, di largo impiego in U.S.A. fin dal 1987, hanno portato al netto declino delle infezioni invasive da Hib ed alla prospettiva dell'azzeramento.

Con diverse tecniche di legame aptene-carrier, con proteine vettrici differenti, con PRP di varie dimensioni, sono stati licenziati in U.S.A. alcuni vaccini coniugati tutti in grado di evocare, secondo schemi precisi di somministrazione, livelli anticorpali assai superiori al minimo protettivo (1 µg/ml): nel 1987 il PRP-D (ProHIBiT- coniugato con anatossina difterica), efficace in dose unica nei bambini di oltre 15 mesi, nel 1990 l'HbOC (HibTITER- coniugato con proteina atossica di un mutante di *C. diphtheriae*) consigliato alle stesse scadenze del trivalente DPT (2, 4, 6 mesi con richiamo a 15-18) ed ancora, alla fine del 1990, il PRP-OMP (con proteina degli strati superficiali di *Neisseria meningitidis* -PedvaxHIB), particolarmente indicato nei neonati di 2-3 mesi, anche a singola dose. Da ultimo è stato licenziato un vaccino coniugato con tossoide tetanico (PRP-T), prodotto ormai da vari Istituti ed indicato, fin dall'età di 2 mesi, per via i.m. oppure s.c.: esso è disponibile anche in Italia dal novembre '94 sotto la sigla ACT-HIB (Pasteur-Mérieux; MSD).

La sicurezza dei vaccini coniugati, che appaiono anche validi nel ridurre la colonizzazione orofaringea da Hib, è ormai accertata anche per somministrazione contemporanea con i vari vaccini dell'obbligo (DPT, OPV, HBV), tanto che nel marzo '93 l'FDA ha licenziato il TETRAMUNE™, per combinazione di un vaccino DPT con HbOC. È di recente sperimentazione un vaccino Hib-DTaP, contenente cioè la componente acellulare del nuovo vaccino antipertosse.

In condizioni di rischio elevato e immediato la vaccinazione antiHib è stata anche associata e con successo, in neonati Navajos, alla profilassi passiva con immunoglobuline da volontari immunizzati.

In conclusione è doveroso sottolineare, sia per l'esperienza americana che europea, l'indubbia efficacia di questi vaccini combinati, anche se remore legittime possono frapporsi alla loro introduzione nella schedula delle vaccinazioni di massa, se non altro in base a considerazioni generali sull'opportunità o meno di una larga estensione delle pratiche vaccinali obbligatorie.

Bibliografia

- Barbour M., 36° Congr. Naz. Igiene, Alghero (SS), 28/9-1/10, 1994.
- Bartolozzi G., *I Vaccini*, 1994, N.I.S., Roma, p. 181.
- CDC-MMWR, 1993, 42, N° RR-13.
- CDC-MMWR, 1994, 43, (8), 144.
- D'Alessandro D., Pompa M. G., Squarcione S., Fara G. M., *Federazione medica*, 1995, 13, 411.
- Musumeci S., D'Agata A., *Riv. Inf. Ped.*, 1993, 8, 7.
- Shapiro E. D., Ward J. I., *Epidemiologic Reviews*, 1991, 13, 113.

GIUSEPPE ARMANI

HANTAVIRUS: v. BUNYAVIRUS* (*1166-1167); FEBBRI EMORRAGICHE VIRALI* (coll. *2989-2990); HANTAVIRUS, MALATTIA DA** (coll. **2577-2586).

HANTAVIRUS, MALATTIE DA

SOMMARIO

Introduzione (col. 2577). - **Cenni storici** (col. 2577). - **Etiologia ed epidemiologia** (col. 2577): *Caratteristiche biomolecolari degli hantavirus*. - *Classificazione e distribuzione degli hantavirus*. - *Modalità di trasmissione e soggetti a rischio*. - *Forme cliniche e sintomatologia* (col. 2581): *Febbri emorragiche con sindrome renale*. - *Sindrome polmonare da hantavirus*. - **Diagnosi clinica e di laboratorio** (col. 2584). - **Terapia** (col. 2585). - **Prevenzione e controllo** (col. 2585).

Introduzione

Al genere *Hantavirus* appartengono diversi sierotipi virali, distribuiti nel Vecchio e nel Nuovo Mondo, responsabili di una serie di malattie umane fra loro correlate. Presenti in numerose specie di roditori, nei quali causano un'infezione cronica inapparente, gli hantavirus si trasmettono all'uomo attraverso l'inalazione di residui essiccati di materiale biologico proveniente dal serbatoio animale. Al contagio umano consegue un'affezione febbrile acuta, la cui espressività clinica e la cui gravità dipendono dallo specifico hantavirus di volta in volta in causa. In particolare, le forme eurasiatiche «classiche» appaiono essenzialmente contrassegnate da manifestazioni emorragiche e da una nefropatia interstiziale più o meno grave (*febbri emorragiche con sindrome renale* o *HFRS: Hemorrhagic Fever Renal Syndrome*), mentre i casi nordamericani di recente segnalazione sono caratterizzati da un quadro di insufficienza respiratoria acuta a rapida evoluzione e ad elevata letalità (*sindrome polmonare da hantavirus* o *HPS: Hantavirus Pulmonary Syndrome*).

Cenni storici

Il genere *Hantavirus* è stato costituito, nell'ambito della famiglia *Bunyaviridae*, in epoca recente, in seguito all'isolamento, ad opera di Lee e collaboratori (1978), dell'agente etiological della febbre emorragica coreana, al quale è stata successivamente attribuita, dal nome di un fiume della Corea del Sud, la denominazione di *virus Hantaan*.

La febbre emorragica coreana (KHF: *Korean Hemorrhagic Fever*) si era resa nota alla medicina occidentale negli anni '50, quando aveva colpito, in forma epidemica, diverse migliaia di militari impegnati nella guerra di Corea. Alla fine degli anni '70, con l'identificazione del *virus Hantaan*, si poté stabilire non solo l'etiologia della KHF, ma anche la sua sostanziale identità con forme di HFRS fino ad allora ritenute distinte, come la nefrosi-nefrite emorragica dell'Unione Sovietica e la febbre emorragica epidemica della Cina.

Nei primi anni '80, l'identificazione di un secondo hantavirus, denominato *Puumala*, responsabile delle forme di nefropatia epidemica (NE) della Russia Europea e della Scandinavia stabiliva una precisa correlazione nosografica tra le HFRS asiatiche e quelle, meno gravi, osservate in Europa. Nel 1984 veniva isolato dal ratto domestico un terzo hantavirus, il *virus Seoul*, responsabile, in Corea, Cina e Giappone, di forme relativamente miti di HFRS, a diffusione tipicamente urbana.

In America, la presenza degli hantavirus era, fino a poco tempo fa, limitata a un quarto sierotipo virale, denominato *Prospect Hill*, ospitato da alcuni roditori agresti, ma non responsabile di alcuna affezione umana. Nel 1993, tuttavia, si sono manifestati negli Stati Uniti numerosi casi di una grave sindrome polmonare acuta, il cui agente etiological è risultato essere un hantavirus di nuovo tipo. Esso è stato inizialmente denominato *virus Muerto Canyon*, ovvero (dalla località geografica di isolamento, prossima al punto di confine quadrangolare tra Utah, Colorado, Arizona e Nuovo Messico) *virus Four Corners*. Attualmente, entrambe tali denominazioni tendono ad essere sostituite da quella di *virus Sin Nombre*.

Etiologia ed epidemiologia*Caratteristiche biomolecolari degli hantavirus*

Gli hantavirus (v. anche BUNYAVIRUS*; FEBBRI EMORRAGICHE VIRALI*) sono virus di forma sferoidale od ovoidale, di dimensioni comprese tra i 100 e i 175 nm. Il genoma virale è

costituito da tre distinti segmenti di RNA a singola elica, dotati di polarità negativa, inclusi ciascuno in un proprio nucleocapside e rispettivamente designati, in ragione del peso molecolare, come *large* o *L* ($2,7 \times 10^3$ kDa), *medium* o *M* ($1,2 \times 10^3$ kDa) e *small* o *S* ($0,6 \times 10^3$ kDa). Si ritiene che il segmento L codifichi per l'RNA-polimerasi virale e che il segmento S codifichi per la proteina del nucleocapside (N) di 50-53 kDa. Nel segmento di medie dimensioni M sarebbe invece codificato il polipeptide precursore di due proteine glicosilate dell'involucro virale, denominate G1 e G2, del p. m. di 65-74 e, rispettivamente, 55-60 kDa.

L'inclusione degli hantavirus nella famiglia *Bunyaviridae*, originariamente proposta in base alla morfologia del *virus Hantaan*, è stata in seguito confermata dal reperto della tipica tripartizione dell'RNA virale e dallo spettro di sensibilità alla ribonucleasi-A, risultato sovrapponibile a quello di altri virus della famiglia. L'assegnazione del *virus Hantaan* ad un nuovo genere (*Hantavirus*) della famiglia *Bunyaviridae*, distinto da quelli già conosciuti (*Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Uukuvirus* e *Nairovirus*) è stata suggerita da considerazioni sierologiche e dall'individuazione, in tutti e tre i segmenti dell'RNA virale, di una sequenza 3'-terminale (3'AU-CAUCAUCUG), altamente conservata, diversa da ciascuna di quelle dei generi già noti.

Classificazione e distribuzione degli hantavirus

Nell'ambito del genere *Hantavirus* sono stati identificati diversi sierotipi antigenicamente distinti. Oltre che per la struttura antigenica, tali sierotipi differiscono per la specie di roditore fungente da serbatoio naturale, per la distribuzione geografica e per il tipo di malattia causato nell'uomo (tab. I). Attualmente, almeno cinque sierotipi di hantavirus appaiono ben caratterizzati e possono essere considerati come specie virali distinte.

1. - Il *virus Hantaan (HTN)*, prototipo del gruppo, ha come serbatoio animale un roditore campestre, il topo striato coreano *Apodemus agrarius*, ed è prevalentemente diffuso in Estremo Oriente (Corea, Giappone, Cina, Russia orientale), pur potendo osservarsi anche in Europa, nella regione balcanica. Causa la forma più grave di HFRS, denominata, in Corea, febbre emorragica coreana e, in Cina, febbre emorragica epidemica.

2. - Il *virus Seoul (SEO)* ha invece come ospite primario i roditori urbani del genere *Rattus* (*R. norvegicus*, *R. rattus*), ampiamente diffusi in tutto il mondo. La sua presenza nei ratti, di strada o di abitazione, è stata dimostrata, oltre che in Corea, anche in Cina, in Giappone, in Brasile e negli Stati Uniti. In Italia, a Roma, sono stati rilevati, in una notevole percentuale di ratti urbani, elevati titoli di anticorpi sierici rivolti contro un hantavirus Seoul-simile. Nell'uomo, il virus Seoul è responsabile di una forma di HFRS di moderata gravità, con emorragie e danno renale di entità contenuta.

3. - I roditori della specie *Clethrionomys glareolus* (arvicole) costituiscono il serbatoio animale di un terzo sierotipo di hantavirus, denominato, dalla località della Finlandia dove fu originariamente identificato, *Puumala (PUU)*. Esso è l'agente etiological di una forma relativamente lieve di HFRS, conosciuta in Europa come nefropatia epidemica. La presenza del virus Puumala nelle arvicole è stata dimostrata in numerosi paesi europei, fra cui Russia, Svezia, Belgio, Jugoslavia e Grecia.

4. - Il quarto sierotipo, denominato *Prospect Hill (PH)*, è stato isolato nel Maryland (USA) dai polmoni di roditori della specie *Microtus pennsylvanicus*. Non sono note affezioni umane causate da questo virus, la cui presenza è stata per ora dimostrata nei soli Stati Uniti.

5. - La quinta specie virale, inizialmente denominata *Muerto Canyon* o *Four Corners (FC)* ed oggi indicata come

TAB. 1. HANTAVIRUS E MALATTIE UMANE

Sierotipo virale	Identificazione	Serbatoio animale	Malattia umana	Diffusione geografica
Sierotipi principali				
Hantaan (HTN)	Corea, 1976	<i>Apodemus agrarius</i>	HFRS, forma grave (febbre emorragica coreana [KHF])	Corea, Giappone, Cina, Russia orientale, Balcani
Seoul (SEO)	Corea, 1984	<i>Rattus norvegicus</i>	HFRS, forma moderata	Corea, Cina, Giappone, altri paesi
Puumala (PUU)	Finlandia, 1980	<i>Clethrionomys glareolus</i>	HFRS, forma lieve (nefropatia epidemica [NE])	Scandinavia, Europa centrale, Balcani
Prospect Hill (PH)	USA, 1985	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Nessuna conosciuta	Stati Uniti
Sin Nombre (SNV) o Muerto Canyon o Four Corners (FC)	USA, 1993	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Sindrome polmonare da hantavirus (HPS)	Stati Uniti, Canada, Brasile
NY-1	USA, 1994	<i>Peromyscus leucopus</i>	HPS	Stati Uniti (Rhode Island)
Bayou	USA, 1995	<i>Oryzomys palustris</i>	HPS	Stati Uniti (Louisiana)
Black Creek Canal (BCCV)	USA, 1996	<i>Sigmodon hispidus</i>	HPS	Stati Uniti (Florida)
Altri sierotipi				
Leakey (LEA)	USA, 1988	<i>Mus musculus</i>	Nessuna conosciuta	?
Belgrado o Dohrava (DOB)	Jugoslavia, 1992	<i>Apodemus flavicollis</i>	HFRS, forma grave	?
Thottapalayam	India, 1971	<i>Suncus murinus</i>	?	?
Thailand	Tailandia, 1985	<i>Bandicota indica</i>	?	?

Sin Nombre virus (SNV), è stata identificata nel 1993 negli Stati Uniti sudoccidentali in seguito all'improvvisa comparsa, in forma epidemica, di una grave malattia respiratoria acuta (sindrome polmonare da hantavirus). Subito riconosciuto come un sierotipo diverso dai quattro già noti, il virus Sin Nombre è stato rapidamente isolato, adattato in coltura (linea cellulare Vero E6) e geneticamente caratterizzato. Il principale serbatoio animale è stato individuato nel roditore *Peromyscus maniculatus* (topo-cervo), diffuso in tutto il Nord-America. L'epidemia statunitense del 1993 è stata attribuita ad un eccezionale ma transitorio incremento, dovuto a fattori climaticoambientali, della locale popolazione di topi-cervo.

Successivamente, negli anni 1994-96, sono stati individuati, negli USA, altri tre hantavirus responsabili di forme di HPS: il virus NY-1, responsabile del decesso di un paziente a Rhode Island; il virus Bayou, isolato dal tessuto polmonare di un soggetto deceduto in Louisiana e il Black Creek Canal virus (BCCV), associato ad un caso osservato in Florida. Le specie di roditori fungenti da serbatoio per questi tre virus sono state rispettivamente identificate nel topo dai piedi bianchi (*Peromyscus leucopus*), nel ratto delle risaie (*Oryzomys palustris*) e nel ratto del cotone (*Sigmodon hispidus*).

La recente segnalazione di casi di HPS anche in Canada, in Paraguay, in Argentina e in Brasile (in quest'ultimo caso accompagnata dall'identificazione di una nuova sequenza virale) induce attualmente a considerare l'HPS una vera e propria zoonosi panamericana.

Alcuni sierotipi di hantavirus, meno caratterizzati dei principali, sono stati segnalati in Asia. Autori con riferimento a esecuzioni capitali, hanno descritto delle infezioni di Leakey e di Thottapalayam. Riferimenti sono stati fatti da autori svedesi di questi sierotipi in Europa centrale. Accanto a questi, si è parlato di sierotipi di hantavirus indicati come Thottapalayam e Thailand.

Negli ultimi anni, un decisivo contributo alla caratterizzazione ed alla classificazione degli hantavirus è stato offerto dalla tecnica di amplificazione dell'RNA virale mediante reazione a catena della polimerasi dopo trascrizione inversa (RT-PCR). L'analisi delle sequenze nucleotidiche così amplificate ha sostanzialmente confermato la tipizzazione degli hantavirus basata su criteri sierologici, permettendo inoltre di precisare i rapporti tassonomici e le distanze filogenetiche tra i diversi membri del gruppo (fig. 1).

Modalità di trasmissione e soggetti a rischio

Indipendentemente dai casi di malattia, l'infezione dell'uomo da parte degli hantavirus si verifica, con varia frequenza, oltre che in molti paesi dell'Asia, dell'Europa e delle Americhe, anche in Africa, nel Pacifico Occidentale e in Australia. In Italia, nelle zone montane del Veneto e del Friuli, anticorpi sierici anti-hantavirus sono stati dimostrati in una piccola quota di coltivatori, cacciatori, lavoratori forestali e militari. A Roma, un'analogia sieropositività è stata osservata in vigili del fuoco a contatto, per ragioni di lavoro, con il fiume Tevere.

Nella trasmissione dell'infezione da un animale all'altro e dall'animale all'uomo, un ruolo cruciale svolgono saliva, urine e feci dei roditori, nelle quali il virus viene eliminato in quantità e per lungo tempo. L'uomo contrae l'infezione per via respiratoria, attraverso l'inalazione di residui essiccati degli escreti suddetti. Teoricamente, potrebbero aversi altre modalità di contagio, come l'ingestione di acqua o alimenti contaminati o l'inoculazione accidentale di materiale biologico infetto. Sono stati osservati casi di infezione conseguenti al morso di un roditore. Viceversa, l'intervento di artropodi vettori non è mai stato dimostrato, né sono stati osservati casi di trasmissione interumana.

Le febbri emorragiche da hantavirus possono colpire l'uomo secondo tre diversi modelli epidemiologici, rurale, urbano e di laboratorio, dipendenti dal serbatoio animale di volta in volta in causa. Nel primo caso, sono a rischio i soggetti di sesso maschile di età compresa fra i 20 e i 50 anni (principalmente agricoltori e

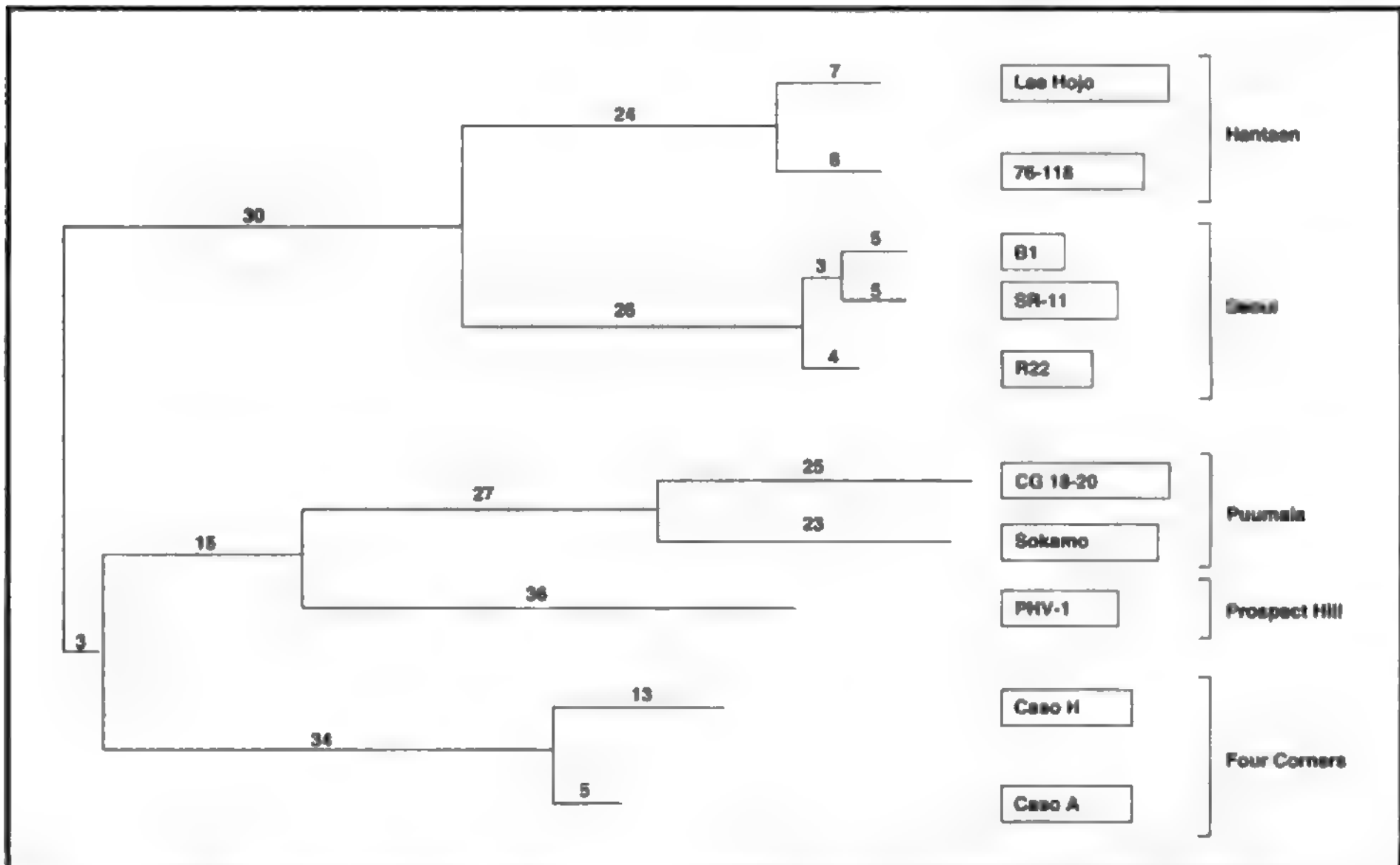


Fig. 1. Albero filogenetico degli hantavirus ottenuto da Nichol *et al.* (1993) mediante analisi della sequenza nucleotidica (dopo RT-PCR) della regione del segmento M dell'RNA virale codificante per la glicoproteina G2. Le cifre indicano il numero di nucleotidi compresi fra due successive biforcazioni. Gli isolati sono riportati nei riquadri, i sierotipi nella colonna di destra. Le due maggiori ramificazioni comprendono, da un lato, i sierotipi prevalentemente diffusi in Asia (*in alto*) e, dall'altro, quelli diffusi in Europa e Nord-America (*in basso*).

soldati accampati) e si hanno due picchi annuali di trasmissione, nella primavera inoltrata e in autunno, corrispondenti ai picchi di diffusione dell'infezione fra i roditori. Una stagionalità meno netta presentano i casi urbani segnalati in città della Corea, del Giappone e della Cina. La trasmissione degli hantavirus da parte di ratti di laboratorio è testimoniata dai numerosi casi di malattia verificatisi, in Asia e in Europa, nel personale ad essi esposto (addetti agli stabulari, biologi, ricercatori biomedici).

Forme cliniche e sintomatologia

Febbri emorragiche con sindrome renale

Infezione da virus Hantaan. – Il virus Hantaan causa la febbre emorragica coreana (KHF) che, con una letalità intorno al 10%, è certamente la più grave tra le HFRS (v. HANTAAN VIRUS, MALATTIA DA*). La malattia è diffusa in Estremo Oriente, dove sono colpiti soprattutto Corea, Giappone, Russia asiatica e Cina. In quest'ultimo paese, nel 1985 i casi ricoverati in ospedale hanno superato le 100.000 unità.

Nella sua forma tipica, la KHF ha un periodo di incubazione di 2-3 settimane e presenta, dopo vaghi prodromi respiratori, un decorso clinico in cinque fasi.

La prima fase, o *fase febbrile*, della durata di 3-8 giorni, corrisponde al periodo di invasione ed è contrassegnata dal brusco aumento della temperatura (fino a 40-41 °C), con brividi, mialgie e cefalea (tipicamente retroorbitale). Sono spesso presenti dolori addominali e dorsolombari dovuti ad edema peritoneale e retroperitoneale. Sete ed anoressia sono di norma spiccate e possono associarsi a nausea e vomito. La manifestazione più tipica è in questa fase costi-

tuita dall'arrossamento diffuso della cute del petto, del collo e del volto, con iniezione congiuntivale e iperemia della faringe. Compagno poi caratteristiche soffusioni emorragiche della congiuntiva e del palato molle, a cui rapidamente si aggiungono petecchie della cute del volto, del collo e del tronco. Gli esami di laboratorio denotano leucocitosi neutrofila, positività delle prove di fragilità capillare e lieve albuminuria.

La successiva *fase ipotensiva*, della durata di 1-3 giorni, è caratterizzata da una brusca diminuzione della pressione arteriosa. Nei casi più gravi, si ha un vero e proprio shock, con tachicardia, iposfigmia, ridotta perfusione tissutale, sudorazione algida ed alterazioni della coscienza. Una buona parte (30%) dei decessi causati dall'infezione si verifica in questa fase. Il principale meccanismo patogenetico dello shock è costituito dall'ipovolemia conseguente a diffuso danno endoteliale e ad aumento della permeabilità capillare. La leucocitosi e la neutrofilia divengono, in questa fase, spiccate, mentre diminuisce il numero delle piastrine. Nel contempo, si manifesta una progressiva compromissione renale, con aumento di azotemia e creatininemia, ipostenuria, ematuria e marcata proteinuria.

Nella terza fase, o *fase oligurica*, della durata di 3-7 giorni, mentre l'ipotensione arteriosa regredisce, si instaura una classica insufficienza renale acuta, con oliguria, iperazotemia, iperkaliemia, iperfosfatemia, ipocalcemia ed acidosi metabolica. Le manifestazioni emorragiche raggiungono il culmine, potendo comprendere, oltre alle petecchie e alle soffusioni congiuntivali, epistassi, emottisi, emate-

mesi, ematuria ed emorragie cerebrali. Non raramente si osservano gravi complicazioni neurologiche (stato confusionale, letargia, allucinazioni) o respiratorie (polmoniti batteriche, edema polmonare acuto). La fase oligurica contribuisce per circa il 50% alla mortalità complessiva della KHF.

Nei pazienti che sopravvivono, la ripresa della funzione renale (*fase diuretica*) segna di norma un sensibile miglioramento delle condizioni generali, con un graduale ritorno delle forze e una lenta ripresa dell'alimentazione. Infine, durante la *fase di convalescenza*, che dura 2-3 mesi, i sintomi lentamente regrediscono, mentre i reni gradatamente recuperano le loro funzioni e, in particolare, la capacità di concentrare adeguatamente le urine.

Infezione da virus Seoul. — La maggior parte dei casi di HFRS da virus Seoul si osservano in ambienti urbani della Corea e del Giappone e presentano un quadro clinico simile a quello della KHF, ma più breve e, generalmente, meno grave. Le cinque classiche fasi possono non essere nettamente distinguibili. La febbre, il brivido, le mialgie e l'anorexia sono paragonabili a quelle della KHF, come pure l'iniezione faringo-congiuntivale e la comparsa di petecchie. La cefalea, la leucocitosi, l'ipotensione, le emorragie e l'interessamento renale sono invece meno gravi. Caratteristica dell'infezione da virus Seoul è la frequenza dei dolori addominali e dei segni di interessamento epatico (epatomegalia, ipertransaminasemia, talora ittero).

Infezione da virus Puumala. — La malattia conseguente all'infezione da virus Puumala, cioè la nefropatia epidemica (NE), è largamente diffusa in Scandinavia e in altre regioni europee. Negli anni 1992-93 un transitorio aumento di incidenza della NE è stato contemporaneamente osservato in Germania, Francia e Belgio. Benché possa decorrere in modo grave, nella maggioranza dei pazienti, la NE è un'affezione benigna, a risoluzione spontanea. La compromissione renale, associata a febbre, cefalea, dolori dorsolombari e addominali, domina il quadro clinico, mentre le manifestazioni emorragiche sono, rispetto alla KHF, assai meno rilevanti, e anche l'ipotensione, i sintomi neurologici e la leucocitosi sono meno comuni e gravi. La funzione renale mostra una transizione, durante la malattia, dall'oligo-anuria alla poliuria. Alle lesioni renali, classificabili come nefrite tubulointerstiziale, corrisponde, sul piano funzionale, una marcata ma reversibile riduzione del filtrato glomerulare, associata a diminuita capacità di riassorbimento tubulare.

Sindrome polmonare da hantavirus

Nel corso del 1993 sono stati accertati, negli USA, 53 casi di HPS (*Hantavirus Pulmonary Syndrome*), prevalentemente concentrati nel Sud-Ovest (Nuovo Messico, Arizona e Colorado). Distribuita equamente tra i sessi, la malattia ha mostrato una certa predilezione per i soggetti tra i 20 e i 39 anni, un esordio acuto, un rapido decorso ed un'elevata letalità (60%). Dal dettagliato studio clinico-patologico di una parte dei casi suddetti è emerso un quadro dell'affezione piuttosto caratteristico. Tale quadro è risultato sostanzialmente confermato anche nella più ampia casistica raccolta successivamente (135 casi negli USA e in Canada fino al 30 novembre 1995).

I sintomi d'esordio sono costituiti, in ordine di frequenza, da febbre, mialgie, cefalea, tosse, nausea e vomito, mentre piuttosto rara è la dispnea. I reperti obiettivi sono inizialmente rappresentati da tachicardia e tachipnea, talora da ipotensione arteriosa. Diversamente da quanto accade nelle altre malattie da hantavirus, non si osservano manifestazioni emorragiche cutanee né mucose. Nel complesso il quadro è quello di una sindrome similinfluenzale, che può dapprima apparire non grave, ma che rapidamente evolve

verso l'insufficienza respiratoria acuta. Tra i dati di laboratorio spicca la leucocitosi, con neutrofilia e comparsa in circolo di metamielociti e linfociti atipici. Si osservano anche aumento dell'ematocrito, trombocitopenia, allungamento di PT e PTT aumento della concentrazione sierica di LDH, ALT e AST. Azotemia, creatininemia ed esame delle urine sono in genere solo lievemente alterati. L'esame radiografico del torace mostra costantemente, in fase conclamata, infiltrati polmonari diffusi bilaterali, talora con effusione pleurica.

Il decorso dell'HPS è rapido. Nei casi ad esito letale, la morte si verifica in genere da due giorni a due settimane dopo l'inizio dei sintomi. L'evoluzione sfavorevole della malattia è contrassegnata da acidosi metabolica e progressivo deterioramento della funzione cardiorespiratoria. L'evento terminale è costituito da un edema polmonare non cardiogeno, accompagnato da grave ipotensione arteriosa.

L'indagine autopsica evidenzia un cospicuo edema dei polmoni, associato a versamento pleurico sieroso. All'esame microscopico del tessuto polmonare si osservano edema intralveolare, membrane taline e infiltrato linfocellulare interstiziale. Le analisi immunostochimiche rivelano la diffusa presenza dell'antigene virale nelle cellule endoteliali di polmoni, reni, cuore, pancreas muscoli e surreni.

Nell'insieme, tali reperti ricordano quelli della *sindrome da distress respiratorio dell'adulto* ed appaiono compatibili con un meccanismo patogenetico basato su un diffuso aumento, virus-indotto, della permeabilità dell'endotelio capillare di vari organi e, in particolare, del polmone. La presenza nell'HPS dei quattro elementi costitutivi della *sindrome da risposta infiammatoria sistemica* (febbre, tachicardia, tachipnea e leucocitosi), associati a depressione miocardica ed anomalie della coagulazione, suggerirebbe d'altro canto un possibile intervento di meccanismi biochimici analoghi a quelli operanti nelle sepsi.

Diagnosi clinica e di laboratorio

Le forme di HFRS che si verificano nelle regioni dove la malattia è comune, e che si presentano in modo tipico, possono essere diagnosticate sulla base della sola sintomatologia clinica. Peraltro, solo il 20% dei pazienti con infezione da virus Hantaan presenta una forma conclamata di malattia, mentre negli altri casi si ha una sintomatologia lieve o moderata, di difficile riconoscimento. Viceversa, in area endemica, sono spesso scambiati con l'HFRS casi di leptospirosi (v.) o di *tsumugamushi* (v. RICKETTSIOSI). L'accertamento dell'HFRS riposa quindi, nella grande maggioranza dei casi, sugli esami di laboratorio.

La *diagnosi sierologica* si avvale di numerose tecniche capaci di rivelare la presenza di anticorpi circolanti rivolti contro gli hantavirus, fra cui immunofluorescenza, test immunoenzimatici, immunoblot, inibizione dell'emoagglutinazione, immunoprecipitazione e neutralizzazione. Quali substrati antigenici possono essere impiegati sia tessuto polmonare di roditori infetti, sia ceppi virali coltivati in linee cellulari. Recentemente, è stata introdotta, quale antigene virale, la proteina nucleocapsidica ricombinante dei sierotipi Hantaan e Puumala, prodotta in *Escherichia coli*.

Poiché, dopo un'infezione da hantavirus, la presenza in circolo di anticorpi IgM può protrarsi per mesi, ai fini della discriminazione sierologica tra malattia in atto e infezione pregressa si ricorre abitualmente alla classica procedura di titolazione delle IgG in due diversi campioni di siero, prelevati a distanza di 7-10 giorni. Un'alternativa è rappresentata dai test che misurano l'avidità del legame delle IgG all'antigene virale, avidità che risulta scarsa nelle infezioni recenti ed elevata in quelle di vecchia data.

La *diagnosi virologica* di HFRS, per ragioni pratiche meno frequentemente eseguita di quella sierologica, si basa su varie tecni-

che immunologiche capaci di dimostrare la presenza dell'antigene virale nei tessuti dell'ospite (ELISA, immunofluorescenza, immunoelettromicroscopia). Sono stati impiegati allo scopo anche metodi biomolecolari (sonde di RNA radiomarcate) capaci di rilevare la presenza nei tessuti dell'acido nucleico virale. L'isolamento del virus mediante inoculazione in linee cellulari continue o nell'animale di laboratorio è una procedura difficile e laboriosa, riservata essenzialmente alla ricerca.

La *diagnosi di HPS* dovrebbe essere presa in considerazione, negli USA, in tutti i casi di insufficienza respiratoria acuta dell'adulto non attribuibile ad altre cause (*unexplained adult respiratory distress syndrome* o UARDS). Ai fini di sorveglianza epidemiologica, i CDC ritengono sufficiente, per la definizione di caso sospetto, la sola presenza, non altrimenti spiegabile, di infiltrati polmonari interstiziali bilaterali associati ad ipossiemia arteriosa. Anche per l'accertamento dell'HPS, in ogni caso, risultano dirimenti gli esami virologici e sierologici. Fra i primi, particolare valore rivestono quelli basati sulla dimostrazione del virus nei tessuti dei pazienti mediante PCR o tecniche immunoistochimiche. I test sierologici sono basati sull'impiego di antigeni del SNV (*San Nombre Virus*) ottenuti con la metodologia del DNA ricombinante.

Terapia

Il trattamento delle *HFRS* causate dal virus *Hantaan* e *Seoul* richiede il ricovero del paziente in ambiente ospedaliero e si avvale di un ventaglio di misure di supporto da applicare in funzione della gravità e dello stadio della malattia. Durante la *fase febbrile*, la terapia può limitarsi al riposo a letto, alla sedazione farmacologica e al controllo dell'equilibrio idroelettrolitico. La *fase ipotensiva*, più impegnativa della precedente, richiede un energico trattamento anti-shock, basato essenzialmente sull'infusione endovenosa di succedanei del plasma, eventualmente associata alla somministrazione di farmaci vasoattivi. Nella *fase oligurica*, sono essenziali, come in ogni forma di insufficienza renale acuta, la restrizione dell'introito liquido, la somministrazione di una dieta normocalorica povera o priva di proteine, sodio e potassio e la prevenzione dell'iperkaliemia mediante resine a scambio ionico. Nei casi che non rispondono al trattamento medico, è necessario ricorrere all'emodialisi. Nella *fase diuretica*, infine, è di solito sufficiente somministrare liquidi ed elettroliti nella misura necessaria a compensare le perdite.

Nella grave forma HFRS che si osserva in Cina, la somministrazione endovenosa di ribavirina in fase precoce si è mostrata capace, in alcune ricerche, di diminuire il rischio di oliguria e di emorragie, con ciò significativamente riducendo la mortalità della malattia.

Nella maggior parte dei casi, la *nefropatia epidemica* causata dal virus *Puumala* non richiede un trattamento intensivo, ma solo la sorveglianza dell'equilibrio idroelettrolitico e la somministrazione di rimedi sintomatici. In non più del 3% dei pazienti, la comparsa di una sindrome uremica rende necessaria l'emodialisi o la dialisi peritoneale.

Per quanto riguarda l'HPS, al momento attuale l'unica possibile terapia è costituita da misure di ventilazione assistita e di sostegno emodinamico tese a far superare al paziente la fase critica dell'insufficienza respiratoria e dello shock. Non è noto se la ribavirina o altri farmaci antivirali siano in grado di modificare il decorso della malattia.

Prevenzione e controllo

Non essendo per il momento disponibili vaccini dotati di sicura efficacia, la prevenzione delle HFRS e dell'HPS si basa essenzialmente su norme di comportamento e misure di igiene ambientale volte a ridurre il contatto dell'uomo con i roditori infetti. Nel caso

dell'HPS, non essendo stati identificati comportamenti o attività specificamente a rischio, la strategia di prevenzione attualmente raccomandata è volta al controllo e, ove possibile, all'eliminazione dei roditori all'interno e in prossimità delle abitazioni.

La diffusione degli hantavirus negli animali di laboratorio può essere tenuta sotto controllo attraverso il monitoraggio sierologico dei roditori e la sistematica eliminazione degli individui infetti. In ogni caso, il personale a contatto con gli animali di laboratorio deve essere protetto, mediante apposite maschere ed altri accorgimenti, dal rischio di inalazione di aerosol potenzialmente contaminati.

Bibliografia

PARTE GENERALE E FEBBRI EMORRAGICHE CON SINDROME RENALE

- Arthur R. R., Loftis R., Glass G. F. *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **47**, 210.
 Avsic-Zupanc T., Cizman B., Gligic A. *et al.*, *Acta Virol.*, 1989, **33**, 327.
 Bruno P., Hassel L. H., Briwn J. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1990, **113**, 385.
 Clement J., McKenna P., Colson P. *et al.*, *Lancet*, 1994, **343**, 114.
 Desmyter J., LeDuc J. W., Johnson K. M. *et al.*, *Lancet*, 1983, **ii**, 1445.
 Hedman K. A., Vaheri A., Brummer-Korvenkontio M., *Lancet*, 1991, **338**, 1353.
 Huggins J., Hsiang C., Cosgriff T. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1991, **164**, 1119.
 Le Guenno B., Camprasse M. A., Guilbault J. C. *et al.*, *Lancet*, 1994, **343**, 114.
 Lee H. W., Dalrymple J. M. (eds.), *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome*, WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research, Korea University, Seoul, 1989.
 Lee H. W., Lee P. W., Johnson K. M., *J. Infect. Dis.*, 1978, **137**, 298.
 Lee H. W., van der Groen G., *Prog. Med. Virol.*, 1989, **36**, 62.
 McCormick J. B., Palmer E. L., Sasso D. R., Kiley M. P., *Lancet*, 1982, **i**, 765.
 Mertz G. J., Hjelte B. L., Bryan R. T., *Hantavirus Infections*, in Schrier R. W. *et al.*, *Advances in Internal Medicine*, 1997, **42**, 369-421, Mosby, St. Louis.
 Niklasson B., LeDuc J. W., *Lancet*, 1984, **i**, 1012.
 Nuti M., Amadeo D., Crovatto M. *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993, **48**, 20.
 Nuti M., Ieraldi L. A., Cristaldi M., Gibbs C. J. Jr., *Arch. Virol.*, 1990, (suppl. 1), 81.
 Rollin P. E., Coudrier D., Sureau P., *Lancet*, 1994, **343**, 115.
 Schmaljohn C. S., Dalrymple J. M., *Hantaviruses*, in Webster R. G., Granoff A., *Encyclopedia of Virology*, 1994, Academic Press, Londra, p. 538.
 Zoller L., Yang S., Gott P. *et al.*, *J. Med. Virol.*, 1993, **39**, 200.
- SINDROME POLMONARE DA HANTAVIRUS**
 CDC, *MMWR (Morb. Mortal. Wkly Rep.)*, 1993, **42** (RR-11), 1.
 CDC, *MMWR (Morb. Mortal. Wkly Rep.)*, 1993, **42**, 421.
 CDC, *MMWR (Morb. Mortal. Wkly Rep.)*, 1994, **43**, 45.
 Duchin J. S., Koster F. T., Peters C. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 949.
 Hjelte B., Torrez-Martinez N., Koster F. T. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 781.
 Hughes J. M., Peters C. J., Cohen M. L., Mahy B. W. J., *Science*, 1993, **262**, 850.
 Kahn A. S., Khabbaz R. F., Armstrong L. R. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1996, **173**, 1297.
 Kahn A. S., Spiropoulou C. F., Morzunov S. *et al.*, *J. Med. Virol.*, 1995, **46**, 281.
 Nichol S. T., Spiropoulou C. F., Morzunov S. *et al.*, *Science*, 1993, **262**, 914.
 Rollin P. E., Ksiazek T. G., Elliot L. H. *et al.*, *J. Med. Virol.*, 1995, **46**, 35.
 Slama T. G., Zon R., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1010.
 Stone R., *Science*, 1993, **262**, 833.
 Wenzel R. P., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1004.

FABRIZIO IOCCACCI E ALESSANDRA CANNI

HEIMLICH, MANOVRA DI

Manovra manuale di primo intervento volta a ristabilire la pervietà delle basse vie aeree (trachea e/o bronchi principali) compromessa acutamente in modo parziale o totale dalla inalazione di un corpo estraneo rappresentato in buona parte dei casi da un bolo di cibo. Consiste schematicamente nella brusca compressione, eventualmente ripetuta, dell'addome al di sotto del diaframma. Lo scopo è quello di innalzare improvvisamente il diaframma in modo

HEIMLICH, MANOVRA DI

da mobilitzare nelle vie respiratorie una quantità di aria sufficiente per creare un colonna aerea diretta verso l'esterno che possa espellere il corpo estraneo, ovvero quello di provocare un colpo di tosse artificiale.

La manovra trova indicazione nell'ostruzione acuta delle vie aeree da corpo estraneo, in pazienti che stanno soffocando e che si presentano frequentemente come in fig. 1 con una mano che indica la gola o che vi si appoggia.

Esistono varie possibilità di esecuzione riferite al paziente cosciente o meno, al sesso ed alla età:

1. *Paziente cosciente, adulto, di sesso maschile o femminile (esclusa la donna gravida nel terzo trimestre di gravidanza), seduto o in piedi.* - Ci si sistema posteriormente al paziente inclinandolo verso l'avanti e lo si circonda con entrambe le braccia. Si dispone una mano a pugno appoggiandone la parte radiale sulla linea mediana a livello dell'epigastrio a metà strada tra ombelico ed estremo terminale della apofisi xifoide sternale (mai in corrispondenza della apofisi). Si effettua una brusca compressione diretta posteriormente (verso la colonna vertebrale) e verso l'alto allacciando la mano libera a quella appoggiata (fig. 2). La manovra va ripetuta in rapida successione 5-10 volte fino a che si constata l'espulsione dalle vie aeree del corpo estraneo (che può fuoriuscire dalla bocca o fermarsi nella stessa) o la scomparsa dei sintomi di ostruzione respiratoria.

In alternativa, nei pazienti con addome protuberante la compressione può essere esercitata sul torace a livello della zona mediana dello sterno.



Fig. 1. Paziente che si presenta soffocando per inalazione di corpo estraneo.



Fig. 2. Esecuzione della m. di H. in un paziente cosciente adulto.

2. *Paziente privo di coscienza, adulto, di sesso maschile o femminile (esclusa la donna gravida nel terzo trimestre di gravidanza).* - Si sistema il paziente in posizione supina disponendosi al di sopra a cavalcioni all'altezza delle cosce. Le compressioni vanno effettuate nello stesso punto (zona epigastrica mediana) e con le stesse modalità del caso 1, applicando però i palmi delle mani l'uno sull'altro e rispettando rigorosamente la linea mediana per evitare di lesionare i visceri sottostanti (fig. 3). Dopo un certo numero di compressioni si esplora il cavo orale con le dita e si elimina, se presente, il corpo estraneo.



Fig. 3. Esecuzione della m. di H. in paziente privo di coscienza.

3. *Paziente adulta, di sesso femminile, gravida.* – Fino al sesto mese di gravidanza le modalità di esecuzione della manovra sono le stesse del caso 1 se la paziente è cosciente, mentre se è priva di coscienza si applicano quelle del caso 2. Nel terzo trimestre di gravidanza a paziente cosciente o priva di coscienza la manovra si effettua disponendola supina, mettendosi a cavalcioni alla altezza delle cosce ed esercitando le compressioni con i palmi delle mani aperti e disposti l'uno sopra l'altro in una zona diversa da quella dei casi precedenti, ovvero nella stessa zona in cui si pratica il massaggio cardiaco esterno (zona mediosternale).

4. *Nell'infante.* – L'infante va disposto prono a cavalcioni delle cosce del soccorritore con testa sistemata più in basso del tronco, tenuta ferma da una mano che ne blocca la mandibola. Il soccorritore appoggia l'avambraccio della mano che sostiene l'infante lungo la propria coscia ed applica quattro bruschi colpi sulla sua schiena tra le scapole con l'*eminencia tenar* ed *ipotenar* dell'altra mano (fig. 4). La manovra si può completare, specie se i colpi sulla schiena non si sono dimostrati efficaci, con delle compressioni toraciche attuate secondo le seguenti modalità: a) Il soccorritore sistema la mano libera sulla schiena dell'infante in modo da sorreggerlo tra le due mani, una delle quali sostiene capo, collo mandibola e torace mentre l'altra sostiene appunto la schiena. b) Mantenendo le mani in questa posizione in modo da bloccare l'infante tra le stesse, il soccorritore lo gira in posizione supina sistemandolo su una delle proprie cosce e tenendo il capo sempre più in basso rispetto al tronco. c) A questo punto si esercitano quattro compressioni del torace sullo stesso punto in cui si pratica il massaggio cardiaco esterno, ma più lentamente.

Se l'infante è di grossa taglia e se le braccia del soccorritore non sono sufficientemente grandi per afferrarlo nel modo sopra descritto si applicano dapprima quattro colpi sulla schiena e quindi, per eseguire le compressioni toraciche, si dispone subito l'infante in posizione supina sopra un piano rigido.

5. *Nel bambino.* – Nel bambino cosciente (fig. 5) si effettua la manovra in modo analogo rispetto a quello dell'adulto.

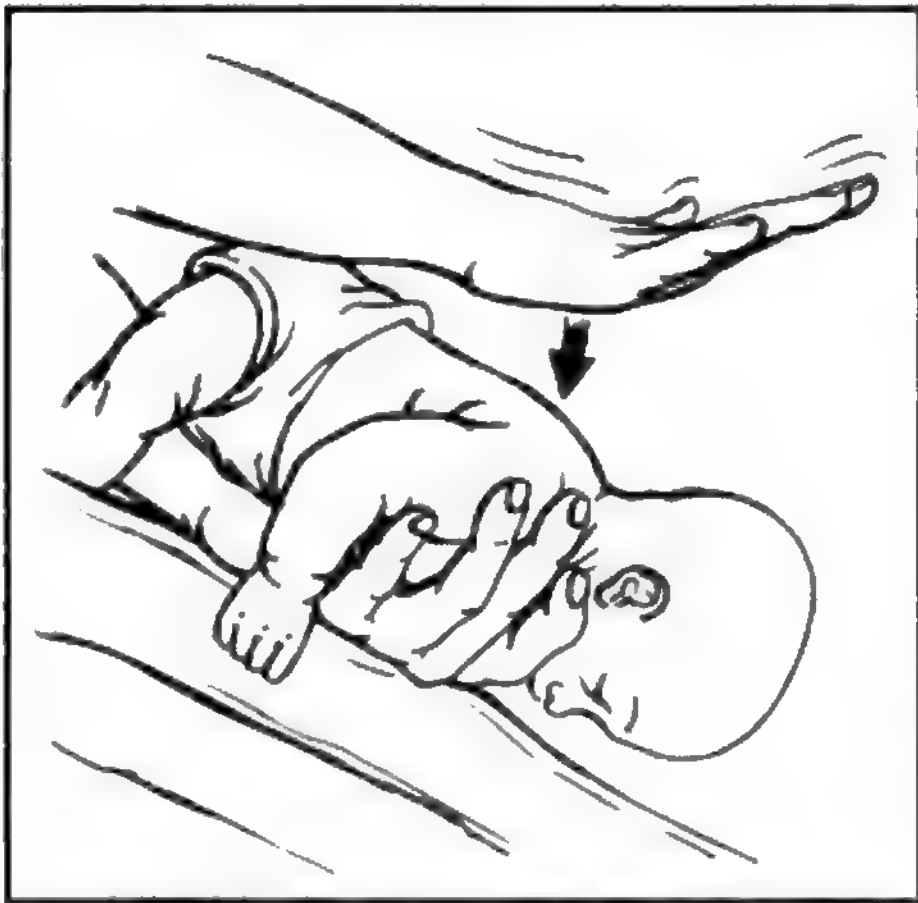


Fig. 4. Esecuzione della m. di H. nell'infante.

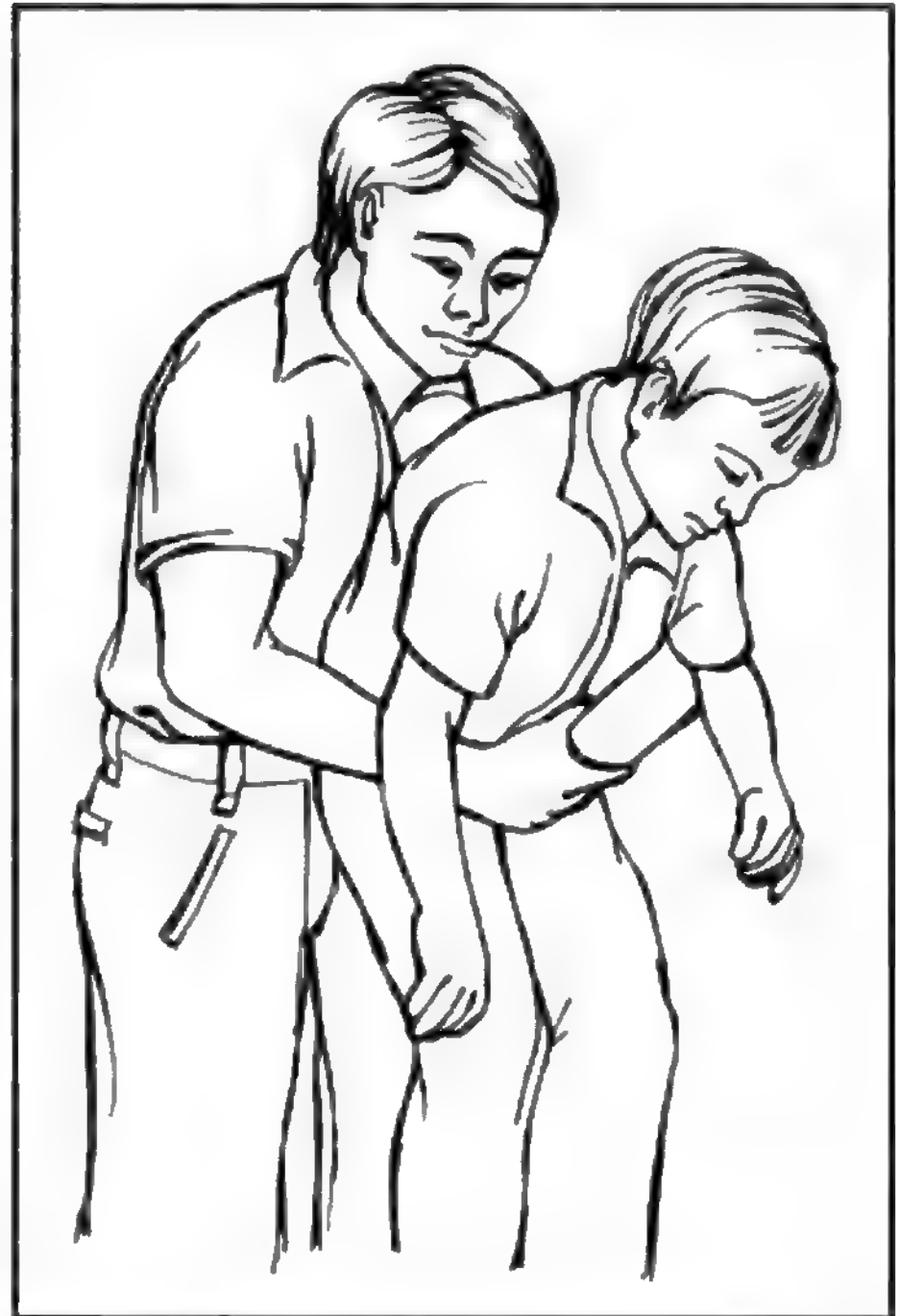


Fig. 5. Esecuzione della m. di H. nel bambino cosciente di età superiore a un anno fino all'adolescenza.

In caso di assenza della coscienza, si dispone il bambino in posizione supina inginocchiandosi ai suoi piedi se il bambino si trova sul pavimento o restando in piedi se è disposto invece al di sopra di un tavolo. Si passa quindi ad eseguire la compressione epigastrica nel modo usuale.

6. *Autoapplicazione della manovra di Heimlich.* – Se un paziente inala un corpo estraneo con ostruzione respiratoria acuta, ed ha sufficiente prontezza di spirito, può eseguire la manovra di Heimlich su se stesso per liberare le vie aeree. A tale scopo dispone una mano a pugno appoggiandola dalla parte del pollice sull'addome in un punto a metà strada tra ombelico ed apofisi xifoide sternale. Afferra quindi il pugno con l'altra mano e comprime bruscamente l'addome per alcune volte posteriormente e verso l'alto in modo da innalzare il diaframma. Se la manovra fallisce lo scopo può essere raggiunto comprimendo sempre bruscamente la parte superiore dell'addome contro una superficie rigida quale ad esempio, il margine di un tavolo.

Complicazioni

Consistono essenzialmente in lesioni viscerali (fegato, stomaco) od in fratture ossee (apofisi xifoide, coste) dovute ad una eccessiva compressione esercitata sul punto sbagliato. Bisogna rispettare rigorosamente la linea addominale mediana e non appoggiarsi sulla apofisi xifoide né sulle costole.

Bibliografia

- Miles K., Morton R., Page G., *Color atlas and text of Emergencies*, 2 ed., 1995, Mosby-Wolfe.
 Roberts J. R., Hedges J. R., *Medicina di urgenza e Pronto Soccorso*, 1994, UTET, Torino.
 Rubenstein E., Federman D. D., *Medicine, Pocket Edition*, 1993, Scientific American, New York, pp. 217-220, 233-235.
 Standards and Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation (CPR) and Emergency Cardiac Care, *JAMA*, 1986, **255**, 2915.

ERMANNO DOMENICHINI

HEIMLICH, VALVOLA DI: V. PNEUMOTORACE.**
**HELICOBACTER GENERE: V. HELICOBACTER GENERE*;
 HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONI DA*;
 HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONI DA**.**
HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONE DA

SOMMARIO

**MICROBIOLOGIA, PATOLOGIA GENERALE E
 INFEZIONI NELL'ADULTO** col. 2591

Microbiologia dell'*Helicobacter pylori* (col. 2591). - **Meccanismi di danno** (col. 2592). - **Epidemiologia** (col. 2593). - **Manifestazioni cliniche dell'infezione** (col. 2593): *Gastrite*. - *Ulcera duodenale e gastrica*. - *Carcinoma gastrico*. - *Linfoma gastrico*. - *Dispepsia*. - **Diagnosi** (col. 2596). - **Terapia dell'infezione da *H. pylori*** (col. 2597).

**INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI* NEL
 BAMBINO** col. 2600

Aspetti epidemiologici (col. 2600): *Studi di popolazione e fattori di rischio*. - *Storia naturale ed effetto coorte*. - *Modalità di diffusione*. - **Sintomatologia** (col. 2601). - **Aspetti endoscopici e istologici** (col. 2602). - **Diagnosi e terapia** (col. 2602).

**MICROBIOLOGIA, PATOLOGIA GENERALE E IN-
 FEZIONI NELL'ADULTO**
Microbiologia dell'*Helicobacter pylori*

L'*Helicobacter pylori* è un batterio gramnegativo, di forma curva o spirale, ma che in condizioni ambientali sfavorevoli, può assumere anche un aspetto coccoide. Possiede 2-6 flagelli unipolari ricoperti da una membrana flagellare tipica del genere *Helicobacter* (v. **HELICOBACTER GENERE***).

Il batterio può essere coltivato a 37 °C in ambiente microaerofilo ed è identificabile per la spiccata positività della reazione ureasica e per la presenza di catalasi ed ossidasi.

Fattori di virulenza. - L'*H. pylori* presenta diverse caratteristiche che gli consentono di colonizzare la mucosa gastrica e proliferare nonostante le difese dell'ospite.

Motilità. - La presenza dei flagelli e la conformazione spiraliforme conferiscono all'*H. pylori* una notevole motilità, che gli consente di superare agevolmente un ambiente vischioso, come il muco gastrico e raggiungere lo strato epiteliale. In condizioni sperimentali, in maialini gnotobiotici, si è osservato che mutanti immobili di *H. pylori* sono dotati di una molto scarsa capacità di colonizzazione della mucosa.

Ureasi. - Circa il 6% delle proteine del batterio sono rappresentate da un enzima, l'ureasi, in grado di scindere l'urea in anidride carbonica ed ammoniaca, la quale ultima neutralizza l'acido gastrico in misura sufficiente a garantire la sopravvivenza del batterio. In modelli animali, ceppi mutanti ureasi-negativi non sono infatti risultati in grado di infettare l'ospite.

Adesione cellulare. - In modo caratteristico l'*H. pylori* colonizza solo le cellule epiteliali dello stomaco o di tessuto gastrico, ed può essere presente anche in duodeno, diverticolo di Meckel, esofago di Barrett. Questa specificità è dovuta alla presenza di particolari strutture molecolari, le ade-

sine, che presentano una assoluta specificità per i recettori delle cellule epiteliali dello stomaco. Ancora poco nota è la natura di questi recettori. I potenziali candidati sulla superficie batterica includono la N-acetil-neuraminalattosio ed alcune agglutinine, mentre sulla superficie delle cellule gastriche possono essere interessati la fosfatidiletanolamina e gli antigeni Lewis b (Le-b) che fanno parte degli antigeni del gruppo sanguigno O. Indagini ultrastrutturali hanno evidenziato un'adesione cellulare molto accentuata con la formazione da parte delle cellule epiteliali di podociti con apparente fusione delle pareti cellulari.

Citotossine. - Molti ceppi di *H. pylori* secernono sostanze in grado di indurre vacuolizzazione del citoplasma delle cellule epiteliali: citotossine vacuolizzanti, che sono determinanti nella patogenesi della lesione gastrica e che possono essere quindi la causa dei diversi decorsi clinici dell'infezione. Non è chiaro quali e quante siano le citotossine coinvolte nel processo infettivo.

Nei pazienti con forme particolarmente severe di gastrite o con ulcera duodenale si sono isolati con maggior frequenza ceppi batterici in grado di produrre una citotossina A, del peso molecolare di circa 80 kD, che si associa ad un antigene proteico superficiale di circa 120 kD, noto come proteina Cag-A (*Cytotoxin associated gene A*). L'azione citotossica è accentuata dall'ammoniaca prodotta dall'attività ureasica che, oltre all'azione neutralizzante, esercita un effetto citopatico diretto e di rottura dei ponti intercellulari.

Altri probabili fattori di virulenza. - *H. pylori* libera, oltre l'ureasi, altri enzimi: proteasi e fosfolipasi A2 e C, che diminuiscono la viscosità del muco e riducono la idrofobicità della superficie cellulare; catalasi e superossidodismutasi, responsabili della resistenza alla fagocitosi; sostanze proinfiammatorie, come il fattore attivante le piastrine (PAF) che oltre ad esercitare un'azione chemiotattica sui leucociti polimorfonucleati, possiede una notevole attività ulcerogena.

Meccanismi di danno

Osservazioni sperimentali ed istologiche consentono di proporre, pur con molte cautele, alcune tappe patogenetiche dell'infezione da *H. pylori*.

Orientamento chemiotattico e penetrazione nello strato mucoso. - L'elevata produzione di ureasi e la presenza di flagelli monopolari conferiscono al microorganismo la protezione e la mobilità necessarie per sfuggire agli effetti lesivi del succo gastrico. La produzione di enzimi mucolitici, fosfolipasi e fosfatasi, consente il successivo attraversamento dello strato mucoso e il raggiungimento delle cellule epiteliali della mucosa.

Adesione alle cellule epiteliali. - A livello epiteliale l'*H. pylori* può indurre alterazioni della idrofobicità di superficie distruggendo i fosfolipidi attivi mediante una fosfolipasi A2. La presenza di recettori specifici (batterici e cellulari) consente inoltre l'adesione del batterio alla superficie cellulare.

Penetrazione cellulare. - Questo fenomeno descritto da alcuni AA., ma negato da altri, avverrebbe in seguito alla formazione di podociti da parte delle cellule epiteliali, con successiva penetrazione intracellulare attraverso un meccanismo di endocitosi.

Il danno tessutale sarebbe aggravato dalla produzione di citotossina vacuolizzante, di ammoniaca e di PAF.

Reazione immunitaria. - Un ruolo patogenetico importante riveste infine la risposta infiammatoria dell'ospite che si estrinseca attraverso il rilascio di numerose citochine (interleuchina-1, interleuchina-8, *tumor necrosis factor*). L'interleuchina-8 (IL-8), in particolare, condiziona la comparsa di macrofagi, linfociti (follicoli linfoidi) e di un denso infil-

trato di polimorfonucleati. In particolare i neutrofili possono aumentare il danno mucoso mediante liberazione di enzimi proteolitici (elastasi, collagenasi, mieloperossidasi e proteasi neutra).

L'estensione del danno mucoso può essere influenzata dalla mancata attivazione dei neutrofili e dalla generazione di radicali liberi (indotte dall'IL-8), da parte di autoanticorpi anti-IL-8.

Azione sulla fisiologia gastrica. - Numerose osservazioni sperimentali hanno documentato, in corso di infezione da *H. pylori*, un aumento della concentrazione di gastrina in condizioni basali, in risposta ad un pasto proteico o a stimolo selettivo con bombesina, con ritorno alla normalità dopo trattamento eradicante.

I meccanismi ipotizzati per spiegare tale osservazione sono tre: 1) stimolo all'increzione di mediatori dell'infiammazione (citochine), del fattore di necrosi tumorale, dell'interferone e del *gastrin release peptide*; 2) aumento del pH (fino a valori prossimi alla neutralità) a livello della superficie dell'epitelio antrale, secondario alla produzione di ammonio da parte dell'ureasi batterica; 3) riduzione della concentrazione locale (per ridotta sintesi da parte delle cellule D) di somatostatina che inibisce, in condizioni normali, la liberazione di gastrina.

Anche i livelli di pepsinogeno, in particolare il tipo A (o tipo I, secreto nel fondo gastrico) sono aumentati, con meccanismo probabilmente, ma non sicuramente, associato ad un'aumentata sintesi. In ogni caso anche l'iperpepsinogenemia è reversibile dopo trattamento eradicante.

I rapporti tra ipergastrinemia ed iperpepsinogenemia e secrezione acida non sono chiari. La secrezione acida riconosce infatti una curva bifasica. Ad una condizione iniziale di ipoacidità (probabilmente per retrodiffusione idrogenionica) succede una ipersecrezione acida che può persistere nonostante la normalizzazione della gastrinemia dopo terapia antibiotica.

Epidemiologia

L'infezione da *H. pylori* è senz'altro una delle più comuni infezioni che colpiscono l'uomo.

Malnutrizione, bassa classe sociale e sovraffollamento sono fattori che aumentano il rischio di acquisire l'infezione in età giovanile e che determinano le ampie variazioni di prevalenza osservate nelle varie zone geografiche. Nei paesi occidentali, il rischio di infezione aumenta fortemente con l'età, con una prevalenza del 50-60% circa nei soggetti di 50-60 anni e con riduzione progressiva nei decenni successivi in coincidenza dell'aumento di frequenza di gastrite cronica atrofica (che ostacola lo sviluppo del microorganismo). Nei paesi sottosviluppati, il rischio di infezione è già elevatissimo nei primi decenni di vita. Il mezzo di propagazione principale è poco noto, ma si ritiene sia rappresentato dall'acqua potabile contaminata per via oro-fecale da forme coccoidi dell'*H. pylori*. Ancora incerta è la possibilità di una trasmissione salivare. Infatti la presenza del germe nella placca dentaria non sembra accompagnarsi ad un significativo aumento di prevalenza nei soggetti a rischio, quali ad esempio i dentisti.

Manifestazioni cliniche dell'infezione

Gastrite

Il ruolo etiologico dell'*H. pylori* nella gastrite non autoimmune (o gastrite B) è sostenuto da osservazioni di tipo epidemiologico, sperimentale e terapeutico. Osservazioni epidemiologiche propongono un'associazione tra gastrite B e batterio in percentuale variabile dal 50% nelle forme croniche inattive fino al 100% nelle forme associate ad intensa attività flogistica. La distribuzione topografica è variabile potendo interessare prevalentemente l'antrum gastrico (*gastrite antrale*), oppure il corpo (*gastrite del corpo*) oppure l'intero stomaco (*pangastrite*). L'esordio si caratte-

rezza per la presenza di lesioni citopatiche foveolari e superficiali e per fenomeni di acuzie infiammatoria particolarmente accentuati (infiltrato di neutrofili, plasmacellule e linfociti). La persistenza dell'infezione conduce ad una prevalenza dell'infiltrato tipico della flogosi cronica, che si estende a tutta la mucosa circondando gli elementi ghiandolari con tendenza alla progressiva distruzione, fino al quadro della gastrite cronica atrofica e, infine, dell'atrofia gastrica. Il cospicuo infiltrato di linfociti B (normalmente assenti nella mucosa gastrica), cioè il cosiddetto MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*), costituisce il substrato per lo sviluppo di un particolare linfoma a cellule B (*mal-toma*).

Un'ulteriore conferma del ruolo etiologico dell'*H. pylori* è fornita dalla risposta anatomica al trattamento. Dopo eradicazione si osserva infatti la scomparsa delle lesioni epiteliali e dell'attività granulocitaria. Molto più tardiva e parziale è la riduzione dell'infiltrato cronico (in particolare plasmacellule IgA, mastociti, macrofagi e linfociti B e T).

Ulcera duodenale e gastrica

Pur in assenza di dimostrazioni sperimentali, l'associazione tra infezione da *H. pylori* ed ulcera peptica appare evidente sulla base di osservazioni epidemiologiche e terapeutiche. L'infezione e la gastrite di tipo B da essa indotta sono evidenziabili in oltre il 95% delle ulcere duodenali ed in circa il 90% delle ulcere gastriche non associate a impiego di FANS. I risultati di sperimentazioni cliniche controllate hanno evidenziato una significativa riduzione del rischio di recidiva ulcerosa dall'80% annuo nei pazienti *H. pylori*-positivi a valori medi del 4% nei soggetti eradicati (tab. I). Si ritiene quindi attualmente che la classica ipotesi acida dell'ulcera peptica vada integrata con quella infettiva in un'unica teoria unificante che definisce l'ulcera come la risultante di uno squilibrio tra fattori ambientali (infezione da *H. pylori*, fumo, stress), fattori genetici (massa delle cellule parietali, iperpepsinogenemia, gruppo sanguigno 0) e capacità di difesa dell'ospite.

Carcinoma gastrico

Il rapporto tra infezione da *H. pylori* e tumori gastrici epiteliali è attualmente suggerito da dati di tipo epidemiologico.

Le osservazioni più numerose derivano da indagini di tipo descrittivo concernenti le analogie tra distribuzione geografica e prevalenza dell'infezione e del cancro gastrico. Informazioni più precise, che possono suggerire anche un possibile ruolo causale, derivano da studi trasversali e soprattutto da studi prospettici, che dimostrano nei pazienti *H. pylori* positivi un rischio di ammalare di cancro gastrico superiore da 2,8 a 6,0 volte rispetto ai controlli *H. pylori* negativi (tab. II, A).

La patogenesi non è ancora nota. Si ipotizzano meccanismi di lesività indiretta e diretta tra loro strettamente cor-

TAB. I. *H. PYLORI* E PERCENTUALI DI RECIDIVA DEI PRINCIPALI STUDI CONTROLLATI CONDOTTI IN PAZIENTI CON ULCERA GASTRICA E DUODENALE (MEDIANA E RANGE)

	Ulceri duodenali	Ulceri gastriche
<i>H. pylori</i> -positivi	80% (28-100%)	65% (56-75%)
<i>H. pylori</i> -negativi	4% (0-22%)	5% (0-3%)

HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONE DA

relati (tab. III). Il meccanismo di lesività indiretta è rappresentato dal rapporto tra infezione e rischio di gastrite atrofica con comparsa di alterazioni metaplastiche (in particolare metaplasia intestinale di tipo III) e displastiche. Con queste modificazioni istologiche interagiscono numerosi fattori genetici, ambientali (ad es. apporto di sale da cucina, di nitriti e nitrati) e meccanismi di lesività diretta batterica. Si ipotizza che questi ultimi siano rappresentati da:

a) reazioni ossidative derivanti dall'attivazione di macrofagi e polimorfonucleati con eccesso di radicali liberi e danno del DNA delle cellule epiteliali dei colletti delle ghiandole gastriche;

b) azione di citochine e dell'ammoniaca prodotta dall'attività ureasica del batterio sulla produzione dell'EGF (fattore di crescita epidermica) ed infine sull'aumento di produzione cellulare;

c) diminuzione indotta da *H. pylori* degli antiossidanti fisiologici, acido ascorbico in particolare, di cui è noto il ruolo protettivo nei confronti del DNA e la capacità di inibire la formazione intragastrica di composti nitrosati.

A queste osservazioni che sembrano deporre per un rapporto causale, si oppongono tuttavia le seguenti obiezioni:

a) la correlazione tra prevalenza di infezione e quella di cancro gastrico è incostante;

b) l'infezione è normodistribuita fra i due sessi mentre il cancro è più frequente nei maschi;

c) l'infezione si correla con i due tipi istologici di cancro gastrico (intestinale e diffuso), mentre l'ipotesi gastrite acuta → gastrite cronica → metaplasia → displasia → cancro si limita alla forma istologica di tipo intestinale.

In un tentativo di conciliare queste opposte osservazioni, si sono proposti due possibili ordini di fattori etiologici del cancro gastrico. Il 60% dei carcinomi gastrici può essere in effetti considerato la risultante della integrazione di fattori infettivi (*H. pylori*), dietetici e genetici. Il restante 40% riconoscerebbe un meccanismo patogenetico assolutamente sganciato dall'infezione da *H. pylori*.

Linfoma gastrico

Per quanto concerne il rapporto tra *H. pylori* e linfoma gastrico primitivo a cellule B (*maltoma*) il sospetto di un rapporto causale è suggerito dalle seguenti osservazioni.

TAB. II. STUDI PROSPETTICI CONCERNENTI IL RISCHIO DI AMMALARE DI CANCRO O DI LINFOMA GASTRICO IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA *H. PYLORI*

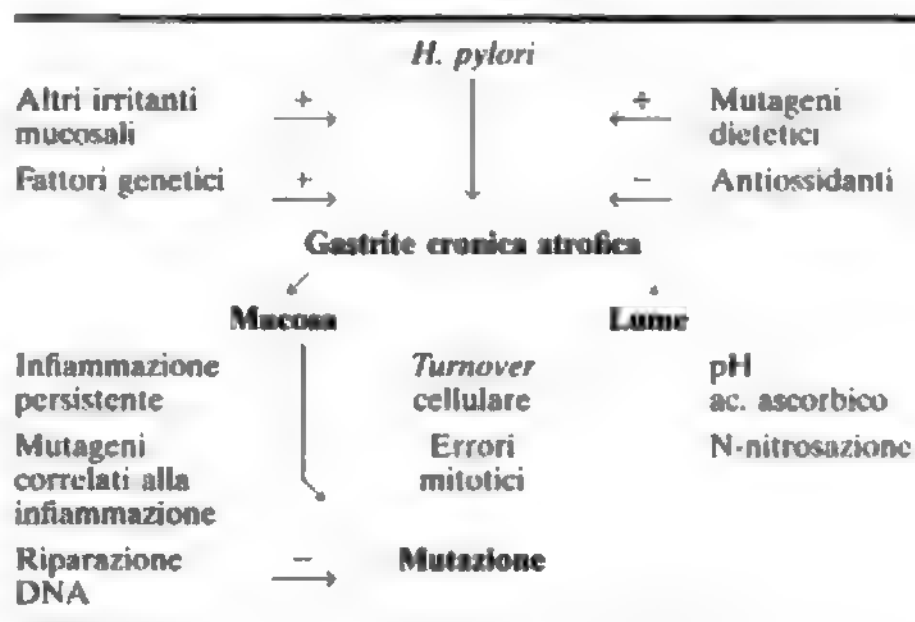
A) Cancro gastrico

Autore	Casi <i>H. pylori</i> +	Controlli <i>H. pylori</i> -	Odds ratio	Rischio calcolato
Forman, 1991	69%	47%	2,8	46%
Nomura, 1991	94%	76%	6,0	79%
Parsonnet <i>et al.</i> , 1991	84%	66%	3,6	61%

B) Linfoma gastrico

Autore	Linfoma	% soggetti infetti		Odds ratio
		Casi	Controlli	
Parsonnet <i>et al.</i> , 1991	Intestinale	91%	64%	4,0
Parsonnet <i>et al.</i> , 1991	Gastrico	88%	55%	6,3
	Non gastrico	61%	59%	1,2

TAB. III. *H. PYLORI* E CANCRO GASTRICO: IPOTESI PATOGENETICA



1) L'*H. pylori* è la causa più frequente di infiltrazione linfocitaria della mucosa gastrica (*mucosa associated lymphoid tissue [MALT]*).

2) Osservazioni *in vitro* hanno dimostrato che ponendo a contatto alcuni ceppi di *H. pylori* con cellule di linfoma gastrico B a bassa malignità si ha attivazione dei linfociti T, liberazione di linfocine ed infine attivazione e proliferazione dei linfociti B.

3) Osservazioni epidemiologiche trasversali e due studi prospettici suggeriscono un rischio aumentato (da 4 a 6 volte) di ammalare di *maltoma* nei pazienti infettati da *H. pylori* (v. sopra, tab. II, B).

Dispepsia

Ancora controverso è il ruolo dell'infezione da *H. pylori* nella dispepsia funzionale.

La difficoltà di una corretta definizione della sindrome dispeptica, la mancanza di correlazione tra gastrite e sintomi e la presenza dell'infezione nei soggetti asintomatici rendono difficile la raccolta di dati epidemiologici e la valutazione di sperimentazioni terapeutiche, soprattutto nel breve termine.

Gli studi di prevalenza con indagini endoscopiche non hanno evidenziato una maggior frequenza dell'infezione rispetto ai controlli sani e nessuna correlazione è stata sicuramente osservata tra infezione e presenza di disturbi soggettivi.

Le sperimentazioni terapeutiche hanno fornito risultati controversi anche se, nei pochi studi condotti con osservazione clinica prolungata dopo trattamento antinfettivo, si è osservata nei soggetti eradicati, rispetto ai controlli infetti, una significativa riduzione delle manifestazioni soggettive inquadrabili come dispepsia similulcerosa (epigastralgie, pirosi epigastrica).

Diagnosi

I test disponibili possono essere raggruppati in 5 categorie principali, a loro volta suddivisibili in test invasivi (istologia con almeno 2 prelievi dell'antro e del corpo gastrici, esame colturale, test rapido all'ureasi, test PCR) e non invasivi (test del respiro con ^{13}C o ^{14}C ; *urea breath test [UBT]*); determinazione degli anticorpi specifici, IgG, IgM, IgA). La scelta dei vari esami dipende dai costi, dal tipo di patologia e dagli obiettivi diagnostici e terapeutici.

Nella diagnostica di un'ulcera peptica ed in previsione dell'impiego di farmaci è consigliabile l'attuazione dell'esame istologico (eventualmente associato a test rapido

o ad esame culturale). Una ripetizione della biopsia per la valutazione del successo terapeutico può essere facoltativa negli ulcerosi duodenali asintomatici, ma è in ogni caso consigliabile nell'ulcera gastrica e nei soggetti anziani. Per la valutazione dell'eradicazione nei pazienti con ulcera duodenale e nel *follow-up* in soggetti asintomatici può essere invece utilizzato il test del respiro che costituisce ancora, tuttavia, una alternativa costosa e disponibile solo in Centri specialistici di riferimento.

La sierologia infine, costituisce un utile test per indagini epidemiologiche e secondo alcuni AA. anche per la valutazione dell'effettivo rischio di recidiva, al fine di ridurre il carico endoscopico, nel *follow-up* di pazienti dispeptici di giovane età.

Terapia dell'infezione da *H. pylori*

Il trattamento eradicante costituisce attualmente l'intervento di prima scelta nelle ulcere peptiche *H. pylori*-positive, sia per migliorare le percentuali di cicatrizzazione, sia soprattutto per prevenire le recidive. La capacità di incidere positivamente sulla storia naturale della malattia ulcerosa costituisce indubbiamente un importante progresso nei confronti dei farmaci antisecretivi tradizionali. I risultati delle sperimentazioni disponibili condotte in genere sino a 12-24 mesi sono evidenziate nella tab. I (v. sopra col. **2594).

Nel tentativo di ottimizzare la terapia eradicante (intendendo per eradicazione l'assenza dell'*H. pylori* a partire da 4-6 settimane dopo la sospensione del trattamento farmacologico) sono stati proposti diversi schemi terapeutici che prevedono la somministrazione di un singolo farmaco antibatterico (monoterapia) oppure l'associazione di un antisecretivo (omeprazolo, ranitidina) o di un composto di bismuto con uno (duplice terapia) o due (triplice terapia) antibiotici.

I migliori risultati sono stati ottenuti con le associazioni farmacologiche.

Per la duplice terapia, particolari spunti di interesse riveste l'associazione di inibitori della pompa protonica (omeprazolo 20, 40, 80 mg al giorno; lansoprazolo 30 mg al giorno; pantoprazolo 40 mg al giorno) con claritromicina (250 mg *t.i.d.* [*ter in die*] o *q.i.d.* [*quarter in die*]) od amoxicillina (1 g *b.i.d.* [*bis in die*] o *t.i.d.*) per 10-14 giorni (fig. 1). La risposta terapeutica è tuttavia molto variabile con percentuali di successo comprese tra il 40 ed il 90%. I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando dosi refratte (ad es. omeprazolo 20 mg *b.i.d.*) facendo coincidere l'inizio della terapia antibiotica con quello della terapia antisecretiva.

I vantaggi della duplice terapia sarebbero costituiti da un rapido effetto analgesico, dalla facilità di assunzione e dal rischio modesto di effetti collaterali.

La terapia certamente più sperimentata è quella che associa almeno due antibiotici al bismuto colloidale subcitratato (CBS) (fig. 2) oppure agli inibitori della pompa protonica (fig. 3) od alla ranitidina. Gli schemi maggiormente utilizzati prevedono l'impiego di CBS (120 mg *q.i.d.*) od antisecretivi (omeprazolo 20 mg *b.i.d.*, o lansoprazolo 30 mg *b.i.d.*, o pantoprazolo 40 mg *b.i.d.*, o ranitidina, 150 mg *b.i.d.*) associati a tetraciclina 250 mg *q.i.d.* (oppure amoxicillina 2 g *die*) e metronidazolo 250 mg *q.i.d.* (oppure tinidazolo 500 mg *b.i.d.*) per una durata di 7-14 giorni.

In alternativa all'amoxicillina o alla tetraciclina è stato recentemente proposto l'impiego di un macrolide (claritromicina 250 mg *b.i.d.-q.i.d.*).

Nei casi resistenti ai nitroimidazolici si è suggerita infine l'associazione di inibitori della pompa protonica, amoxicillina e claritromicina.

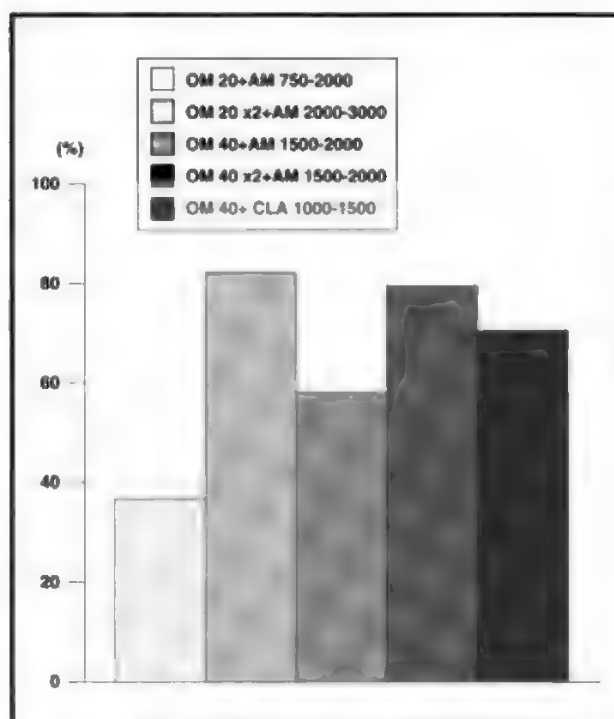


Fig. 1. *H. pylori*: duplice terapia con omeprazolo. Percentuali mediane di eradicazione. (OM) omeprazolo; (AM) amoxicillina; (CLA) claritromicina. I dosaggi sono espressi in mg per i periodi di assunzione variabili tra 7 e 14 giorni.

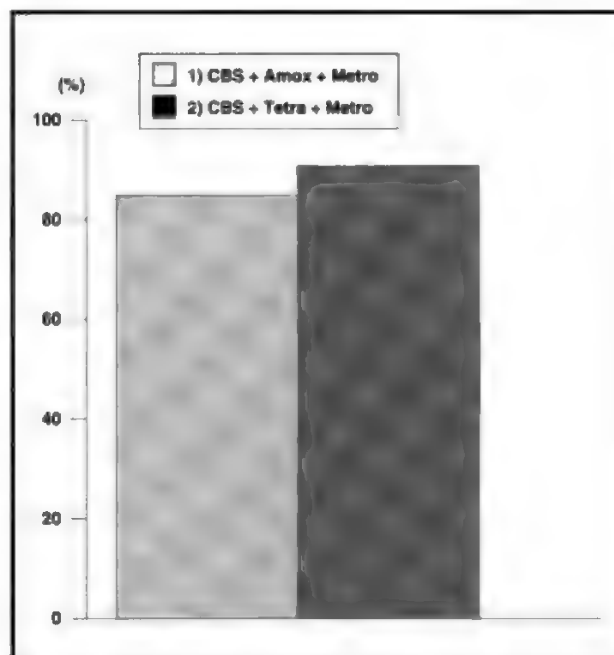


Fig. 2. *H. pylori*: triplice terapia con bismuto colloidale subcitratato (CBS). Percentuali mediane di eradicazione. 1) CBS 120 mg $\times$ 4 per 14-28 giorni + Amoxicillina 750-2000 mg per 7-14 giorni + Metronidazolo 800-1500 mg per 7-14 giorni. 2) CBS 120 mg $\times$ 4 per 14-28 giorni + Tetraciclina 750-1500 mg per 7-14 giorni + Metronidazolo 800-1500 mg per 7-14 giorni.

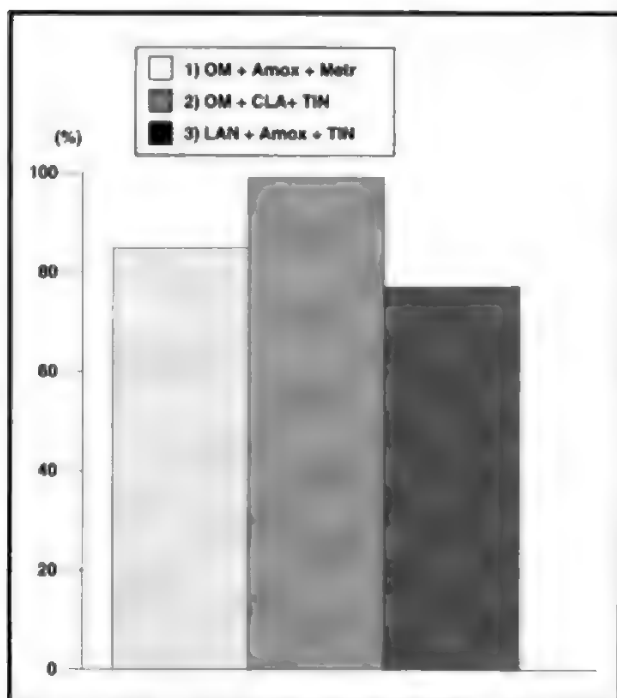


Fig. 3. *H. pylori*: triplice terapia con inibitori della pompa protonica. Percentuali mediane di eradicazione. 1) Omeprazolo 40 mg per 7 giorni + Amoxicillina 2000 mg + Metronidazolo 1000 mg per 7 giorni. 2) Omeprazolo 40 mg per 7 giorni + Claritromicina 500 mg + Tinidazolo 1000 mg per 7 giorni. 3) Lansoprazolo 60 mg per 7 giorni + Amoxicillina 2000 mg + Tinidazolo 1000 mg per 7 giorni.

I risultati sono confortanti per quanto concerne l'eradicazione (con percentuali variabili dal 65 al 98%) e l'accettabilità da parte del paziente (elemento fondamentale per la buona riuscita della terapia).

Va tuttavia considerato il fatto che, rispetto alla duplice terapia, l'associazione di due antibiotici comporta un maggior rischio di effetti collaterali in genere moderati: nausea, infezioni fungine, diarrea, raramente anche gravi (colite pseudomembranosa).

Di notevole interesse sono infine le osservazioni circa la possibilità che il trattamento antifettivo possa ridurre anche il rischio di complicanze emorragiche da ulcera.

In studi controllati della durata di circa 2 anni le recidive emorragiche risultarono assenti nei soggetti eradicati e presenti nel 29-37% dei controlli *H. pylori*-positivi.

Per quanto concerne infine il problema dei pazienti candidati al trattamento antifettivo, si ritiene attualmente che la terapia eradicante vada attuata in prima istanza in tutti i soggetti con ulcera attiva o cicatrizzata *H. pylori*-positiva e nei pazienti con linfoma MALT a basso grado di malignità (v. LINFOMI**), con gastrite con gravi anomalie istologiche e nei soggetti operati per *early gastric cancer*. Per i pazienti con dispepsia funzionale il problema è ancora dibattuto; si ritiene che siano suscettibili di trattamento solo i soggetti sintomatici e resistenti ai trattamenti con antiacidi o procinetici.

Non rimane che insistere per il trattamento delle gastriti *H. pylori*-positive sintomatiche.

Bibliografia

Atherton J. C., Blaser M. J., *Helicobacter Infections*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1998, McGraw-Hill, New York.

- Bianchi Porro G., Parente F., Maconi G., *Helicobacter pylori verso il 2000: dalla controversia al consenso*, 1995, Cortina, Verona.
 Blaser M. J., *Gastroenterology*, 1992, **102**, 720-727.
 Correa P., *N. Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 1170-1171.
 Cover T. L., Blaser M. J., *Helicobacter pylori Infection*, in Schrier R. W. et al., *Advances in Internal Medicine*, 1996, Mosby-Year Book, St. Louis, pp. 85-117.
 Forman D. et al., *Brit. Med. J.*, 1991, **302**, 1302-1305.
 Graham D. Y., Klein P. D., Evans D. G. et al., *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1992, **4** (suppl. 1), 1-6.
 Graham D. Y., Opekun A., Lee G. M., Klein P. D., Walsh J. H., *Gastroenterology*, 1991, **100**, 1571-1575.
 Holtmann G., Lauer P., Goebell H., *Lancet*, 1996, **347**, 763.
 Hunt R. H., Mohamed A. H., *Scand. J. Gastroenterol.*, 1995, **30** (Suppl. 208), 47-52.
 Logan R. P. et al., *Gut*, 1994, **35**, 323.
 Markham A., McTavish D., *Drugs*, 1996, **51**, 1611-1628.
 Nomura A., Stemmermann G. N., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1993, **8**, 294-303.
 Parsonnet J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 1127-1131.
 Parsonnet J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1267-1271.
 Penston J. G., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1994, **8**, 369-389.
 Tytgat G. N. J., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1994, **8**, 359-368.
 Yousfi M. M., El-Zimaity H. M. T., Al-Assi et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1995, **9**, 209-212.
 Yousfi M. M., El-Zimaity H. M. T., Cole R. A. et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1996, **10**, 119-122.

GABRIELE BIANCHI PORRO E MARCO LAZZARONI

INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI* NEL BAMBINO

La dimostrazione della presenza di batteri spiraliformi gramnegativi, attualmente chiamati *Helicobacter pylori*, a livello dell'antro gastrico di bambini con gastrite cronica associata o meno con ulcera peptica è avvenuta nel 1986. Da allora numerosi lavori hanno dimostrato che l'*H. pylori* è un batterio patogeno anche in età pediatrica, sebbene la prevalenza della infezione sia minore e la patologia associata generalmente meno severa che nell'età adulta.

Aspetti epidemiologici

Studi di popolazione e fattori di rischio

L'uso di metodiche diagnostiche non invasive, come la sierologia o il [¹³C]-urea breath test, ha dimostrato che la diffusione dell'infezione da *H. pylori* dipende dall'età e dalle aree considerate. Sono state così identificate aree ad alta prevalenza nei paesi in via di sviluppo (Asia ed Africa), dove l'infezione è presente in quasi tutta la popolazione a partire dai primi anni di vita, e aree a bassa prevalenza nei paesi sviluppati (Europa, U.S.A., Giappone), dove l'infezione è rara in età pediatrica e la prevalenza aumenta proporzionalmente con l'età. In Italia e in Europa la prevalenza dell'infezione è del 5-6% nel primo decennio di vita e del 16-17% nel secondo decennio.

Tra i fattori che svolgono un ruolo importante nella diffusione dell'infezione nelle diverse età della vita e nelle diverse aree geografiche, i più importanti sono etnici, socioeconomici e genetici. L'importanza dei fattori etnici, è suggerita dalla differenza in sieroprevalenza tra diverse popolazioni abitanti negli stessi paesi: in Belgio, ad es., il 20% dei bambini di origine africana o mediterranea è infetto, contro il 5,6% dei bambini caucasici; negli U.S.A., l'infezione è più diffusa nella razza negra che in quella bianca. È comunque difficile separare i fattori etnici da quelli socioeconomici, poiché nella maggior parte dei casi essi operano contemporaneamente. Infatti, esiste una relazione tra infezione e fattori socioeconomici di rischio, e, in particolare, una relazione inversa tra infezione e reddito annuo (tab. IV). L'esistenza di una correlazione tra infezione in età adulta e condizioni socioeconomiche degli stessi soggetti durante l'infanzia ha suggerito che il momento di acquisizione dell'infezione da *H. pylori* sia l'età infantile, anche nei cosiddetti paesi sviluppati.

TAB. IV. FATTORI SOCIOECONOMICI DI RISCHIO DI INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI* IN ETÀ PEDIATRICA

Basso reddito annuo familiare

Altri marcatori socioeconomici

Nascita in un paese in via di sviluppo
Sovraffollamento domestico
Assenza di acqua calda interna
Assenza di gabinetto interno
Assenza di frigorifero
Letto comune

Storia naturale ed effetto coorte

Importanti informazioni sulla storia naturale dell'infezione da *H. pylori* derivano da studi longitudinali su sieri conservati appartenenti agli stessi soggetti, ma prelevati in anni successivi. Questi studi hanno dimostrato che soggetti della stessa età, ma di generazioni, o coorti, successive, mostrano una riduzione della sieropositività, suggerendo che l'infezione da *H. pylori* sia diminuita negli ultimi decenni. Inoltre, il tasso di infezione annuo nell'adulto, compreso tra lo 0,3% e lo 0,5%, sembra assai più basso di quanto atteso dai primi studi trasversali. Sembra infine evidente che la maggior parte degli adulti infetti abbia contratto l'infezione nei primi 15 anni di età, e che l'attuale tasso di infezione annuo nei bambini di paesi sviluppati sia di circa l'1,5%.

In conclusione, sebbene la prevalenza dell'infezione sia minore nel bambino che nell'adulto, ed aumenti in quest'ultimo con l'età fino a valori del 50%, questo incremento rifletterebbe una riduzione dell'infezione legata al miglioramento delle condizioni socio-sanitarie delle coorti più recenti, piuttosto che una maggiore suscettibilità con l'invecchiamento (effetto coorte). Ogni generazione o coorte infatti è esposta ad una situazione ambientale esclusiva e non ripetibile, legata a particolari fattori di rischio.

Modalità di diffusione

L'assenza di un serbatoio animale dell'infezione e l'esistenza di una vistosa diffusione dentro le comunità, le famiglie, gli stessi servizi di endoscopia digestiva, suggeriscono che l'infezione diffonda per contagio interpersonale. In particolare, il 94% dei genitori ed il 72% dei fratelli/sorelle dei bambini infetti ha la stessa infezione. Se un bambino ha un solo genitore infetto, il suo rischio di essere a sua volta infetto è minore che nel caso in cui entrambi i genitori siano colpiti dall'infezione. Se il membro della famiglia infetto è un bambino, gli altri fratelli o sorelle hanno un rischio di infezione pari al doppio di quello che avrebbero se ad essere infetto fosse uno dei genitori.

H. pylori è stato trovato nella saliva e nella placca dentaria, suggerendo che la trasmissione oro-orale sia altamente probabile. In studi nei paesi in via di sviluppo, l'*H. pylori* è stato identificato nell'acqua ed è stata documentata una relazione tra cluster di infezione e forniture d'acqua. Poiché è stato dimostrato che il batterio viene eliminato con le feci, tutti questi dati suggeriscono che anche la trasmissione oro-fecale sia possibile, soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

Sintomatologia

Da un punto di vista clinico, l'infezione da *H. pylori* del bambino, nei paesi sviluppati, compare raramente prima degli otto anni di vita. Il bambino appartiene generalmente ad una famiglia di ulcerosi o di dispeptici e i sintomi, così come le lesioni endoscopiche, sono estremamente vari. Il sintomo più frequente è il dolore addominale ricorrente, non ben localizzato e senza particolare rapporto con i pasti, nel bambino più piccolo. Nel bambino più grande il dolore è in genere epigastrico, spesso notturno e con sintomi

dispeptici associati (vomito, eruttazioni, senso di sconcerto e pesantezza postprandiali, etc.). Sono stati anche descritti rari casi di ematemesi, anemia sideropenica isolata, associazione con ipostaturalità, o con enteropatia protido-disperdente. La maggior parte dei casi, peraltro, è asintomatica. Nei bambini viventi nei paesi in via di sviluppo, l'infezione da *H. pylori* viene contratta nei primi due anni di vita e si associa con enteriti e sindrome da malnutrizione.

Aspetti endoscopici e istologici

Endoscopicamente, solo il 20% dei bambini con *H. pylori* ha lesioni ulcerose, mentre la maggior parte presenta una gastropatia cronica, con un tipico aspetto micronodulare in almeno il 50% dei casi. Mentre nell'adulto la quasi totalità delle ulcere duodenali e circa l'80% delle ulcere gastriche sono associate ad infezione da *H. pylori*, nei bambini con ulcera primaria l'associazione con l'infezione sembra meno assoluta. Infatti, nel bambino più piccolo, solitamente di sesso femminile, esistono lesioni ulcerose, più spesso gastriche e con una minore tendenza alla recidiva, senza infezione concomitante. Nei bambini di età superiore agli otto anni, più spesso maschi, le ulcere, quasi sempre duodenali e ricorrenti, sono associate ad infezione da *H. pylori*.

Istologicamente è sempre presente una gastrite cronica, ma a differenza che nell'adulto, essa è attiva (presenza di polimorfonucleati) solo in circa il 40% dei casi e in quasi tutti quelli associati con ulcera. Una peculiarità pediatrica è il quadro di gastrite follicolare (20% dei casi), forse dovuto a iperplasia linfatica con aggregazione in follicoli con centri germinativi.

Il punto cruciale dell'istopatogenesi della malattia peptica da *H. pylori* risiede nella straordinaria eterogeneità biologica della infezione, legata all'interazione tra fattori di virulenza del batterio e risposta dell'ospite. Da una parte vi è un polimorfismo fenotipico del batterio, con produzione di ammoniaca e di citotossine e dall'altra l'individualità genetica dell'ospite, sia nei confronti della suscettibilità a contrarre l'infezione, sia nella risposta immune, in buona parte responsabile, della lesione istologica.

Numerosi e controversi dati sono stati pubblicati sull'interazione tra l'*H. pylori*, gastrina e secrezione acida. Nei bambini è stata osservata una ipergastrinemia, forse secondaria ad iperplasia delle cellule G, responsiva alla terapia eradicante l'infezione o a una diminuzione della somatostatina. Inoltre, i soggetti con ulcera, anche in età pediatrica, mostrano una elevata prevalenza di metaplasia gastrica del bulbo del duodeno, verosimilmente acido-indotta e terreno di ancoraggio extra-gastrico dell'*H. pylori*. È comunque probabile che una maggiore secrezione acida sia indipendente dall'infezione, ma necessaria per l'instaurarsi della lesione ulcerosa.

Diagnosi e terapia

I metodi di diagnosi di infezione da *H. pylori* sono identici nel bambino e nell'adulto: la diagnosi può essere diretta sulla biopsia antrale gastrica o sulla sua coltura, o indiretta, mediante una positività della sierologia specifica (IgG) o del *breath test* con la [¹³C]-urea *breath test* (UBT). È però da sottolineare come la terapia necessiti di un corretto inquadramento della patologia associata all'infezione e quindi si renda necessaria l'endoscopia digestiva.

La storia naturale della malattia nel bambino è caratterizzata dalla persistenza della gastrite cronica e nei casi con ulcera, dalla sua recidiva, in percentuali variabili dal 47% all'80%. È quindi indispensabile eradicare l'infezione nei casi con ulcera, associando una terapia antibiotica o facendola seguire alla fase di cicatrizzazione, come recentemente suggerito nell'adulto. Nei casi di dispepsia non ulcerosa associati a gastrite cronica, sebbene l'eradicazione comporti la guarigione o il miglioramento dell'aspetto istologico, non sempre si assiste ad un miglioramento dei sintomi, come avviene nei casi con ulcera. L'utilizzazione di antibiotici in

monoterapia è del tutto o scarsamente efficace. Le associazioni di amoxicillina (70 mg/kg/die; b.i.d.) e di sali di bismuto colloidale (480 mg di ossido di bismuto/1,73 m² di superficie corporea b.i.d. o t.i.d.) per 2-4 settimane o di 2 antibiotici, quali l'amoxicillina e un nitroimidazolo (tinidazolo 20 mg/kg/die; b.i.d.) per 6 settimane, ottengono eradicazioni intorno al 70-75%.

L'efficacia della terapia antibiotica dipende non solo dalla relativa sensibilità del ceppo batterico, ma in gran parte dalla stabilità e dall'efficacia antibatterica dell'antibiotico in ambiente acido. Questa considerazione, insieme alla conoscenza che un'ipersecrezione acida è comunque un fattore patogenetico fondamentale dell'ulcera e che la compliance agli antibiotici sembra essere migliore somministrando un antisecretivo in associazione, suggerisce l'uso di terapia combinata di antisecretivi ed antibiotici. Le associazioni di amoxicillina ed un antisecretivo ottengono il 46% di eradicazione, mentre l'associazione di omeprazolo (20 mg/die), amoxicillina (50 mg/kg/die; b.i.d.) e claritromicina (15 mg/kg/die; b.i.d.) è efficace nel 90% dei bambini con gastrite da *H. pylori*. Il trattamento con antibiotico deve essere dato per 1-2 settimane, mentre l'antisecretivo va continuato fino a cicatrizzazione avvenuta nei casi con ulcera.

Un attento controllo clinico e non invasivo con ¹³C-UBT è suggerito nei bambini in cui l'infezione da *H. pylori* sia stata eradicata.

Bibliografia

- Megraud F., Brassens-Rabbè M. P., Denis F. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 1870-1873.
 Banatvala M., Mayo K., Megraud F. et al., *J. Infect. Dis.*, 1993, 168, 219-221.
 De Giacomo C., Fiocca R., Villani L. et al., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1990, 11, 310-316.
 De Giacomo C., Lisato L., Negrini R., Licardi G., Maggiore G., *J. Pediatr.*, 1991, 119, 205-210.
 Oderda G., Vaira D., Holton J. et al., *Lancet*, 1989, I, 690-692.
 Drumm B., *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, 1993, 22, 169.

COSTANTINO DE GIACOMO

HERPESVIRUS [v. vol. VII, coll. 1007-1011; Agg. I, coll. *3546-3549]

Classificazione

La famiglia *Herpesviridae* comprende gli herpesvirus (h.) umani e degli animali. Essi vengono classificati in tre subfamiglie in base alle loro caratteristiche biologiche: gli *Alphaherpesvirus*, i *Betaherpesvirus* e i *Gammapherpesvirus* (v. HERPESVIRUS*). Gli *Alphaherpesvirus* hanno ampio spettro d'ospite, breve ciclo replicativo, severo effetto litico sulle cellule infette e la proprietà di andare in latenza nei gangli nervosi sensitivi e del sistema nervoso vegetativo. Comprendono il virus dell'*Herpes simplex* di tipo 1 e di tipo 2 (v. HERPES SIMPLEX; HERPES SIMPLEX*) e il virus della *varicella-zoster* (v. HERPES ZOSTER* [v. v.*]).

I *Betaherpesvirus* hanno un esiguo spettro d'ospite e un lungo ciclo replicativo: l'infezione progredisce lentamente in cellule coltivate *in vitro* e dà luogo facilmente a colture intettate cronicamente con lisi cellulare lieve o assente e la comparsa di cellule giganti (citomegalia). I virus possono andare in latenza in molti organi (ghiandole salivari, organi linfoidi, reni, apparato genitale maschile e femminile e altri tessuti). A questa subfamiglia appartiene il *Cytomegalovirus* e due virus di recente isolamento, denominati HHV-6 e HHV-7 (abbreviazioni della definizione anglosassone *Human Herpesvirus-6* e *Human Herpesvirus-7*).

I *Gammapherpesvirus* infettano *in vitro* soltanto le cellule di linfociti. La stessa famiglia od ordine cui appartiene il

loro ospite naturale. Essi sono tipicamente linfotropi poiché infettano in genere soltanto linfociti B o T, ma alcuni di essi sono in grado di infettare cellule epiteliali e fibroblastiche. Nei linfociti possono dare infezione abortiva o litica, ma generalmente senza produzione di progenie infettante; vanno in latenza nel tessuto linfoide. Comprendono il virus di *Epstein-Barr* (v. EPSTEIN-BARR, VIRUS DI*; EPSTEIN-BARR, VIRUS DI**), il virus della *malattia di Marek*, un herpesvirus dei polli, e due virus delle scimmie, l'*Herpesvirus ateles* e l'*Herpesvirus saimiri*.

Inoltre, recentemente, sequenze genomiche con omologie che fanno supporre l'esistenza di un altro nuovo *Gammapherpesvirus* h., denominato *Human Herpesvirus-8* (v. sotto), sono state identificate nel sarcoma di Kaposi (v. KAPOSI, MALATTIA DI**).

Caratteristiche generali

Le caratteristiche generali dei virus erpetici sono le seguenti:

a) L'acido nucleico è DNA lineare a doppia elica con un peso molecolare variabile da 86 a 150 × 10⁶ dalton. Per la presenza di sequenze ripetute invertite all'interno e all'estremità del genoma di numerosi h., uno o due segmenti di DNA possono invertirsi per un processo di ricombinazione intramolecolare, dando luogo a due o quattro forme isomeriche, tutte infettanti, di DNA virale. Il DNA è contenuto in un nucleotide centrale sospeso all'interno del capsido tramite un sistema di fibrille proteiche.

b) Il capsido, di 100 nm di diametro, è un icosaedro regolare costituito da 162 capsomeri prismatici, dei quali 12 posti ai vertici dell'icosaedro hanno sezione pentagonale e sono circondati da 5 capsomeri, mentre tutti i rimanenti sono esagonali e sono circondati da 6 capsomeri identici.

c) L'involucro esterno dei virioni o pericapside è costituito da una membrana cellulare modificata e contiene lipidi, la cui presenza spiega la sensibilità degli h. ai solventi dei lipidi e ai detergenti. Il pericapside contiene numerosissime protrusioni o propaggini, lunghe 8 nm e molto sottili, uniformemente distribuite sulla sua superficie. La particella virale completa di pericapside ha un diametro variabile da 120 a 300 nm.

d) Caratteristica comune degli h. è di produrre un'infezione persistente e latente: dopo l'infezione primaria, il virus rimane silente nell'organismo e viene riattivato, periodicamente e ripetutamente, da varie condizioni e stimoli, quali immunosoppressione, stati febbrili, esposizione a raggi ultravioletti, periodo mestruale, stress fisici o psichici. La sede di latenza è diversa a seconda della subfamiglia di appartenenza.

e) Numerosi h. determinano trasformazione neoplastica di cellule *in vitro* oppure sono oncogeni nei loro ospiti naturali: il virus della *malattia di Marek* induce neurolinfomatosi nei polli; l'*Herpesvirus saimiri* e l'*Herpesvirus ateles* producono sindromi linfoproliferative e linfomi nelle scimmie; il virus di *Epstein-Barr* è associato con il linfoma di Burkitt e il carcinoma nasofaringeo nell'uomo; inoltre altri due h. umani sono sospettati di svolgere un ruolo etiologico in certi tipi di tumori: l'*Herpes simplex* di tipo 2 nel carcinoma del collo uterino, il *Cytomegalovirus* nei carcinomi della prostata e nel sarcoma di Kaposi (in questo tumore però sembra coinvolto lo *Human Herpesvirus-8*).

f) Il ciclo replicativo degli h. ha tratti peculiari per ogni specie virale, ma alcune caratteristiche, studiate soprattutto nel modello dell'*Herpes simplex*, sembrano essere comuni. Il carattere distintivo del processo di replicazione degli h. è la coordinata e fine regolazione dell'espressione del genoma virale che si sviluppa in tre fasi dove la trascrizione degli RNA per tre classi di proteine, α, β, γ, viene attivata a

cascata. Infatti le proteine strutturali dei virioni infettanti inducono la trascrizione delle proteine α le quali attivano la trascrizione delle proteine β che a loro volta attivano la trascrizione delle proteine γ . Le proteine α e β sono proteine non strutturali, necessarie per la replicazione del DNA virale, e vengono codificate nella fase iniziale dell'infezione. Le proteine γ sono le proteine tardive strutturali che partecipano alla formazione del capsido e pericapside virale.

Nuovi herpesvirus linfotropi

Recentemente sono stati scoperti due h. dotati di spiccato tropismo per i linfociti T, benché in grado di infettare anche linfociti B, macrofagi, fibroblasti e cellule epiteliali. Questi due nuovi h. sono stati denominati HHV-6 e HHV-7. Benché siano linfotropi, il genoma dei due virus è omologo a quello del *Cytomegalovirus* e non a quello dei *Gammaherpesvirus*. Poiché sia HHV-6 che HHV-7 sono causa, durante l'infezione primaria, dell'*exanthema subitum* (v.*), conosciuto anche come *roseola infantum*, o sesta malattia esantematica, essi sono stati riuniti nel genere *Roseolovirus* della subfamiglia *Betaherpesvirus*.

HHV-6 comprende due varianti, A e B. Il virus si trova latente nei linfociti periferici, negli organi linfoidi e nelle ghiandole salivari di individui normali. Viene eliminato frequentemente nella saliva che si pensa rappresenti il veicolo principale della trasmissione del virus. Sia nell'*exanthema subitum* che in individui normali viene isolata con netta prevalenza la variante B. Perciò si ritiene che la variante A circoli con minore frequenza nella popolazione umana e, pur essendo ancora sconosciuto il suo ruolo patogeno, possa essere associata a particolari situazioni o patologie. HHV-6 infetta linfociti CD4+, cioè linfociti T che esprimono sulla membrana citoplasmatica la glicoproteina CD4, un membro della superfamiglia delle immunoglobuline. Il virus al momento dell'isolamento cresce soltanto in linfociti primari, ma si può adattare, dopo ripetuti passaggi in coltura, a moltiplicarsi in linee continue di linfociti T. La quantità di virus extracellulare prodotta è generalmente bassa. Perciò per l'isolamento del virus è spesso necessario coltivare i linfociti del paziente in colture miste con linfociti normali ottenuti da cordone ombelicale che sono molto sensibili all'infezione da HHV-6.

La lesione indotta da HHV-6 consiste nella formazione di cellule giganti e sincizi che poi degenerano con una completa lisi della coltura cellulare. Gli antigeni virali si possono mettere in evidenza nelle cellule infette con reazioni di immunofluorescenza. Lo stesso test può venire usato per la ricerca degli anticorpi e per dimostrare la sieroconversione in corso di *exanthema subitum*.

HHV-6 è stato associato anche ad altre affezioni, quali sindromi febbrili acute non specifiche con o senza eritema, malattie autoimmuni, sindrome da fatica cronica, sindrome da rigetto di trapianti renali o di midollo osseo e neoplasie quali linfoma di Hodgkin e linfomi non-Hodgkin a cellule B. La significatività statistica e la specificità della presenza del virus nei tessuti di questi pazienti rispetto a individui normali sono però ancora da stabilire, per cui un ruolo etiologico di HHV-6 in queste affezioni è ancora incerto.

In relazione alla possibile oncogenicità di HHV-6, è importante notare che il genoma virale completo e alcuni suoi frammenti subgenomici convertono a un fenotipo tumorigeno maligno fibroblasti di topo e cheratinociti umani immortalizzati. Però non è stato ancora dimostrato che il virus sia in grado di trasformare *in vitro* i linfociti che sono il bersaglio principale dell'infezione virale *in vivo*.

Si postula che il ruolo più interessante di HHV-6 sia un suo possibile intervento, come fattore cooperativo con HIV-1, nella progressione e nell'aggravamento del decorso

dell'AIDS. Questa ipotesi è basata su tre solide evidenze: 1) HHV-6 e HIV-1 infettano ambedue i linfociti CD4 con conseguente partecipazione di HHV-6 alla deplezione linfocitaria; 2) nei linfociti infettati da HHV-6 aumenta l'espressione della molecola CD4 che è il recettore per HIV-1, per cui cellule infettate anche latentemente da HHV-6 diverrebbero più sensibili all'infezione da HIV-1; 3) HHV-6 trasattiva il *promoter-enhancer* di HIV-1 aumentando la trascrizione dell'RNA di HIV-1 e favorendone la replicazione. Questi risultati, ottenuti in sistemi sperimentali *in vitro*, sono stati confermati da recenti osservazioni in pazienti con AIDS in fase iniziale nei quali la positività dei linfonodi per sequenze di HHV-6, individuate con reazione polimerasica a catena (PCR), è significativamente più elevata (67%) rispetto a linfonodi di pazienti non infettati da HIV-1 (20%). Perciò anche gli studi *in vivo* suggeriscono che, come conseguenza delle peculiari interazioni fra i due virus, la simultanea presenza di HHV-6 e di HIV-1 all'esordio dell'AIDS possa favorire la replicazione di HIV-1, aumentando così la distruzione delle cellule linfoidi e accelerando la progressione della malattia.

HHV-7, isolato più recentemente di HHV-6 dai linfociti periferici di un individuo sano, è distinto ma simile ad HHV-6 col quale mostra somiglianze antigeniche e una omologia di circa il 40% nelle sequenze genomiche. Anche HHV-7 viene ritenuto causa, al momento dell'infezione primaria, di sindromi febbrili non specifiche e di *exanthema subitum*, dove talvolta si osserva sieroconversione contemporaneamente per HHV-6 e per HHV-7. L'epidemiologia dell'infezione da HHV-7 è in corso di studio. Risultati preliminari, ottenuti negli Stati Uniti e in Giappone, indicano che il virus è presente nella saliva oltre che nei linfociti periferici di individui normali. La ricerca degli anticorpi con un test di immunofluorescenza mostra che dal 40% al 100% dei bambini hanno anticorpi anti-HHV-7 di origine materna nei primi due mesi di vita. La percentuale di individui positivi scende quasi a zero a circa un anno di età e ritorna a valori elevati (45%) fra 1 e 4 anni, raggiungendo il massimo (60-100%) a 11-13 anni di vita. Perciò HHV-7 sembra essere un virus ubiquitario, probabilmente causa di una infezione persistente/latente come tutti gli h., anche se il sito di latenza non è noto. Si pensa che il virus venga riattivato dallo stato di latenza in condizioni di immunosoppressione.

Un aspetto molto interessante, emerso di recente nei confronti di HHV-7, è che il virus non solo infetta preferenzialmente linfociti CD4+, ma li infetta utilizzando come recettore specifico per l'attacco alla cellula proprio la molecola CD4. Poiché il CD4 è anche il recettore di HIV-1, è stato dimostrato che, in condizioni di coinfezione di una cellula con i due virus, si stabilisce uno stato di interferenza fra HHV-7 e HIV-1 per competizione nei confronti dello stesso recettore. Si pensa di poter utilizzare questo fenomeno per poter bloccare l'entrata di HIV-1 nelle cellule dotate di recettore CD4, usando HHV-7 inattivato chimicamente o con raggi ultravioletti oppure impiegando la glicoproteina di superficie di HHV-7 che riconosce specificamente il recettore CD4. Le cellule trattate in questo modo dovrebbero divenire resistenti all'infezione da HIV-1.

Recentemente, utilizzando la reazione polimerasica a catena (PCR), sono state individuate sequenze genomiche di un nuovo h. nel sarcoma di Kaposi. Tali sequenze hanno omologia con il DNA del virus di Epstein-Barr e dell'*Herpesvirus saimiri*. Questo nuovo h. appartiene perciò alla subfamiglia dei *Gammaherpesvirus* linfotropi. Anche se non è ancora stato isolato, esso prenderà il nome di HHV-8. Non si sa se il virus produce una infezione latente né tantomeno si conosce l'eventuale sito di latenza. Questo virus

non sembra essere così ubiquitario come gli altri h., poiché la frequenza di infezione in individui normali sembra essere bassa, mentre esso si trova essenzialmente negli omosessuali (Martin *et al.*, 1998) e con una frequenza del 100% in tutti e tre i tipi di sarcoma di Kaposi: classico, endemico e associato all'AIDS. Si pensa perciò che HHV-8 possa essere un cofattore nell'etiopatogenesi del sarcoma di Kaposi partecipando al suo sviluppo o alla sua progressione (v. KAPOSI, MALATTIA DI**).

Bibliografia

- Chang Y. *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 1865-1869.
Di Luca D., Dolcetti R., *Association of Human Herpesvirus-8 with human tumors*, in Barbanti-Brodano G., Bendinelli M., Friedman H. eds., *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*, 1995, Plenum, New York.
Dolcetti R. *et al.*, *Lancet*, 1994, **344**, 543.
Fields B. N. ed., *Virology*, 1996, Raven, New York.
Frenkel N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 748-752.
Inoue N. *et al.*, *Infectious Agents and Disease*, 1994, **2**, 343-360.
Lusso P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 3872-3876.
Martin J. N. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (14), 948-954.
Spear P. G. *et al.*, *Herpes Simplex Viruses*, in Tooze J. ed., *DNA Tumor Viruses*, 1980, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
White D. O., Fenner F. J., *Medical Virology*, 1994, Academic, New York.
Wyatt L. S. *et al.*, *J. Virol.*, 1991, **65**, 6260-6265.
Yoshikawa T. *et al.*, *J. Med. Virol.*, 1993, **41**, 319-323.

GIUSEPPE BARBANTI-BRODANO

HLA [v. vol. VII, coll. 1022-1040; Agg. I, coll. *3550-3563]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2607). - **Struttura tridimensionale delle molecole HLA** (col. 2608). - **Polimorfismo delle molecole HLA** (col. 2608). - **Rapporto tra polimorfismo genetico e riconoscimento HLA-peptide** (col. 2613). - **Biosintesi delle molecole HLA e processazione dell'antigene** (col. 2615). - **Il polimorfismo HLA e la risposta ad agenti infettivi** (col. 2618). - **Associazione tra alleli HLA e malattie autoimmuni** (col. 2618). - **Il mimetismo molecolare** (col. 2621).

Introduzione

L'esplosione delle conoscenze sul genoma umano (v.***) ha portato a una mappa della regione HLA estremamente dettagliata. Questa regione è anzi quella studiata più a fondo dell'intero genoma e si è vicini ad una definizione della sequenza dei 4 milioni di nucleotidi che la compongono. Da un semplice confronto fra la mappa mostrata nella fig. 2, del precedente Aggiornamento I del 1991 (coll. *3551-3552), e quella che presentiamo ora nella fig. 1 aggiornata al Novembre 1996, ci si può rendere conto dei progressi nelle conoscenze e della grande complessità del sistema.

Molto genericamente possiamo distinguere una regione HLA di classe II più centromerica, una regione di classe I più telomerica e una regione centrale che talvolta è chiamata di classe III. Ci occuperemo in questa sede unicamente dei geni HLA propriamente detti, cioè *geni HLA* di classe I e *geni HLA* di classe II e di quelli che partecipano direttamente ai meccanismi della loro espressione, cioè *geni TAP*, *LMP*, *DM*, tralasciando tutti gli altri geni della regione HLA anche se alcuni di essi, come i geni per il *Complemento*, *Tumor Necrosis Factor*, *Heat Shock Proteins*, rivestono grande importanza nei meccanismi di difesa dell'organismo (Trowsdale, 1995).

Sulle molecole HLA ci concentreremo sulla *struttura tridimensionale* che nei ultimi 5-6 anni, che è quella di maggiore interesse, e sulla *funzione*. Sono infatti molecole in grado di legare antigeni in forma di peptidi e di presentarli al recettore dei linfociti T (molecole *T-Cell Receptor* o TCR). Così come sono coinvolte nella risposta immunitaria allo stesso modo queste molecole condizionano le risposte

autoimmuni, ed entrano quindi nel meccanismo patogenetico di diverse malattie. Cercheremo quindi di fornire un quadro unitario della fisiologia della risposta immune e delle sue deviazioni patologiche.

La «traccia» che seguiremo (che non corrisponde «formalmente» ai capitoli sottoriportati) è la seguente:

- a) il legame peptidi-HLA e sue basi strutturali;
- b) il rapporto fra le diversità strutturali fra le diverse varianti alleliche delle molecole HLA e la loro capacità di legare peptidi diversi;
- c) gli eventi che portano a una frammentazione delle proteine antigeniche in peptidi e al loro legame alle molecole HLA;
- d) l'associazione HLA-malattie autoimmuni vista in termini non più di specificità sierologiche ma di variazioni di aminoacidi in posizioni critiche;
- e) la interpretazione dell'insorgenza di malattie autoimmuni come conseguenza del riconoscimento di peptidi specifici da parte di determinate molecole HLA.

Struttura tridimensionale delle molecole HLA

Entrambe le classi di molecole HLA sono eterodimeri. Nelle molecole di classe I le due catene polipeptidiche che costituiscono l'eterodimero sono la catena pesante alfa e la beta₂-microglobulina (β_2 -m), nelle molecole di classe II sono una catena alfa e una catena beta.

I recenti studi di cristallografia hanno permesso di comprendere i dettagli della struttura tridimensionale delle molecole HLA. Il primo di questi lavori è stato condotto sulla molecola di classe I HLA-A2 (cioè dalla molecola controllata dall'allele 2 del *locus HLA-A*) (Bjorkman e Parham, 1990). Al momento sono disponibili le immagini di due altre molecole di classe I e di una di classe II. Nella fig. 2 è riportata in forma schematica la struttura tridimensionale di una molecola di classe I.

La caratteristica più importante della molecola è costituita da una cavità (in inglese *peptide groove*) posta alla sua estremità. È questa cavità che accoglie un peptide antigenico che abbia le caratteristiche strutturali richieste per interagire con una data molecola HLA. Una volta che questo legame avviene, si forma un complesso HLA-peptide. Quest'ultimo può essere riconosciuto da un'altra molecola, il recettore presente sui linfociti T (TCR).

Le molecole di classe I e II differiscono fra loro per la lunghezza dei peptidi che possono legare (figg. 3 e 4) e per il modo con cui possono legarli.

La parte più vicina alla membrana dei due tipi di molecole conferisce la specificità di riconoscimento da parte di molecole accessorie, CD4 o CD8 che sono espresse in due tipi diversi di linfociti T. I linfociti CD8+, che possiedono generalmente una attività citotossica (*Cytotoxic T Lymphocytes* o CTL), riconoscono i complessi HLA di classe I-peptide. Invece i complessi HLA di classe II-peptide vengono generalmente riconosciuti da linfociti CD4+ (*helper*) che inducono la stimolazione di linfociti B, un loro differenziamento in plasmacellule e la conseguente produzione di anticorpi. Vediamo già delinearsi quindi i due rami principali della risposta immune: quello peptidi-HLA di classe I → linfociti CD8 → eliminazione di cellule; e quello peptidi-HLA di classe II → linfociti CD4 → risposta anticorpale.

Polimorfismo delle molecole HLA

La caratteristica più importante della risposta immune è la sua elasticità, cioè la sua capacità di reagire contro una grandissima varietà di aggressori esterni, principalmente virus e batteri. Gran parte di questa elasticità è dovuta alla capacità di generare, attraverso processi di riarrangiamento

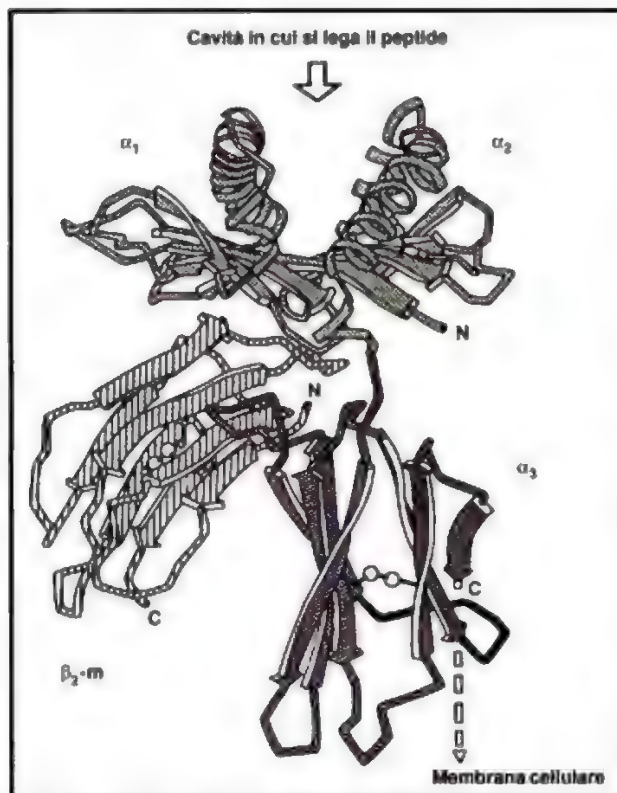


Fig. 2. Schema della struttura tridimensionale della porzione extracellulare di una molecola di classe I vista frontalmente. Le molecole HLA sono proteine che attraversano la membrana cellulare. La parte extracellulare è costituita da 4 domini. Nelle molecole di classe I i due domini più vicini alla membrana plasmatica, denominati α_1 e α_2 , sono ripiegati in una struttura a foglietto beta assai simile alla regione costante delle immunoglobuline. I due domini più lontani dalla membrana plasmatica, denominati α_1 e α_2 , sono costituiti da 4 foglietti beta seguiti da una lunga alfa-elica. I domini α_1 e α_2 costituiscono la parte più importante della molecola: essi formano la cavità entro la quale viene legato il peptide antigenico per essere esposto al recettore dei linfociti T. Il pavimento della cavità del peptide è costituito da 2 dei 4 foglietti beta mentre le due pareti sono costituite dalle alfa-eliche. A livello dei domini α_1 e α_2 , avvengono i contatti sia col peptide sia col recettore dei linfociti T. In particolare, i residui aminoacidi delle alfa-eliche che sono diretti verso la parte interna della cavità prendono diretto contatto col peptide mentre quelli diretti verso la parte esterna della molecola interagiscono direttamente col recettore dei linfociti T.

La struttura della molecola di classe II è simile a quella della molecola di classe I. La differenza fondamentale riguarda la cavità del peptide che presenta alla estremità una struttura molto più aperta rispetto alle molecole di classe I. Questa differenza è dovuta soprattutto al fatto che i 2 domini, denominati α_1 e β_1 , appartengono a due subunità diverse anziché alla stessa subunità come nel caso delle molecole di classe I. Inoltre due giri dell'alfa-elica del dominio α_1 sono sostituiti da una struttura a catena distesa. I domini α_1 e β_1 sono sovrapponibili rispettivamente ai domini β_2 e α_2 delle molecole di classe II e anch'essi assumono una struttura simile alla regione costante delle immunoglobuline.

Le strutture a forma di piccola sfera rappresentano i ponti disolfuro.

N e C: estremità amino e carbossiterminale delle molecole. (Modificata da Bjorkman e Parham, 1990).

per le molecole di classe II e B per quelle di classe I per i quali sono stati trovati più di cento alleli (fig. 5).

Il numero di molecole di classe I e II è notevolmente aumentato da circa 100 a oltre 1000. Questo è dovuto al fatto che le metodologie di tipizzazione molecolare sono state perfezionate e la tipizzazione genetica è diventata più accurata. Le metodiche classiche di tipizzazione delle molecole

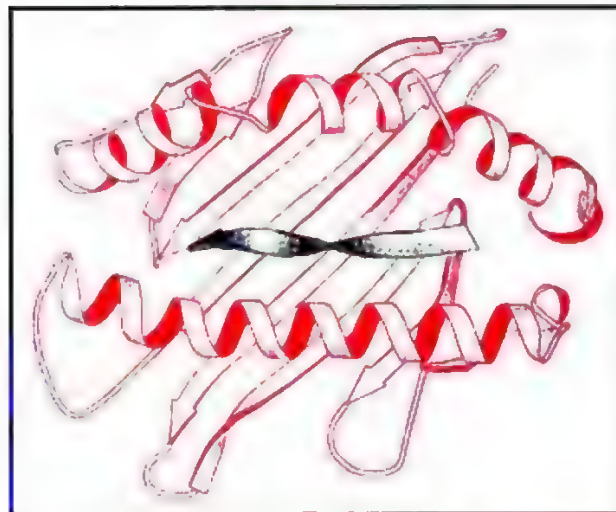


Fig. 3. Immagine dall'alto della cavità del peptide per le molecole di classe I. Il peptide legato presenta una conformazione distesa ed è disposto con un orientamento parallelo alle alfa-eliche della cavità. Le molecole di classe I legano peptidi di 8-10 aminoacidi, le cui estremità sono contenute all'interno della cavità. (Modificata da Madden, 1995).

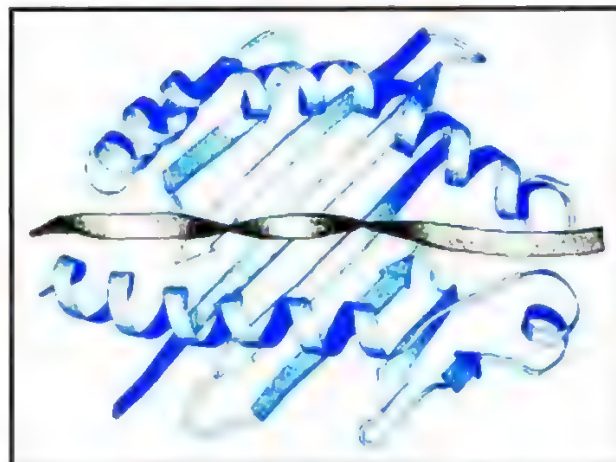


Fig. 4. Immagine dall'alto della cavità del peptide per le molecole di classe II. La conformazione più aperta della cavità del peptide delle molecole di classe II consente loro di ospitare peptidi più lunghi (di circa 12-20 aminoacidi) che possono protrudere al di fuori delle estremità della cavità. (Modificata da Madden, 1995).

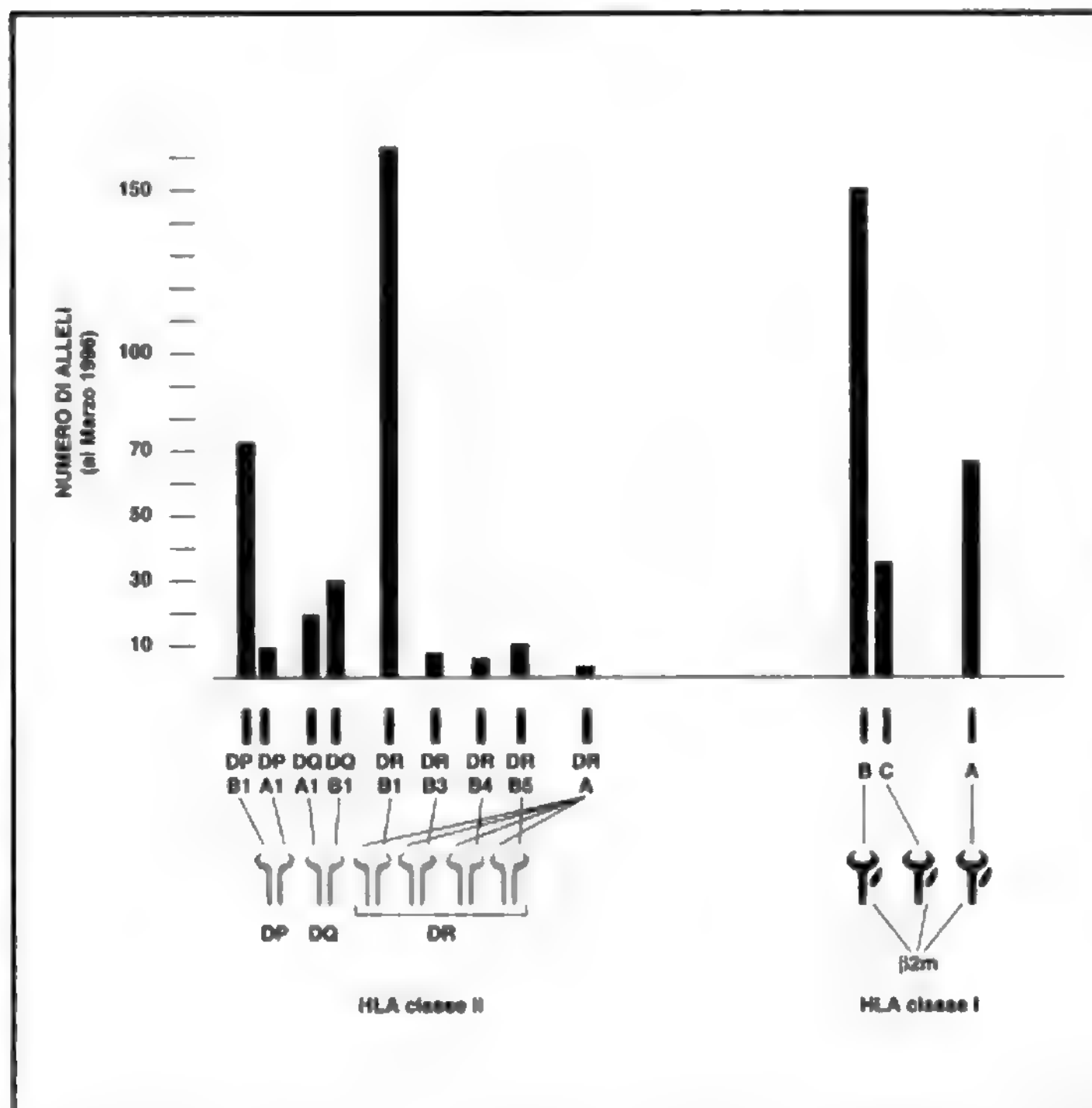
HLA si basano su reazioni sierologiche tra le proteine HLA espresse sulla superficie cellulare e antisieri policlonali o monoclonali specifici per le diverse varianti alleliche. La tipizzazione genomica prevede l'analisi delle sequenze di DNA delle posizioni polimorfiche. A differenza della tipizzazione sierologica, essa ha la potenzialità di distinguere varianti alleliche aventi una sequenza assai simile e che differiscono tra loro anche per un solo nucleotide.

Non si conoscono varianti alleliche della β_2 -m. Per le molecole di classe II HLA-DQ e DP sia la catena alfa che quella beta presentano posizioni assai variabili nella sequenza aminoacidica. La catena alfa delle molecole DR presenta invece un polimorfismo pressoché trascurabile.

Fig. 5. Polimorfismo dei geni HLA. Dal basso in alto sono riportate, la struttura schematica del prodotto dei singoli geni HLA di classe I e di classe II, i geni che codificano le singole subunità e il numero di alleli a ciascun locus (aggiornato al marzo 1996).

I geni principali di classe I (HLA-A, -B e -C) controllano la catena pesante o alfa della molecola, coi suoi tre domini α_1 , α_2 e α_3 , mentre il quarto dominio è costituito dalla β_2 -microglobulina che non presenta varianti alleliche ed è codificata da un gene sul cromosoma 15. I geni di classe II forniscono le catene alfa e beta che compongono tre tipi di molecole: DP, DQ e DR. Le molecole DR sono una famiglia di molecole con catena alfa in comune, fornita dal gene *DRA* e catena beta diversa, fornita dai geni *DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*. Per le molecole di classe II HLA-DQ e DP sia la catena alfa che la beta presentano aminoacidi assai variabili. La catena alfa delle molecole DR ha solo due varianti alleliche. La catena alfa delle molecole DR si associa col prodotto codificato da 4 diversi geni *DRB* (*DRB1*, *B3*, *B4*, *B5*). In particolare, oltre al gene *DRB1*, in ciascun cromosoma è quasi sempre presente anche uno degli altri 3 geni *DRB*.

È possibile consultare l'elenco completo degli alleli e le relative sequenze nucleotidiche che vengono aggiornate periodicamente al sito Internet: <http://www.icnnet.uk/asp/tia/index.htm>.



Rapporto fra polimorfismo genetico e riconoscimento HLA-peptide

Le molecole HLA legano il peptide secondo modalità che devono soddisfare due esigenze. Il legame deve essere stabile in modo che non si dissocia prima della stimolazione dei linfociti T. D'altro canto, esso non deve essere troppo specifico, in modo da permettere a ciascuna molecola di presentare un numero elevato di peptidi diversi. Infatti ciascun individuo può esprimere un massimo di 6 molecole diverse di classe I (se è eterozigote ai tre geni *HLA-A*, *B* e *C*) e 8 di classe II (se è eterozigote ai vari geni *DP*, *DQ* e *DR*) che è un numero piuttosto piccolo rispetto al numero enorme di antigeni diversi che in ciascun individuo le molecole HLA devono presentare al vasto repertorio di recettori dei linfociti T. Entrambe le esigenze possono venire soddisfatte grazie a complesse interazioni tra la molecola HLA e il peptide.

La cavità del peptide presenta una struttura complessa che comprende diverse tasche formate ciascuna da un certo numero di aminoacidi che interagiscono con le catene laterali o con la catena principale del peptide. Per le molecole di classe I sono state identificate mediante studi cristallografici 6 tasche denominate A-F.

Analogamente, la cavità del peptide delle molecole di classe II è organizzata in diverse tasche; queste sono tuttavia meno profonde di quelle delle molecole di classe I e il peptide viene agganciato in diverse posizioni lungo tutta la

sua lunghezza che, insieme, garantiscono una elevata stabilità di legame (Madden, 1995).

Nelle molecole di classe I la stabilità del legame è in gran parte determinata dal contatto fra gli aminoacidi che formano le tasche B ed F e le catene laterali di due aminoacidi del peptide in posizione 2 e 9, denominate «posizioni àncora», che interagiscono rispettivamente con la tasca B e la tasca F della cavità del peptide (Rammensee *et al.*, 1993). Poiché la forma e la dimensione delle singole tasche è determinata dalla natura delle catene laterali degli aminoacidi che le compongono, varianti alleliche diverse possono avere tasche con dimensioni e forme nonché caratteristiche chimico-fisiche, come carica e polarità, assai diverse. Non a caso le 20 posizioni aminoacidiche altamente polimorfiche identificate nelle molecole di classe I sono localizzate nei domini alfa1 e alfa2, cioè nei due domini che formano la cavità del peptide (fig. 6). Sedici di esse coinvolgono residui aminoacidici che interagiscono direttamente col peptide, due che interagiscono solo col TCR e due che interagiscono con entrambi.

Anche per le molecole di classe II le posizioni più polimorfiche sono concentrate nei domini che formano la cavità del peptide. In particolare, le catene laterali degli aminoacidi «àncora» sono ospitate nelle tasche delle molecole HLA che presentano residui polimorfici.

Le altre posizioni del peptide interagiscono meno fortemente con le molecole HLA e possono variare permettendo a ciascuna molecola HLA di poter presentare, sia

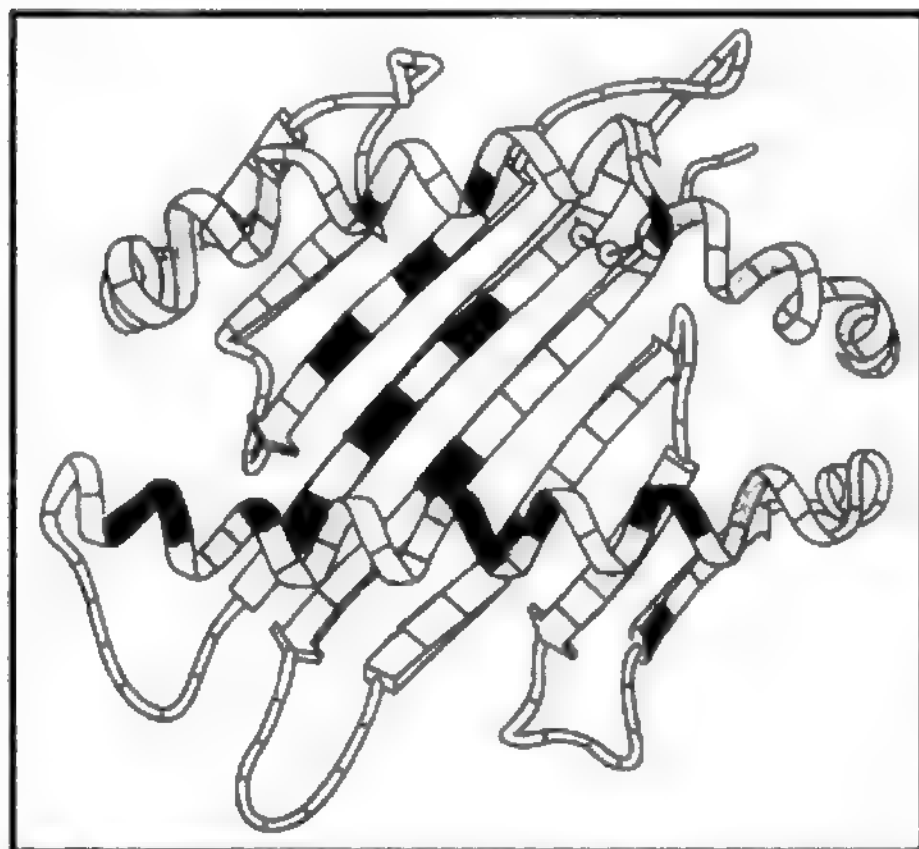


Fig. 6. Immagine dall'alto dei siti polimorfici di una molecola di classe I. La molecola è suddivisa in segmenti affiancati che rappresentano schematicamente i singoli aminoacidi che la compongono. Le 20 posizioni aminoacidiche che risultano più variabili nella maggior parte delle molecole HLA sono indicate con tratto pieno nero. Esse sono localizzate nei domini α_1 e α_2 , in particolare nella cavità del peptide. Sedici di esse coinvolgono residui aminoacidi che interagiscono direttamente col peptide, 2 di esse solo col TCR mentre le due rimanenti interagiscono con entrambi. Anche per le molecole di classe II le posizioni più polimorfiche sono concentrate nei domini che formano la cavità del peptide. (Modificata da Bjorkman e Parham, 1990).

pure con affinità diverse, un elevato numero di peptidi, dell'ordine delle decine di migliaia. Lo spettro di peptidi varia a seconda degli alleli HLA posseduti da ciascun individuo. Ciò garantisce la sopravvivenza della specie, in quanto esisteranno sempre individui che possiedono le varianti alleliche necessarie per difendersi contro aggressori virali o batterici anche rari, riconoscendone i peptidi antigenici specifici.

Biosintesi delle molecole HLA e processazione dell'antigene

Per comprendere il meccanismo con cui viene iniziata una risposta immune di qualsiasi tipo essa sia, cellulare o umorale, è necessario seguire la biosintesi delle molecole HLA, il loro passaggio attraverso i diversi compartimenti della cellula ed i meccanismi coi quali si legano ai peptidi antigenici. Possiamo seguire in dettaglio questi processi attraverso lo schema in fig. 7 (Brosky *et al.*, 1996).

Consideriamo per prime le molecole HLA di classe I. La catena pesante viene immessa subito dopo la sintesi nel reticolo endoplasmatico (RE), dove si associa ad una molecola «chaperon» chiamata *calnessina*. Questa promuove la corretta conformazione tridimensionale della catena pesante facilitando l'associazione con la β_2 -m. Quando la *calnessina* si lega al p.m., formando la molecola HLA di classe I, la *calnessina* si dissocia (Cresswell, 1996).

È noto che le molecole di classe I possono legare provenendo da proteine di origine estera. In condizioni fisiologiche, queste proteine sono quere, naturalmente sintetizzate dalla cellula. Tuttavia queste proteine «self» non provocano normalmente una risposta immune (questo termi-

meno è chiamato «tolleranza») in quanto durante l'ontogenesi, nel timo, i linfociti T che possedevano i corrispondenti TCR sono stati eliminati. Tuttavia, nel corso, ad es., di una infezione virale sono presenti nel citoplasma proteine di origine virale che danno origine a peptidi «non-self» che potranno essere riconosciuti da TCR specifici.

Risulta evidente da quanto abbiamo detto finora che una proteina di per sé non può essere antigenica a meno che non generi dei peptidi capaci di legarsi a molecole HLA attraverso quella che viene chiamata *processazione dell'antigene*. All'interno del citoplasma questa avviene per opera di un complesso multimolecolare chiamato *proteasoma*, che è dotato di attività proteasica. Nella regione HLA ci sono due geni che codificano per 2 subunità dei proteasomi denominate LMP2 e LMP7 (LMP: *Low Molecular Mass Polypeptide*). Si pensa che la loro funzione sia quella di migliorare la capacità dei proteasomi di generare peptidi della taglia e specificità appropriate per il legame più efficiente con le molecole di classe I (Heemels e Ploegh, 1995).

I peptidi generati dai proteasomi sono trasportati nel RE dalle proteine trasportatrici TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*). Esse sono eterodimeri le cui due subunità sono codificate da due geni della regione HLA denominati *TAP1* e *TAP2*. Ciascuna subunità comprende un dominio che lega l'ATP (che fornisce l'energia necessaria per il trasporto) e un dominio con 7 segmenti che attraversano la membrana. Gli elementi transmembrana presentano dei residui aminoacidici polari e perciò possono formare un poro idrofilo attraverso il quale il peptide è trasportato dal citosol al lume del RE (Hill e Ploegh, 1995).

All'interno del RE il complesso catena pesante- β_2 -m si associa direttamente con le molecole TAP e si trova quindi nelle condizioni migliori per accogliere i peptidi alla loro entrata. Quando la molecola HLA lega un peptide con elevata affinità, essa viene trasportata verso il complesso del Golgi dove viene glicosilata e infine verso la membrana cellulare. Qui il complesso HLA di classe I-peptide potrà essere riconosciuto da un linfocita CD8 e se questo ha attività citotossica, la cellula verrà uccisa. Il vantaggio di questo «sacrificio» è che questa distruzione può avvenire a stadi precoci dell'infezione, prima che il virus abbia avuto il tempo di moltiplicarsi e di invadere molte altre cellule. Questo spiega anche il fatto che le molecole di classe I vengono espresse da tutte le cellule nucleate, in quanto tutte sono potenziali bersagli di infezioni virali.

Passiamo ora a considerare le molecole HLA di classe II. Anch'esse vengono riversate alla sintesi nel RE dove però si associano, dopo un processo di maturazione complesso in cui interviene ancora la *calnessina* e che non descriveremo nei dettagli, con una catena polipeptidica non polimorfica e perciò chiamata *catena invariante* o *Ii* (Cresswell, 1996). Questa ha due funzioni: la prima è quella di indirizzare la molecola di classe II nell'apparato del Golgi e poi nel compartimento endosomiale. L'altra è quella di occupare, con una porzione della molecola invariante chiamata *peptide CLIP* (*Class II-associated Invariant Peptide* [fig. 7]), la cavità di legame del peptide (Ghosh *et al.*, 1995). Di conseguenza, le molecole di classe II, durante la loro permanenza nel RE, non possono legare i peptidi derivanti da proteine endogene che vengono così presentati ai TCR solo dalle molecole di classe I. Al contrario, le molecole di classe II legano peptidi derivati da proteine esterne che vengono internalizzate. Esse possono essere proteine presenti sulla superficie cellulare o proteine solubili come ad es. tossine batteriche, oppure proteine associate con un microorganismo intero quali un batterio o un virus presente in circolo o un protozoo parassita fagocitato dalla cellula. Queste proteine vengono internalizzate in vescicole endocitotiche che ven-

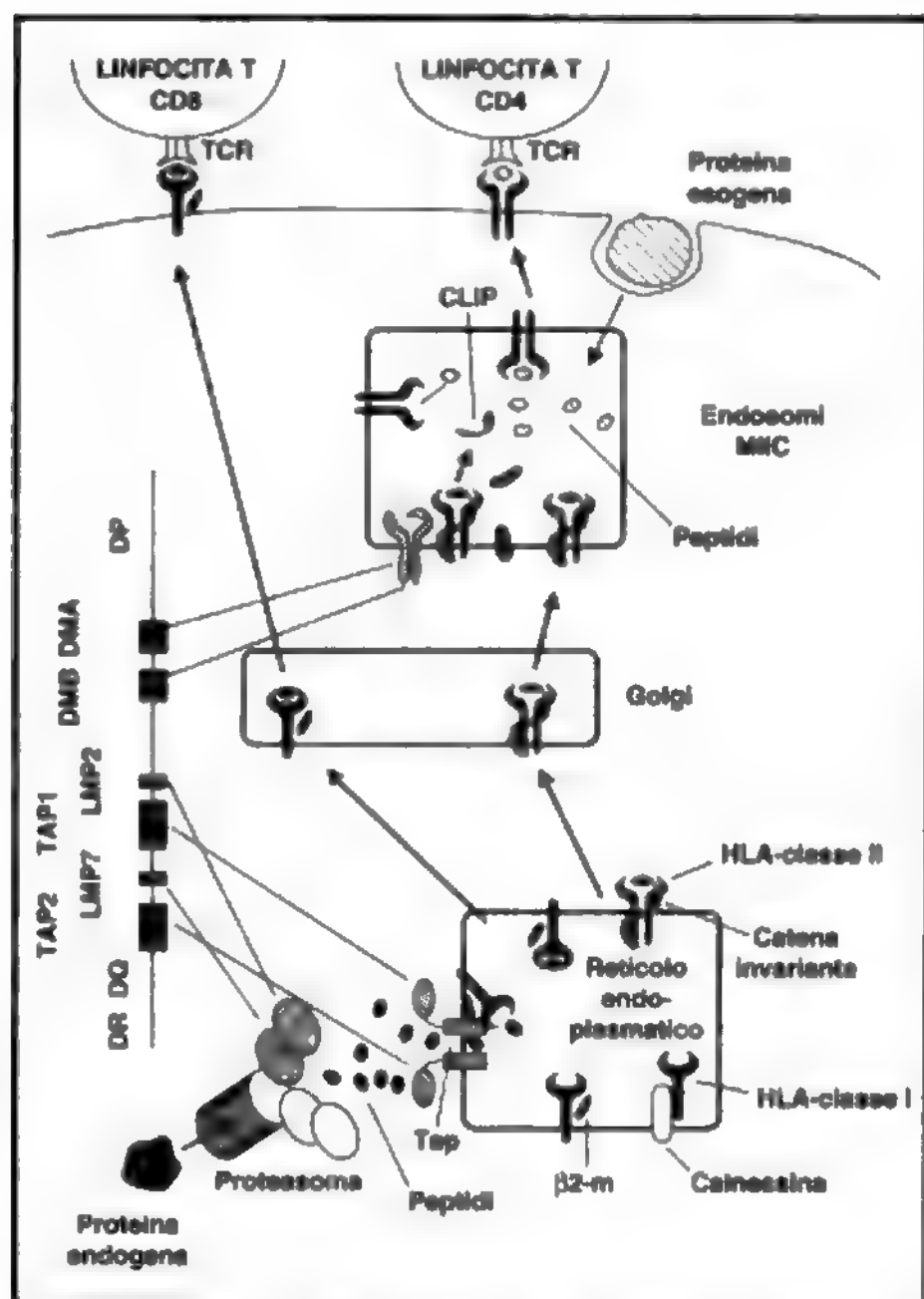


Fig. 7. Biosintesi delle molecole HLA di classe I e di classe II e presentazione del peptide antigenico. Per la spiegazione cfr. testo. TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*): proteine trasportatrici dei peptidi. LMP2 e LMP7 (*Low Molecular Mass Polypeptide*): subunità dei proteasomi codificate da geni della regione HLA. CLIP (*Class II associated Invariant Peptide*): porzione della catena invariante costituita dai residui aminoacidici 81-105 ottenuta per degradazione proteolitica. MHC (*MHC class II compartment*): compartimento cellulare in cui le molecole di classe II appena sintetizzate incontrano e legano il peptide antigenico ottenuto dal materiale del flusso endocitotico. TCR (*T Cell Receptor*): recettore dei linfociti T.

Nella parte sinistra della illustrazione sono indicati i loci che codificano per TAP, DM e LMP cioè per molecole coinvolte nella processazione dell'antigene e che mappano nella regione di classe II del complesso HLA (cfr. fig. 1).

gono dirette agli endosomi primari, poi agli endosomi secondari e, infine ai lisosomi. In questi ultimi vengono digerite da proteasi e danno così origine a peptidi antigenici.

L'incontro fra le molecole di classe II appena sintetizzate e i peptidi generatisi da proteine esogene avviene in un particolare compartimento cellulare che presenta marcatori degli endosomi e dei lisosomi e inoltre marcatori suoi caratteristici, denominato *MHC* (*MHC Class II Compartment*). In questo compartimento la catena invariante viene degradata per passaggi successivi da diversi enzimi proteolitici tra i quali una cathepsina specifica. Solo la rimozione della porzione CLIP della catena invariante libererà la cavità del peptide della molecola di classe II e le permetterà di legare un peptide antigenico e di procedere verso la superficie cellulare.

Per la rimozione di CLIP è essenziale la presenza di un'altra proteina denominata HLA-DM (Roche, 1995). Essa è un eterodimero costituita dalle subunità DMA e DMB

che sono codificate da geni della regione HLA. HLA-DM è una proteina assai simile alle molecole di classe I e soprattutto di classe II. A differenza di queste essa non si associa con la catena invariante e non è espressa sulla superficie cellulare ma è presente solo nel compartimento MHC. Essa provoca la rimozione di CLIP dalle molecole di classe II. Questa reazione è probabilmente mediata da una diretta associazione con legami deboli della stessa DM con le molecole di classe II e avviene a pH acido nel compartimento MHC (in linee cellulari mutate che non esprimono HLA-DM, le molecole di classe II legano permanentemente CLIP come unico peptide e lo presentano sulla superficie cellulare).

Le molecole di classe II dopo aver legato il peptide vanno sulla superficie cellulare attraverso un traffico mediato da vescicole che si dipartono da MHC. Qui il complesso HLA di classe II-peptide potrà essere riconosciuto da TCR di linfociti CD4 *helper* che stimolano la proliferazione e la differenziazione di linfociti B a plasmacellule in grado di secernere anticorpi specifici. Il significato fisiologico di questo meccanismo appare chiaro: la risposta immune contro aggressori extracellulari è svolta da cellule specializzate (cellule che presentano l'antigene o APC) che esprimono molecole di classe II. Essa è meno immediata ma più modulabile nella sua intensità e specificità attraverso molteplici meccanismi di controllo.

Benché questa descrizione sia estremamente schematica, essa può servire da base per una visione aggiornata del ruolo dei geni HLA nella patologia umana.

Il polimorfismo HLA e la risposta ad agenti infettivi

In base a quanto esposto sopra, potremmo aspettarci che le variazioni della risposta a un agente infettivo nei diversi individui sia dovuta principalmente al corredo di alleli HLA che l'individuo possiede e che gli permetterà di presentare con maggior o minore efficienza i vari peptidi antigenici. Tuttavia, dato che ciascun agente patogeno genera un vasto spettro di peptidi antigenici, ciascuno dei quali può essere presentato con diversa efficienza dai diversi alleli, risulta difficile mettere in evidenza una associazione significativa fra suscettibilità ad una data malattia infettiva e la presenza di una specifica variante allelica HLA. In qualche caso particolare tuttavia ciò è stato possibile. L'esempio migliore è quello della malaria (v.*). In un importante studio condotto in Africa occidentale, è stato dimostrato che la frequenza dell'allele HLA-B53 era significativamente aumentata tra gli individui che non sviluppavano la malaria pur vivendo in una zona ad elevata endemia. Questa variante allelica appare quindi conferire una protezione nei confronti dell'infezione malarica (Hill *et al.*, 1991). È stato poi dimostrato che la molecola HLA-B53 è in grado di presentare un peptide derivato da un antigene espresso dalla forma del plasmodio della malaria responsabile dei primi stadi dell'infezione, che avviene a livello epatico. Questo peptide, denominato LSA-1 (*Liver Stage Antigen*), rappresenta il bersaglio di una risposta immune da parte di linfociti T citotossici specifici per i plasmodi che infettano le cellule epatiche (Hill *et al.*, 1992). Questa risposta immune è responsabile dell'eliminazione dei plasmodi nelle prime fasi dell'infezione, impedendo il progredire della malattia a livello eritrocitario. Questo è un raro esempio in cui è stato possibile risalire da una interazione molecolare HLA-peptide a un preciso cammino patogenetico e alle sue conseguenze a livello clinico.

Associazione fra alleli HLA e malattie autoimmuni

L'associazione fra malattie con componente autoimmune e alleli HLA è nota da circa 25 anni. Data l'importanza di

queste malattie, che colpiscono circa il 5% della popolazione e sono di grande rilevanza sociale, gli studi accumulatisi su questo argomento hanno raggiunto una mole cospicua. Le principali associazioni sono state elencate nel precedente aggiornamento (v. HLA*, coll. *3559-3563; tab. III). In questi ultimi anni la lista delle malattie associate ad HLA non ha subito sostanziali espansioni. È emerso tuttavia che per la maggior parte delle malattie autoimmuni l'associazione primaria è con alleli di classe II, sia HLA-DR che DQ, contrariamente ai primi studi pubblicati che dimostravano un'associazione con le molecole di classe I. L'eccezione più rilevante riguarda la spondilite anchilosante per la quale è stata dimostrata un'associazione primaria con la molecole di classe I, HLA-B27. I progressi sostanziali si sono avuti, in molti casi, nell'individuazione del gene del sistema HLA specificamente coinvolto e, nell'ambito di questo, della sequenza specifica e in qualche caso, dello specifico aminoacido responsabile. Ciò è stato reso possibile dall'introduzione della tipizzazione genomica che ha permesso di caratterizzare le varianti alleliche associate e di definirne le differenze di sequenza nucleotidica rispetto alle varianti alleliche non associate. Nella tab. I sono riportate le malattie in cui si è arrivati ad un maggiore approfondimento delle basi molecolari dell'associazione HLA.

Il rischio di sviluppare alcune malattie è conferito solo da alcuni sottotipi molecolari. Ad es., tra gli individui affetti da artrite reumatoide solo le frequenze di due dei sottotipi del DR4 (DRB1*0401 e DRB1*0404) sono significativamente aumentate. Analogamente, solo alcuni sottotipi del B27 risultano significativamente associati alla spondilite anchilosante.

In alcune malattie l'associazione può coinvolgere più di un allele e il confronto delle sequenze di tutti gli alleli associati ha permesso di individuare uno o pochi aminoacidi comuni, definiti come «epitopo condiviso» (in inglese *shared epitope*).

Nel diabete di tipo I (insulino-dipendente) è la sequenza che codifica per l'aminoacido in posizione 57 della catena DQB1 che risulta principalmente associata alla malattia e che, d'altra parte, riveste un ruolo critico per la selettività del legame col peptide. Sono associati al diabete quegli alleli che non possiedono l'acido aspartico in posizione 57.

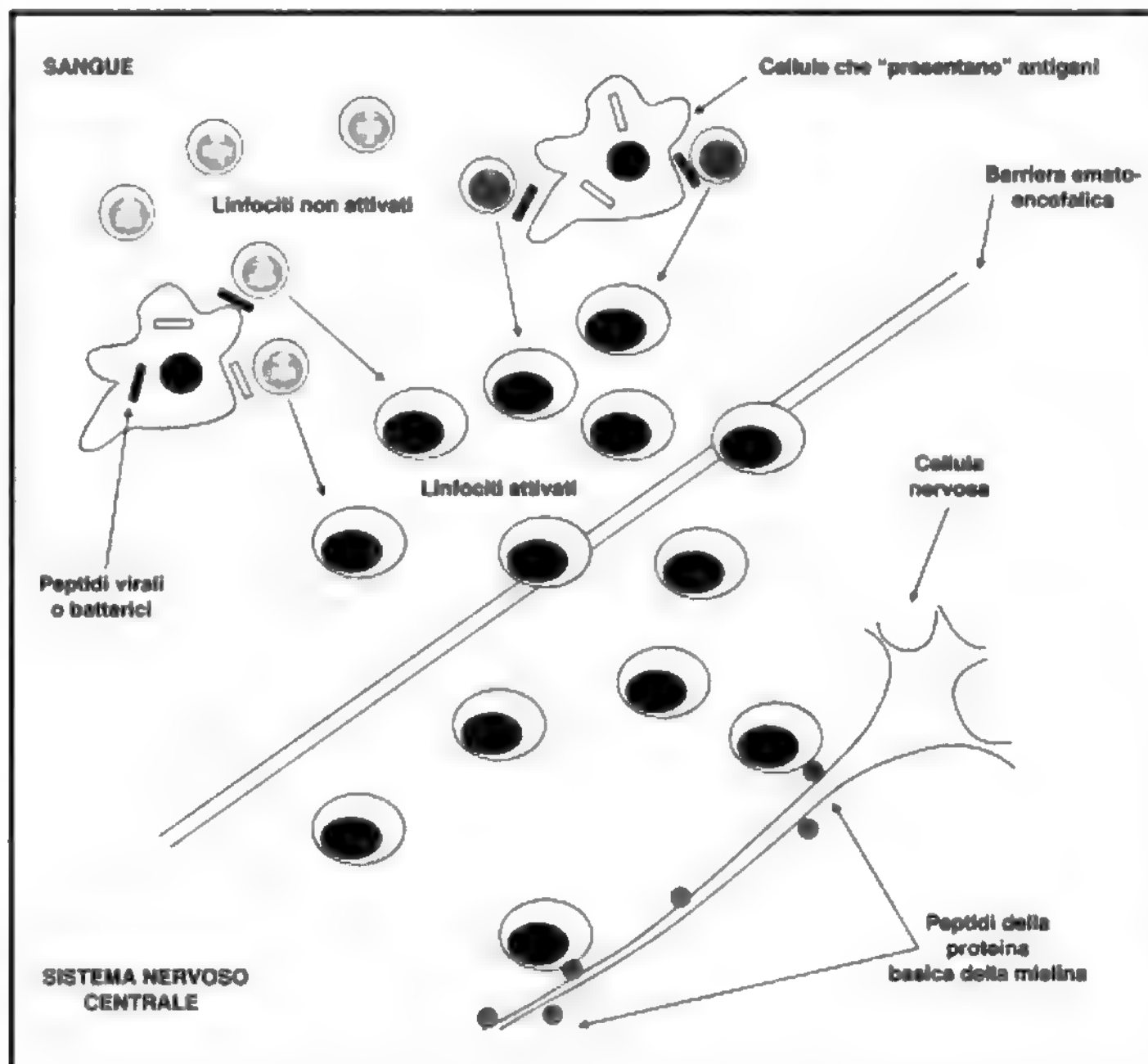
Dall'analisi dell'associazione HLA-malattie si può infine osservare che per alcune malattie l'associazione risulta a carico di una particolare combinazione delle subunità alfa e beta che formano un eterodimero. Questo è particolarmente evidente per due malattie per le quali è stato chiarito che l'associazione primaria riguarda alleli al *locus* DQ. Per il diabete di tipo I è stato osservato che il maggior rischio è determinato dalla presenza di almeno un eterodimero DQ che presenti in posizione 57 della catena DQ-beta un aminoacido diverso da Asp e che presenti arginina nella posizione 52 della catena DQ-alfa. Per la malattia celiaca la maggioranza dei pazienti presenta l'allele DQA1*0501 in associazione con DQB1*0201. Le molecole che formano l'eterodimero a rischio possono essere codificate da geni sullo stesso cromosoma (associazione in *cis*), o da geni su due cromosomi diversi (associazione in *trans*).

Una specificità così fine di queste associazioni indica il coinvolgimento nel meccanismo patogenetico di un peptide specifico capace di stimolare linfociti T autoreattivi. In qualche caso si può arrivare a delle ragionevoli deduzioni sulle caratteristiche strutturali che il peptide deve possedere. Ad es., è stato osservato che i sottotipi del DR4 e del DR1 associati all'artrite reumatoide condividono un epitopo compreso tra gli aminoacidi 67 e 71 che li distingue dai sottotipi non associati a questa malattia. In particolare, essi condividono in posizione 71 l'aminoacido arginina con carica positiva. Invece il sottotipo molecolare del DR4 associato al pemfigo volgare (DRB1*0402), un'altra malattia associata a DR4, presenta in posizione 71 un aminoacido con carica

TAB. I. PRINCIPALI ASSOCIAZIONI HLA - MALATTIE

Malattia	Allele HLA associato:			Autoantigene
	Specificità sierologica	Sottotipi molecolari	Aminoacido	
Artrite reumatoide	DR4	DRB1*0401 DRB1*0404	71Arg 71Arg	Collagene tipo II
Pemfigo volgare	DR4	DRB1*0402	71Glu	Desmogleina 3
Diabete di tipo I (IDDM)	DR4	DRB1*0402 DRB1*0405		Acido Glutammico Decarbossilasi (GAD)
	DQw3	DQB1*0301/ DQA1*0302	57non-Asp 52Arg	Carbossipeptidasi
	DR3 DQw2	DRB1*0301/ DQB1*0201/ DQA1*0501	57non-Asp 52Arg	Tirosina fosfatasi IA-2
Malattia celiaca	DQw2	DQB1*0201/ DQA1*0501		(Gliadina)
Sclerosi multipla	DR4 (DR15)	DRB1*1501 DRB1*1502		Proteina Basica della Mielina (PBM) Proteina Proteolipidica (PLP) MOG MAG αB-Cristallina
Spondilite anchilosante	B27	B*2702 B*2704 B*2705		
Muscolo paralisi	B8			Recettore nicotinico dell'acetilcolina

Fig. 8. Schema che illustra il meccanismo di attivazione dei cloni T citotossici autoreattivi specifici per la Proteina Basica della Mieline (MBP) nel sistema immunitario periferico, secondo il modello del «mimetismo molecolare». I cloni T autoreattivi quiescenti specifici per le proteine mieliniche vengono attivati nel sistema immunitario periferico da peptidi virali o batterici che presentano una sufficiente somiglianza con i peptidi della MBP (mimetismo molecolare). I cloni autoreattivi attivati possono superare la barriera ematoencefalica e innescare una risposta autoimmune contro i componenti della mieline dei neuroni del S.N.C. (Da Wucherpfenning e Strominger, 1995b).



negativa (acido glutammico). La posizione 71 è critica nel definire la selettività del peptide che si può legare alla molecola DR in quanto contribuisce alla formazione di una tasca che lega il quarto aminoacido. Si può quindi ragionevolmente dedurre che i sottotipi del DR4 con Arg71 legano un peptide con un aminoacido negativo mentre le molecole DR4 con Glu71 legano peptidi con un aminoacido positivo in quarta posizione e che la presentazione di peptidi con queste caratteristiche opposte siano all'origine delle due diverse malattie (Wucherpfenning e Strominger, 1995a).

Il mimetismo molecolare

Molte ricerche sono dedicate all'individuazione precisa degli autoantigeni, e possibilmente, dei peptidi, implicati in ciascuna malattia. Tuttavia, in molti casi, gli autoantigeni implicati sono più di uno (tab. I) e talvolta sono parecchi. Inoltre in molti casi la risposta immune contro questi autoantigeni non è indotta dalle stesse molecole HLA che mostrano associazione genetica. Un altro punto difficilmente spiegabile è il motivo per cui il danno cellulare è mediato generalmente da cellule citotossiche piuttosto che da autoanticorpi, e dovrebbe quindi dipendere da molecole di classe I, mentre la associazione è generalmente con geni di classe II. Questi interrogativi non hanno avuto risposte convincenti e si è sostanzialmente in una fase di stallo per quanto riguarda la patogenesi delle malattie autoimmuni. Il problema fondamentale rimane comunque il motivo per cui si avvia una risposta contro peptidi *self* con una rottura dei meccanismi di tolleranza. L'ipotesi più accreditata è quella del *mimetismo molecolare* che riportiamo per il fatto che ha recentemente ottenuto un supporto sperimentale nel caso

della sclerosi multipla (MS) (fig. 8) e può servire da modello generale anche per le altre malattie autoimmuni. Cellule T attivate contro la proteina basica della mieline (MBP) sono state trovate nelle placche di demielinizzazione in pazienti MS. Tuttavia è stato accertato che solo cellule T attivate e non linfociti non attivati possono penetrare nel S.N.C. Pertanto i linfociti devono prima essere attivati in circolo per poter poi superare la barriera ematoencefalica. L'attivazione periferica deve essere dovuta ad antigeni diversi in quanto la MBP non si trova in circolo. Con tutta probabilità entrano in gioco epitopi virali o batterici che sono strutturalmente simili a autoantigeni della MBP. In questo modo, infezioni croniche ricorrenti possono generare cloni di cellule T attivate che reagiscono contro strutture simili agli epitopi MBP e che sono in grado di migrare nel S.N.C. ed iniziare il danno cellulare. La ricerca di sequenze batteriche e virali in grado di «mimare» gli epitopi riconosciuti da diversi cloni anti-MBP ha recentemente dimostrato che alcune sequenze possono essere riconosciute dai cloni autoreattivi con la stessa efficienza di peptidi MBP. Questo dato estremamente importante avvalorava l'ipotesi del «mimetismo molecolare», suggerisce che non un solo, ma diversi patogeni possono intervenire nella patogenesi della MS e fornisce basi solide per sospettare un ruolo di alcuni agenti specifici, cioè *Herpes simplex*, EBV, influenza di tipo A, adenovirus di tipo 12 e *Pseudomonas aeruginosa*.

Bibliografia

- Baum H., Davies H., Peakman M., *Immunol. Today*, 1996, 17, 64.
 Bjorkman P. J., Parham P., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 253.
 Brosky F. M., Lem L., Bresnahan P. A., *Tissue Antigens*, 1996, 47, 464.

Cresswell P., *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, **12**, 259.
 Cresswell P., *Cell*, 1996, **84**, 505.
 Ghosh P., Amaya M., Mellin E., Wiley D. C., *Nature*, 1995, **378**, 457.
 Heemels M. T., Ploegh H., *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 463.
 Hill A., Ploegh H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, **92**, 341.
 Hill A. V. S. et al., *Nature*, 1991, **352**, 595.
 Hill A. V. S., Elvin J., Willis A. C. et al., *Nature*, 1992, **360**, 434.
 Madden D. R., *Ann. Rev. Immunol.*, 1995, **13**, 587.
 Rammensee H. G. et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 1993, **11**, 213.
 Roche P. A., *Immunity*, 1995, **3**, 259.
 Trowsdale J., *Immunogenetics*, 1995, **41**, 1.
 Wucherpfennig K. W., Strominger J. L., *J. Exp. Med.*, 1995a, **181**, 1597.
 Wucherpfennig K. W., Strominger J. L., *Cell*, 1995b, **80**, 695.

SANDRA D'ALFONSO F ROBERTO TOSI

HOLT-ORAM, SINDROME DI

Sin.: atriodigitale displasia.

I sintomi cardinali della sindrome di Holt-Oram sono le anomalie del pollice ed i difetti del setto interatriale.

Il quadro clinico è però molto variabile e può comprendere agenesia del pollice, pollice non opponibile, trifalangea, digitalizzato e cardiopatie congenite di diversa gravità. Questa associazione è stata descritta originariamente nel 1960 da Holt e Oram in una famiglia di quattro generazioni nella quale varie persone presentavano difetti del setto atriale associati a pollice digitalizzato, in presenza di contratture delle falangi distali delle dita. La segregazione familiare indicava chiaramente l'origine autosomica dominante della affezione. Benché la sindrome sia considerata rara, con una frequenza di circa 1:100.000 nati, sono noti molti casi, familiari e sporadici.

Potznanski et al. (1970) hanno osservato che le anomalie delle ossa carpali sono più caratteristiche rispetto a quelle del pollice. Sono soprattutto comuni i dismorfismi dello scafoide, le fusioni delle ossa carpali e le ossa carpali in sovranumero, in particolare l'osso centrale, che è normalmente presente nel feto, ma che si fonde con lo scafoide prima della nascita. I metacarpi sono in genere più lunghi che di norma, mentre le falangi medie sono più corte.

L'allungamento più significativo riguarda il I metacarpo e l'accorciamento più importante la V falange. Il I metacarpo ha due centri di ossificazione epifisaria, uno prossimale ed uno distale. Alcune anomalie scheletriche possono essere evidenziate solo con indagini radiografiche. Sono relativamente frequenti le anomalie dell'eminanza tenar, come la sua dislocazione distale. Il radio (fig. 1), l'ulna e l'omero possono presentare alterazioni variabili. Ad es., gli epicondili mediali dell'omero sono spesso protuberanti posteriormente e lateralmente. È comune la limitazione nella pronosupinazione della mano, eventualmente associata a sinostosi radio-ulnare. Alcuni pazienti presentano focomelia o grave ectromelia. Le scapole possono essere ipoplasiche, le clavicole corte o incurvate. Il muscolo grande pettorale è occasionalmente assente. Le lesioni tendono a distribuirsi in maniera asimmetrica, con un interessamento più frequente e più grave sul lato sinistro. In alcuni pazienti sono presenti alterazioni della gabbia toracica, in particolare *pectus excavatum*.

In circa il 10% dei pazienti le anomalie degli arti non si associano a cardiopatia. Il difetto del setto interatriale, tipo *secundum*, è la malformazione più comune e caratteristica, ma sono frequenti anche altri tipi di cardiopatia, come *ostium primum*, difetto del setto interventricolare, prolasso della valvola mitrale, pervietà del dotto arterioso, canale atriovenoso anormale, trasposizione dei grossi vasi, coarctazione dell'aorta, arteria coronaria anomala. Sono anche comuni le anomalie elettrocardiografiche, soprattutto i difetti della conduzione, con allungamento dell'intervallo P-R, la bradicardia sinusale, le aritmie atriali, il blocco di conduzione, la distensione del seno nodale.



Fig. 1. Aspetto generale di un paziente con aplasia radiale bilaterale associata a difetto del setto interatriale.

L'associazione tra i difetti cardiaci e degli arti superiori è presente anche in altre sindromi genetiche, ad es. la *sindrome TAR*, che associa trombocitopenia ed assenza del radio e l'anemia di Fanconi, entrambe ad eredità autosomica recessiva. Inoltre, gli stessi difetti sono caratteristici della trisomia 18, dell'embriopatia da talidomide e della associazione *VATER* (difetti Vertebrali, Anali, fistola Tracheo-Esofagea, difetti Radiali).

La sindrome di Holt-Oram ha penetranza completa ed espressività variabile intra- ed interfamiliare. È perciò necessario che tutti i membri delle famiglie a rischio siano valutati sia dal punto di vista radiografico, che da quello cardiologico, con accertamenti clinici e strumentali appropriati.

L'associazione casuale tra alcune anomalie cromosomiche e la sindrome ha suggerito le possibili localizzazioni del gene-malattia (Ryback et al., 1971; Turleau et al., 1984; Kristofferson et al., 1987). Tuttavia, le successive analisi di associazione non hanno confermato nessuna di queste evidenze citogenetiche. Al contrario, Terrett et al. (1994) hanno dimostrato in 5 delle 7 famiglie studiate la cosegregazione del gene-malattia con marcatori polimorfi localizzati sul braccio lungo del cromosoma 12, in una regione di 21 cM. Basson et al. (1994) e Bonnet et al. (1994) hanno confermato questa localizzazione su 12q21.3-q22 ed hanno fornito ulteriore supporto all'eterogeneità genetica della sindrome. Il gene-malattia è stato identificato in *TBX5*, un membro della famiglia *brachyury* (Basson et al., 1997).

Bibliografia

- Basson C. T. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 885.
 Basson C. T. et al., *Nature Genetics*, 1997, **15** (1), 30.
 Bonnet D. et al., *Nature Genetics*, 1994, **6**, 405.
 Holt M., Oram S., *Brit. Heart J.*, 1960, **22**, 236.
 Hurst J. A. et al., *J. Med. Genet.*, 1991, **28**, 406.
 Kaufman R. L., *Am. J. Dis. Child.*, 1974, **127**, 21.
 Kristofferson U. et al., *Am. J. Med. Genet.*, 1987, **28**, 229.
 Poznanski A. K. et al., *Radiology*, 1970, **94**, 45.
 Rybak M. et al., *Am. J. Dis. Child.*, 1971, **121**, 490.
 Smith A. T. et al., *J. Pediatr.*, 1979, **95**, 538.
 Terrett J. A. et al., *Nature Genetics*, 1994, **6**, 401.
 Turleau C. et al., *Ann. Génét.*, 1984, **27**, 237.

BRUNO DALLAPICCOLA

IBOGAINA

F. *ibogaïne*. - I. *ibogaine*.

L'ibogaina (12-metossiibogamina) è un alcaloide indolico psicoattivo isolato per la prima volta nel 1901 dalla radice *Tabernanthe iboga*, un arbusto endemico dell'Africa centro-occidentale. La droga era nota da tempo alle popolazioni locali per i suoi effetti stimolanti e allucinogeni.

Nell'ultimo decennio, l'i. è stata oggetto di interesse a causa della sua presunta capacità di inibire l'abuso delle sostanze psicoattive: infatti, alcune osservazioni compiute su soggetti tossicodipendenti hanno evidenziato che l'i. determina sia l'attenuazione dei sintomi dell'astinenza da oppiacei, sia la riduzione del *craving* (desiderio compulsivo) per tali sostanze. Questi effetti potrebbero costituire la base di un eventuale impiego dell'i. nella terapia delle tossicodipendenze. I dati ottenuti negli animali da esperimento sembrano avvalorare questa ipotesi. Infatti, l'i. inibisce alcuni effetti delle sostanze psicoattive, che sono considerati indicativi del loro potenziale d'abuso: nel ratto riduce l'autosomministrazione di morfina, anfetamina e cocaina, e nel topo previene l'aumento dei livelli di dopamina indotto da morfina e anfetamina in alcune regioni dell'encefalo.

Questi risultati, però, sono incostanti: infatti, la dose di i. necessaria per inibire il comportamento di autosomministrazione, e la durata di tale azione inibitoria, variano considerevolmente tra gli studi e a volte tra i soggetti sperimentali. Inoltre, in alcune circostanze, gli eventi neurochimici sopra descritti sono potenziati dal pretrattamento con i. L'i., somministrata per via sistemica o intracerebroventricolare, attenua alcuni dei sintomi dell'astinenza da oppiacei nel ratto; un effetto simile è stato evidenziato nell'uomo. Tuttavia, altri studi compiuti sui roditori hanno dimostrato che l'i. non ha effetto sulla sindrome da astinenza.

Attualmente, quindi, l'azione inibitoria dell'i. sui fenomeni comportamentali e neurochimici legati all'abuso di sostanze psicoattive non è inequivocabilmente dimostrata. Lo stesso si può dire dei suoi effetti sui sintomi astinenziali. È importante poi aggiungere che, nello stesso intervallo di

dosi in cui si verifica l'attenuazione del comportamento d'abuso e dei sintomi astinenziali, l'i. provoca alterazioni della funzione motoria, che consistono essenzialmente in tremori, inibizione dell'attività locomotoria e atassia. L'atassia si deve probabilmente attribuire ad un effetto tossico dell'i. sulle cellule di Purkinje del cervelletto. Studi eseguiti sul ratto hanno dimostrato inoltre che l'i. riduce notevolmente la capacità di apprendimento. La compromissione motoria e cognitiva provocata dall'i. merita pertanto di essere attentamente valutata in relazione all'utilizzazione del farmaco in terapia.

Se la capacità di divezzamento dalle tossicodipendenze dell'i. non appare al momento provata, dati epidemiologici segnalano il rischio di uso improprio (ad esempio, da parte degli atleti, per migliorare la prestazione agonistica), o di franco abuso, come testimonia la comparsa, negli ultimi decenni, di un mercato illegale dell'i. Del resto tale rischio è avvalorato da indagini sperimentali, le quali hanno dimostrato che, nel ratto, l'i. è dotata di effetti enterocettivi che l'animale impara rapidamente a riconoscere: è noto che tali effetti, se presenti nell'uomo, possono contribuire all'insorgenza di comportamenti d'abuso.

Il meccanismo d'azione dell'i. non è stato ancora completamente compreso. L'osservazione che l'i. potenzia l'effetto analgesico della morfina nel topo e allevia alcuni dei sintomi dell'astinenza da oppiacei nel ratto depone a favore di una sua possibile attività a livello dei recettori oppioidergici. Gli studi finora condotti hanno dimostrato che l'i. lega i recettori di tipo κ ed è praticamente inattiva sui δ e sui μ . Tuttavia, alcuni dati evidenziano una sua attività agonistica dei recettori oppioidergici di tipo μ .

Oltre alle già ricordate interazioni dell'i. con il sistema dopaminergico ed oppioidergico, sono state messe in luce anche una sua possibile azione modulante sulla trasmissione serotoninergica e un'attività antagonista dei recettori NMDA; a quest'ultimo fenomeno è stata attribuita la capacità dell'i. di attenuare la sindrome da astinenza da oppiacei. Nel complesso, i dati finora disponibili sembrano indicare l'esistenza di interazioni tra l'i. e i sistemi neurotrasmettitoriali serotoninergico, dopaminergico e oppioidergico. L'i. interagisce anche con il sistema colinergico, con

i canali del sodio dipendenti dal voltaggio e forse con i recettori GABAergici.

Bibliografia

- Codd E. E., *Life Sci.*, 1995, **57**, 315.
 Kesner R. P., Jackson Smith P., Henry C., Amman K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1995, **51**, 103.
 Popik P., Laver R. T., Skolnick P., *Pharmacol. Rev.*, 1995, **47**, 235.
 Schechter M. D., Gordon T. L., *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, **249**, 79.

MARIA IRENE CIOLI

IBRIDAZIONE: V. IBRIDAZIONE (VII, 1101-1106); GENETICA*, *ibridazione in situ* (coll. *3326-3329); SONDE MOLECOLARI*, *ibridazione degli acidi nucleici* (coll. *6742-6747); SONDE MOLECOLARI**.

IDIOTA SAPIENTE, SINDROME DELL'

F. *idiot savant*. - I. *savant syndrome*; *idiot savant syndrome*. - T. *Savant-Syndrom*. - S. *idiotta sabio*.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2627). - **Bambini con ritardo mentale e/o con psicosi infantile** (col. 2628): *Diagnosi dei genitori contro diagnosi clinica di ritardo mentale*. - *Specializzazioni particolari o precoci in bambini con ritardo mentale e/o con psicosi infantili* (col. 2629): *Bambini iperverbali*. - *Bambini iperlessici*. - *Piccoli scienziati*. - *Talenti meccanici, talenti figurativi, talenti mimici, talenti musicali*.

Introduzione

Tutti gli individui forniscono ottime prestazioni rispetto ad alcuni settori, prestazioni discrete rispetto ad altri settori e prestazioni scadenti o pessime rispetto ad altri settori ancora.

Questo rilievo piuttosto comune risulta più evidente o sembra più clamoroso per alcune particolari popolazioni: le persone che hanno dei talenti molto particolari ed eccezionali; le persone e specialmente i bambini che hanno dei disturbi psichiatrici (nella quasi totalità dei casi ritardo mentale e psicosi infantili).

Il fenomeno non costituisce soltanto una curiosità scientifica o pseudo-scientifica ma, per quanto raro, rappresenta un banco di prova per diverse teorie sull'intelligenza e per diverse teorie sull'organizzazione neuropsicologica del cervello.

Cerchiamo di considerare la questione nel suo insieme e, subito dopo, di approfondirla nel terreno strettamente clinico.

Che un grande matematico possa essere un pessimo violinista o un meccanico pasticciere non desta grande meraviglia. Sembra pacifico a tutti che competenze molto sofisticate possano essere acquisite soltanto con una grande specializzazione e che l'ipertrofia di una funzione psicologica possa essere pagata con un basso investimento o sviluppo di un'altra funzione psicologica, non necessaria rispetto alla prima. I grandi educatori del '700 insegnavano il mito che una educazione perfetta ed armonica potesse produrre intelligenze superiori ed armoniche per ogni talento e specializzazione. Questa sfida pedagogica rimane aperta, ma nessuno ha scoperto il metodo pedagogico univer-

Rispetto ai bambini la questione ha un grande interesse: sappiamo o crediamo che ogni bambino nasca con diverse maturazioni nelle singole aree corticali e che i processi educativi possano sfruttare ed incentivare alcune maturazioni o disposizioni potenziali, senza per questo ledere (almeno spesso) altre potenzialità che si sviluppano secondo altri ritmi cronologici?

Una valutazione molto delicata e prudente va fatta sulla persistenza di queste maturazioni specializzate precoci: nella gran parte dei casi non è dimostrato che bambini molto «geniali» in un certo settore, diventino più geniali in altri settori ed anche che rimangano «geniali» nello stesso settore in cui hanno cominciato a brillare, magari con qualche spintarella educativa eccessiva.

Le teorie che si scontrano nei due primi esempi (adulti e bambini con talenti molto specializzati) sono due: una *prima teoria* che vede l'intelligenza come saturata da un fattore generale: se si è intelligenti in un settore è probabile che si possa essere o diventare intelligenti anche in un secondo o in un terzo settore; una *seconda teoria* che vede l'intelligenza come un complesso organizzato di più fattori o funzioni: in questo senso si potrebbe, già per definizione, essere molto intelligenti in un settore o molto poco intelligenti in un altro settore. Ambedue le teorie, comunque, si pongono il quesito del travaso (o del compenso) dell'intelligenza: a) un'intelligenza generale brillante dovrebbe poter attivare, quasi spontaneamente, dei compensi per intelligenze settoriali meno brillanti, in potenza; b) un'intelligenza settoriale molto sofisticata e brillante dovrebbe costituirsi come base per operazioni più astratte che potrebbero coinvolgere ed incentivare lo sviluppo di altre abilità intellettive, in partenza un poco fragili.

Bambini con ritardo mentale e/o con psicosi infantile

Il dibattito più acceso si è animato, tuttavia, intorno ai bambini che avendo un *ritardo mentale* e/o una *psicosi infantile* rivelano delle abilità molto notevoli e sproporzionate rispetto alla loro organizzazione cognitiva di base.

La constatazione clinica esiste e, oltre a richiedere una spiegazione esauriente, nasconde un dubbio molto profondo e, in parte, comprensibile e giustificato: quando facciamo la diagnosi di ritardo mentale o di psicosi infantile siamo ben sicuri di aver esaminato in luce ed in controluce tutte le potenzialità del bambino? Siamo sicuri di non aver esagerato una parte della valutazione e trascurato un'altra parte? In definitiva: il rilievo clinico di bambini con ritardo mentale e/o con psicosi infantile è molto spesso un dubbio socratico (se non una provocazione) sulla diagnosi di base: forse se siamo riusciti a dimostrare che quel bambino è molto intelligente in un certo settore potremmo esserci sbagliati nella nostra diagnosi generale di ritardo mentale.

È molto importante considerare la varietà dei casi, e la varietà delle dimostrazioni con cui questo fenomeno e questo dibattito vengono riportati in discussione.

Diagnosi dei genitori contro diagnosi clinica di ritardo mentale

Per evidenti motivi la diagnosi di *ritardo mentale* (in specie se di grado medio) è accettata con molta lentezza, con molta fatica e con molto dolore dai genitori; tant'è che potendo essere posta quasi sempre intorno ai 30-36 mesi viene fatta in gran percentuale fra i 5 ed i 7 anni e, persino, tra i 9 ed i 10 anni.

In queste situazioni, i genitori (e spesso anche qualche tecnico impreparato) con grande passione e sincerità cercano di portare prove a favore dell'intelligenza certa dimostrabile nel loro bambino. Queste prove sono sempre le stesse: a) la precisione di alcuni ricordi (memoria episodica e anche, meno spesso, memoria semantica e memoria spaziale); b) la capacità di fare alcune furbizie, marachelle o gioco di doppia intenzione (fingere di fare una cosa per ottenerne un'altra). Queste segnalazioni sono sempre esatte ma rivelano due mezze verità: 1) indicano le competenze in cui questi bambini sono cresciuti, proprio *senza* aver potuto utilizzare un'intelligenza organizzatrice attiva; 2) indicano

delle competenze che, per quanto superiori alle altre possedute dal bambino, corrispondono a quelle di un bambino di qualche anno.

Specializzazioni particolari o precoci in bambini con ritardo mentale e/o con psicosi infantile

Elenchiamole, perché sono sempre le stesse: 1) linguaggio verbale; 2) linguaggio scritto; 3) calcolo; 4) musica; 5) abilità meccaniche; 6) abilità motorie. Prima di cercare una spiegazione complessiva a tutti questi fenomeni, veri e dimostrati, dobbiamo fare alcune precisazioni generali.

a) Negli ultimi 15 anni studi epidemiologici, nosografici e catamnestici accurati hanno dimostrato che ritardo mentale e psicosi infantili precoci sono molto raramente due diagnosi contrapposte; su 100 bambini con psicosi infantili precoci da 70 a 85 hanno anche un ritardo mentale di diverso grado; su 100 bambini con ritardo mentale da 40 a 60 hanno anche dei tratti psicotici, dei disturbi psicotici o persino un'organizzazione psicotica frustra della personalità.

b) Nello stesso periodo, è stato anche dimostrato che sia nei bambini con ritardo mentale sia nei bambini con psicosi infantile precoce ci può essere una compromissione molto diversa a carico dell'intelligenza verbale o a carico dell'intelligenza logico-spaziale o a carico delle abilità motorie prassiche. Considerando il diverso grado in cui nello stesso bambino può esprimersi e il ritardo mentale e la psicosi infantile ed il diverso grado di maturazione cui possono arrivare le diverse competenze intellettive, abbiamo una tavola quasi completa dei diversi quadri clinici che potremmo incontrare e che, in effetti, incontriamo.

Questi diversi quadri clinici debbono essere valutati con molta attenzione: prima di esprimerci, come qualche volta è stato fatto, con frette, sulla certezza della patogenesi e sulla certezza del modello neurobiologico sottostante; è necessario fornire una documentazione attendibile su due dati correlati: a) la reale padronanza con cui questi bambini possiedono i loro «talenti speciali»; b) l'organizzazione complessiva di personalità che questi bambini con ritardo mentale e psicotici strutturano intorno ai loro «specialissimi talenti».

Bambini iperverbali

Per molti sottotipi di bambini con ritardo mentale è stato descritto un gruppo di cosiddetti bambini iperverbali; vale a dire: bambini che dimostrano una pronuncia fonologica, un patrimonio semantico ed una organizzazione sintattica molto più in avanti rispetto alla loro età mentale. Prima controprova: la maggioranza assoluta di questi bambini iperverbali fanno dei ragionamenti esattamente compatibili con la loro età mentale (se non peggio). Seconda controprova: moltissimi tra questi bambini usano il loro iperverbalismo o come un meccanismo di scarica dell'ansia (che invece ne viene accentuata) o come un meccanismo di controllo magico sull'ambiente (e cioè parlano per non interagire o per iterare continue domande che non attendono nessuna risposta e non si soddisfano da alcuna proposta).

Bambini iperlessici

Molti bambini con Quoziente Intellettivo (Q.I.) di 40/50 leggono e scrivono. In primo luogo questo dato, va correlato con l'età cronologica e con l'età mentale: un bambino, che ha 10 anni e che ha un'età mentale di circa 5 anni, può leggere per definizione. Se questa prestazione è ottenuta qualche mese od anche un anno prima, bisogna valutare cosa significhi per questi bambini leggere e scrivere: nell'80% dei casi i bambini iperlessici leggono senza capire quello che leggono e scrivono copiando o sotto dettatura lettera per lettera. In altri termini: spesso hanno acquisito soltanto una competenza meccanica e non una competenza

intelligente ed utile. In molti casi, forzando meno il bambino ed aspettando qualche mese, il bambino leggerebbe e scriverebbe comprendendo quello che fa ed utilizzando dei testi minimi, ma significativi, per la sua vita sociale presente e futura.

Piccoli scienziati

Un discorso simile può esser fatto anche per i bambini che avendo un ritardo mentale e/o una psicosi infantile dimostrano delle competenze in apparenza inattese per il calcolo, per qualche tipo di repertorio collezionistico (calciatori, attori, dischi) o di interesse sui fenomeni della natura (astronomia, storia).

Per queste situazioni, l'analisi è diversa: a) quasi sempre si tratta di bambini con ritardo mentale lieve e con una psicosi infantile non pervasiva; b) rimane il fatto che spesso le competenze segnalate come miracolose sono più meccaniche che intelligenti; c) tuttavia è anche vero che questo tipo di specializzazioni ha anche una valenza psicologica costruttiva, perché il bambino cerca di mettere ordine, in qualunque modo gli sia possibile, una realtà interna confusa e caotica. Le preoccupazioni che sottendono questi interessi monotematici sono frequentemente collegate con fantasie arcaiche molto importanti; spesso questi bambini si avvalgono di un intervento psicoanalitico, che sonde la base delle preoccupazioni piuttosto che di un intervento pedagogico condizionante, che sfrutti le loro paure senza dare loro un senso.

Talenti meccanici, talenti figurativi, talenti mimici, talenti musicali

Sono molto meno segnalati, ma sono abbastanza frequenti. Sono relativamente più presenti nei bambini con ritardo mentale lieve e medio, piuttosto che nei bambini con psicosi infantile. In ambedue le casistiche corrispondono ad abilità reali, anche se non eccezionali, e possono costituire un punto importante per legare questi bambini alla realtà, alla comunicazione, alla percezione di poter produrre e scambiare qualcosa con il mondo. In un modo o nell'altro questi talenti rivelano una strategia attiva nel costruire una realtà rappresentazionale organizzata, che dia maggiore spazio ai loro sentimenti e alle loro capacità di iniziativa.

Se individuati e incentivati precocemente, naturalmente ed in contesti interattivi, questi talenti possono contribuire a sollecitare anche lo sviluppo di un linguaggio verbale e di un pensiero verbale non ecoici.

Bibliografia

- Miller L. K., *Musical Savants: Exceptional skills in instrumentally retarded*, 1989, Erlbaum, Hillsdale (New Jersey).
O'Connor N., Hermelin B., *Psychological Medicine*, 1991, 21, 959-964.
Spits H. H., *Am. J. Mental Retardation*, 1994, 98/5, 601-616.
Treffert D. A., *Am. J. Psychiatry*, 1988, 145(5), 563-572.
Treffert D. A., *Extraordinary people. Understanding savant syndrome*, 1990, Ballantine Books, New York.
Treffert D. A., *Savant Syndrome*, in *Encyclopedia of Learning and Memory*, 1992, McMillan, New York.

GABRIEL LEVI

IMIDAZOLINICI RECETTORI

SOMMARIO

Introduzione (col. 2630). - **Recettori I₁** (col. 2631). - **Recettori I₂** (col. 2632). - **Agonisti endogeni dei recettori imidazolinici** (col. 2633).

Introduzione

Diversi farmaci dotati di azione ipotensiva arteriosa o capaci di agire sui sistemi di trasporto ionico sono caratteriz-

IMIDAZOLINICI RECETTORI

zati da una struttura imidazolinica (clonidina, cirazolina, moxonidina), guanidinica (guanabenz, amiloride) o oxazolidinica (rilmenidina). Degli effetti farmacologici di questi prodotti, l'ipotensione arteriosa, classicamente riferita all'attività α_2 agonista (v. CATECOLAMINE [v.**]), è successivamente risultata almeno in parte riconducibile all'interazione con siti di legame imidazolinici.

È stato osservato nell'animale da esperimento che vari α_2 agonisti a struttura imidazolinica, somministrati per microiniezione nella porzione rostrale ventrolaterale del bulbo, determinano ipotensione arteriosa di intensità non correlabile alla loro affinità per i recettori α_2 e, degli antagonisti α_2 , solo quelli a struttura imidazolinica sono in grado di bloccare questi effetti (Parini *et al.*, 1996). L'esistenza di recettori imidazolinici ha trovato ulteriore sostegno a) nella diversa densità di distribuzione nel S.N.C. dei siti di legame imidazolinici e α_2 catecolaminici; b) nella separazione da estratti proteici renali o della midollare del surrene di una frazione con affinità per le imidazoline distinta da quella con affinità per le catecolamine; c) nell'isolamento dal cervello di vitello di una frazione proteica parzialmente purificata denominata *clonidine displacing substance* (CDS) per la sua capacità di spostare la clonidina dal suo legame con i recettori adrenergici del S.N.C. (Li *et al.*, 1994).

L'impiego di radioliganti imidazolinici ha portato a localizzare i siti di ricognizione imidazolinici in diversi tessuti e a distinguere due tipi recettoriali caratterizzati da alta affinità per la clonidina (recettori I_1) o per l'idazoxano (recettori I_2); di questi ultimi sono stati identificati due sottotipi con alta e bassa affinità per l'amiloride (rispettivamente recettori I_{2A} e I_{2B}). Proposte per l'esistenza di altri tipi o sottotipi sono state avanzate sulla base di indiziari dati farmacologici non compatibili con le distinzioni finora accettate (Molderings e Göthert, 1995).

Recettori I_1

Sul piano biologico-molecolare resta aperta la caratterizzazione di questi recettori: se ne esclude l'appartenenza alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G e, dal punto di vista della trasduzione del segnale, se ne è ipotizzata la capacità di interferire con i canali del potassio ATP dipendenti [v. POTASSIO**] (Chan, 1993) o quella di regolare i livelli intracellulari del Ca^{2+} attraverso meccanismi indipendenti dai canali del Ca^{2+} (Regunathan *et al.*, 1991).

L'impiego di radioliganti ($[^3H]$ *p*-aminoclonidina) ha documentato la presenza di questi recettori nel S.N.C. (in particolare nel bulbo) del ratto, del bue e dell'uomo con localizzazione esclusivamente neuronale, nel rene di ratto, nelle piastrine umane, nelle cellule cromaffini surrenali del bue, nel globo carotico del gatto e del coniglio (Ernsberger *et al.*, 1993).

Sul piano funzionale, alla loro attivazione si attribuisce una parte non trascurabile dell'azione ipotensiva arteriosa degli α_2 agonisti imidazolinici. In questo campo alla clonidina e analoghi (v. IPOTENSIVE SOSTANZE*) si sono affiancate la rilmenidina e la moxonidina (fig. 1) proposte come agonisti α_2 di seconda generazione perché dai primi si differenziano per una prevalente affinità per i siti di ricognizione I_2 e per la proprietà alla quale si vuol ricondurre una minore incidenza di effetti collaterali quali la sedazione e l'iporeflessia (Parini *et al.*, 1996). All'interazione con i recettori I_2 si è associata la caduta della pressione intracranica che spiega l'applicazione topica di moxonidina nel trattamento dell'ipertensione idiopatica da parte delle cellule delle isole pancreatiche esposte in vitro all'azione di vari agonisti imidazolinici (Chan, 1993). L'azione

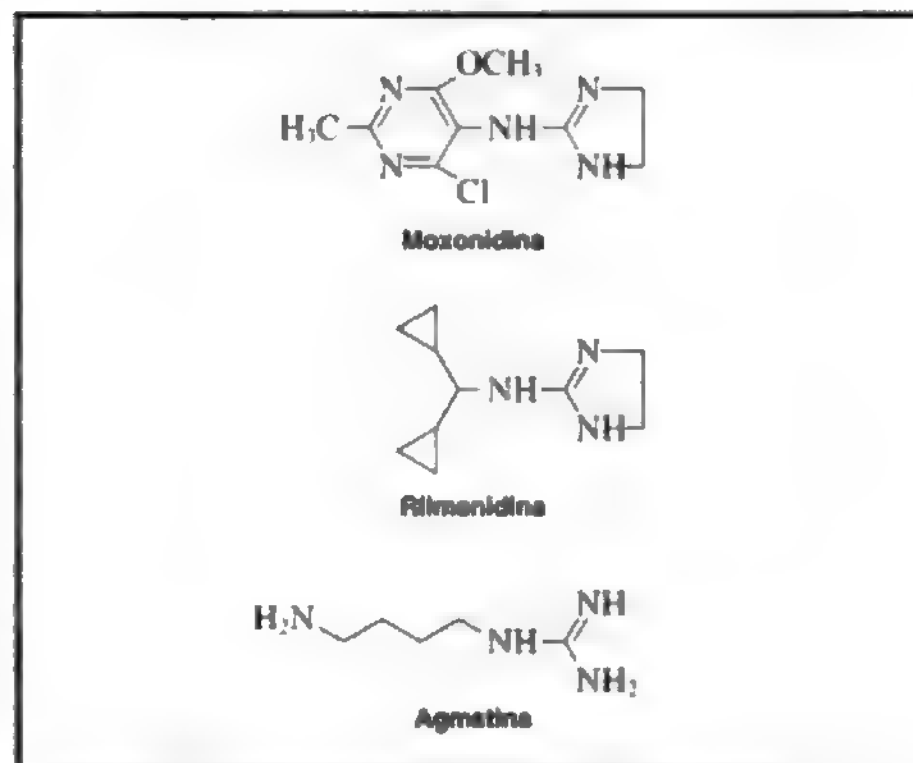


Fig. 1. Formule di struttura della moxonidina, della rilmenidina e della agmatina.

natriuretica della moxonidina direttamente infusa nel circolo renale del ratto (Ernsberger *et al.*, 1993); infine, l'inibizione della secrezione gastrica e l'azione protettiva nei modelli sperimentali di gastropatia ulcerosa osservata con la moxonidina (Glavin e Smyth, 1995).

Recettori I_2

Più avanzate sono le conoscenze sulla biologia molecolare di questi recettori: esse orientano a identificare i sottotipi I_{2A} e I_{2B} con i due tipi di monoamino ossidasi (MAO_A e MAO_B) [v. ANTIDEPRESSIVI FARMACI**]. Sostengono questo apparentamento l'equivalenza del peso molecolare apparente, l'omologia di diverse sequenze aminoacidiche, la comparsa di siti di legame I_2 nelle cellule del lievito portate a esprimere la molecola della MAO e l'immunoprecipitazione di recettori I_2 con anticorpi monoclonali anti MAO_A e anti MAO_B (Parini *et al.*, 1996).

L'identità con la MAO spiega l'ampia distribuzione dei recettori I_2 nei diversi organi e tessuti (nel S.N.C. in sede neuronale e astrogiale, nel polmone, nelle isole pancreatiche, nel rene, nelle cellule cromaffini surrenali, negli adipociti e nella placenta), nonché la loro localizzazione mitocondriale in aggiunta a quella sulla membrana cellulare.

Ovvia quindi la funzione che a questi recettori si assegna quali modulatori dell'attività monoamino ossidasi. Diversi composti imidazolinici inibiscono l'attività della MAO con intensità correlata alla loro affinità per i recettori I_2 i quali occupano, nella molecola dell'enzima, un sito non localizzabile nel nucleo prostetico adenin-nucleotidico o nel sito catalitico sul quale agiscono i classici inibitori della MAO (Limon Boulez *et al.*, 1996). Resta da verificare l'ipotesi che dal diverso punto di attacco con cui i composti imidazolinici modulano l'attività della MAO possano derivare più articolate indicazioni e modalità di impiego della terapia anti-MAO.

L'equivalenza con la MAO non sembra potere esaurire tutte le funzioni dei recettori I_2 . Differenze stechiometriche nella presenza dei recettori I_2 e della MAO esistono in diversi tessuti (con prevalenza delle molecole di MAO su quelle recettoriali I_2); dal cervello di ratto, dal midollo allungato dell'uomo, dal tessuto cromaffine surrenale di bue sono state estratte proteine con caratteri recettoriali I_2 ma

con peso molecolare divergente per eccesso o per difetto da quello della MAO. La stessa localizzazione di recettori I_2 sulla membrana cellulare configura funzioni non assimilabili alla modulazione dell'attività MAO. Nel rene di coniglio, recettori I_2 localizzati nella porzione basolaterale delle cellule dei tubuli prossimali modulano il trasporto Na^+/H^+ operato da queste cellule (Ernsberger *et al.*, 1993).

Agonisti endogeni dei recettori imidazolinici

L'origine estrattiva della CDS (v. sopra) e la sua affinità per i siti di legame clonidini, che risulta correlata a diverse attività biologiche della sostanza (liberazione di catecolamine dalle cellule cromaffini surrenali, inibizione dell'aggregazione piastrinica da catecolamine, inibizione della risposta contrattile del dotto deferente del ratto alla stimolazione elettrica), hanno suggerito l'esistenza di un principio endogeno funzionalmente attivo per interazione con i r. i. (Li *et al.*, 1994). L'imprecisa caratterizzazione chimica della CDS, cui si imputavano discrepanze negli effetti funzionali ad essa attribuiti (Michel e Ernsberger, 1992), potrebbe considerarsi superata con la constatazione che un composto aminoguanidinico, l'agmatina (fig. 1), presente nella CDS, ne condivide le fondamentali caratteristiche (spiazzamento della clonidina, liberazione di catecolamine dalle cellule cromaffini surrenali).

L'agmatina deriva dall'arginina per azione dell'arginina decarbossilasi, enzima largamente diffuso nei vegetali e nei batteri ma anche presente nel S.N.C. del ratto. Sempre nel ratto significativi livelli di agmatina sono stati riscontrati nello stomaco e, con valori decrescenti, nell'aorta, nell'intestino tenue, nella milza, nel surrene, nel rene, nel muscolo scheletrico e nel cervello (Raasch *et al.*, 1995). Per quanto dotata di affinità per i recettori I_1 e I_2 non è possibile, allo stato attuale, considerare l'agmatina il principio responsabile di tutta l'attività biologica della CDS (Piletz *et al.*, 1996) ed è ancor più prematuro assegnare ad essa il significato di mediatore coinvolto nelle funzioni, ancora da definirsi, controllate dai r. i. Gli effetti opposti a quelli della moxonidina che l'agmatina esercita sulla secrezione gastrica e sui modelli di gastropatia ulcerosa del ratto ha fatto, fra le altre, prospettare l'ipotesi che l'agmatina agisca a livello centrale come agonista inverso dei recettori I_1 (Glavin *et al.*, 1996), ossia come composto dotato di maggiore affinità per lo stato inattivo del recettore e quindi capace di spostarne l'equilibrio verso questo stato determinando effetti opposti a quelli di un tipico agonista.

Bibliografia

- Chan C. K. S., Sannajust F., Hoad G. A., *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1996, **276**, 411-420.
 Chan S. L. F., *Clin. Sci.*, 1993, **85**, 671-677.
 Ernsberger P., Damon T. H., Graff L. M. *et al.*, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1993, **264**, 172-182.
 Glavin G. B., Carlisle M. A., Smyth D. D., *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1996, **274**, 741-744.
 Glavin G. B., Smyth D. D., *Br. J. Pharmacol.*, 1995, **114**, 751-754.
 Li G., Regunathan S., Colin J. *et al.*, *Science*, 1994, **263**, 966-968.
 Limon Boulez I., Tesson F., Gargalidis-Moudanos C., Parini A., *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1996, **276**, 359-364.
 Michel M. C., Ernsberger P., *TIPS*, 1993, **13**, 369-370.
 Molderings G. J., Gothert M., Naunyn-Schmiedeberg *Arch. Pharmacol.*, 1995, **351**, 507-516.
 Parini A., Gargalidis-Moudanos C., Pizzinat N., Lanier S. M., *TIPS*, 1996, **17**, 13-16.
 Piletz J. E., Cikkala N., Ernsberger P., *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1996, **272**, 581-587.
 Raasch W., Regunathan S., Reis D. J., *Life Sci.*, 1995, **56**, 2319-2330.
 Regunathan S., Evinger M. J., Meeley M. P., Reis D. J., *Biochem. Pharmacol.*, 1991, **42**, 2011-2018.

AMH CARE CARPI DI RUSMINI

IMMERSIONE VERTICALE FINO AL COLLO (Head-out Water Immersion)

SOMMARIO

Cenni storici (col. 2634). - Considerazioni metodologiche (col. 2635). - Effetti emodinamici centrali e periferici (col. 2635). - Effetti sul ricambio idrico-minerale (col. 2639). - Effetti endocrini (col. 2641). - Immersione in particolari condizioni patologiche (col. 2644). - Immersione e stati di ipogravità (col. 2646). - Future applicazioni (col. 2646).

Cenni storici

L'immersione verticale in acqua fino al collo [i.v.a.] comporta l'applicazione di una pressione idrostatica che agisce sul corpo del soggetto e si potenzia con la profondità del mezzo di immersione, inducendo una marcata centralizzazione del volume ematico dalla periferia al distretto cardiopolmonare (ipervolemia centrale). La manovra può essere prolungata nel tempo senza particolare disagio per il soggetto, facendosi preferire ad approcci alternativi di centralizzazione meno confortevoli, quali l'applicazione di una pressione positiva alla metà inferiore del corpo (lower body positive pressure), il sollevamento passivo degli arti, l'uso di manicotti gonfiabili, a scopo antigravitazione, applicati agli arti inferiori. Già dal 1847 Henry Hartshorne teorizzò la possibile esistenza di recettori cardiaci (volocettori) in grado di «apprezzare» l'ipervolemia centrale indotta dalla manovra immersiva, ma spetta a Gauer ed Henry (1963) la dimostrazione della presenza di recettori di volume nel

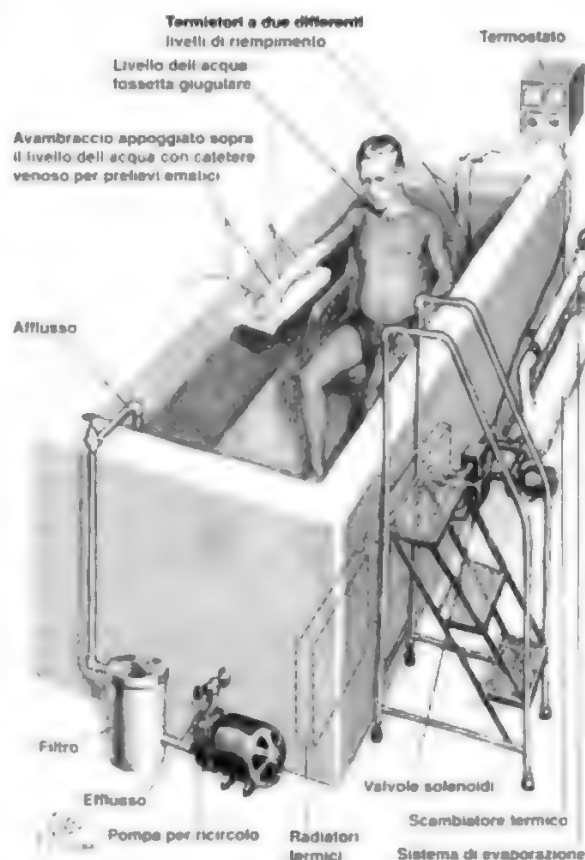


Fig. 1. Metodologia e tecnica di immersione in acqua. (Da *Simposi Clinici CIBA*, 1996, n. 4, per gentile autorizzazione).

IMMERSIONE VERTICALE FINO AL COLLO

distretto cardiopolmonare a bassa pressione, che veniva così individuato quale area in grado di «monitorare» le variazioni di volume risultanti dalla redistribuzione dei liquidi circolanti durante immersione.

Considerazioni metodologiche

I servizi di immersione sono stati sempre più perfezionati nel corso degli anni ma la tecnica immersiva rimane facilmente praticabile anche in assenza di tecnologie sofisticate (fig. 1).

Per una corretta esecuzione della manovra di i.v.a. appare indispensabile il rispetto di alcune regole essenziali:

a) garanzia di termoneutralità del mezzo di immersione ($34,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) che è quasi sempre rappresentato da acqua naturale; la temperatura deve mantenersi ovviamente costante per tutta la durata dell'esperimento;

b) la posizione del soggetto è solitamente seduta, più raramente ortostatica, con gli arti superiori posizionati, confortevolmente, al di fuori della vasca di immersione; è nota la inefficacia della manovra (mancata centralizzazione del volume) allorché il soggetto sia immerso in posizione supina;

c) la profondità del mezzo di immersione garantisce una adeguata centralizzazione tanto più marcata quanto più immerso risulta il soggetto.

Per ulteriori approfondimenti degli aspetti tecnici della manovra di i.v.a. si rimanda alla dettagliata rassegna di Epstein (1978).

Effetti emodinamici centrali e periferici

È noto che l'i.v.a. provoca un'immediata redistribuzione del volume sanguigno dal distretto venoso degli arti inferiori e da quello splancnico nell'area cardiopolmonare (ca. 700 ml) inducendo il fenomeno della «ipervolemia centrale» (fig. 2). I meccanismi che mediano la compartimentazione

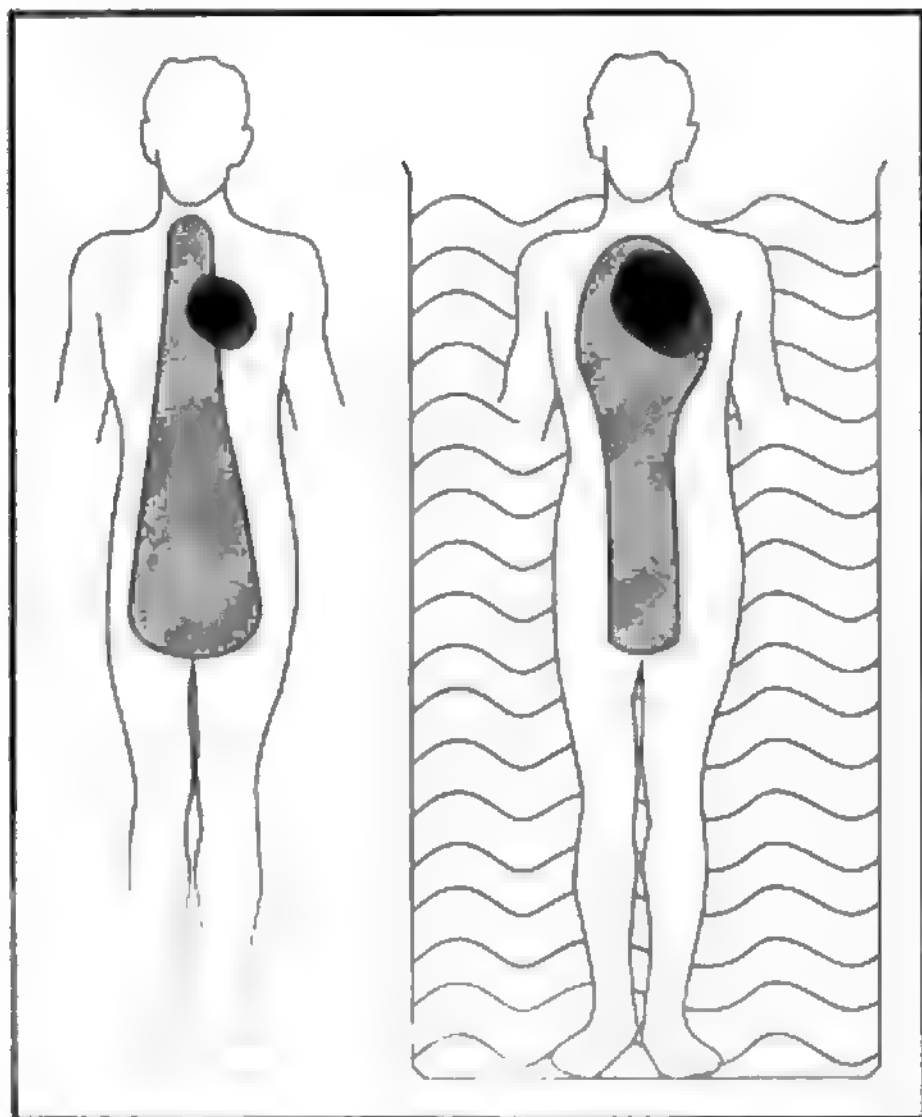


Fig. 2. I.p.v.a. e ipervolemia centrale durante immersione in acqua.

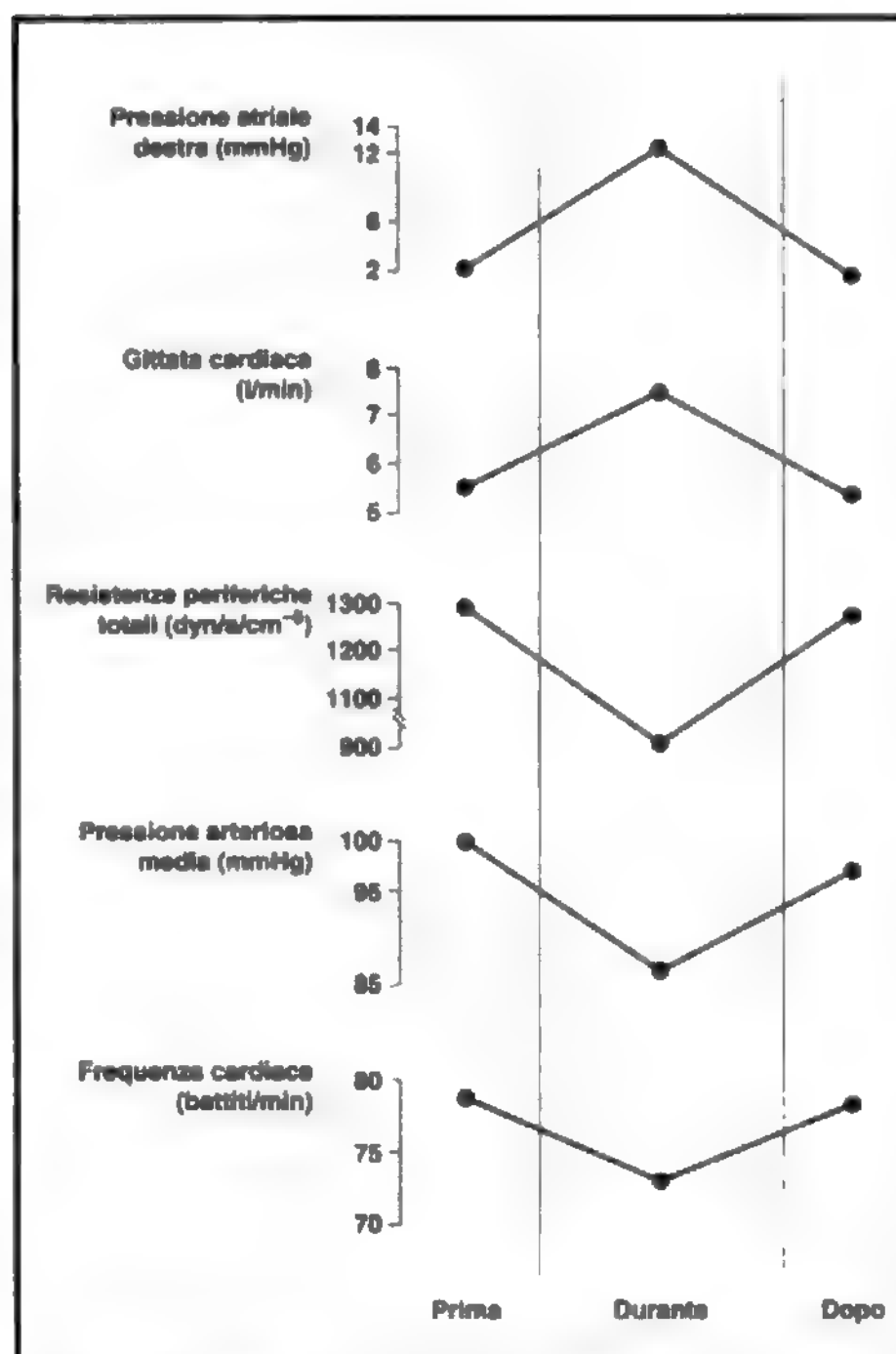


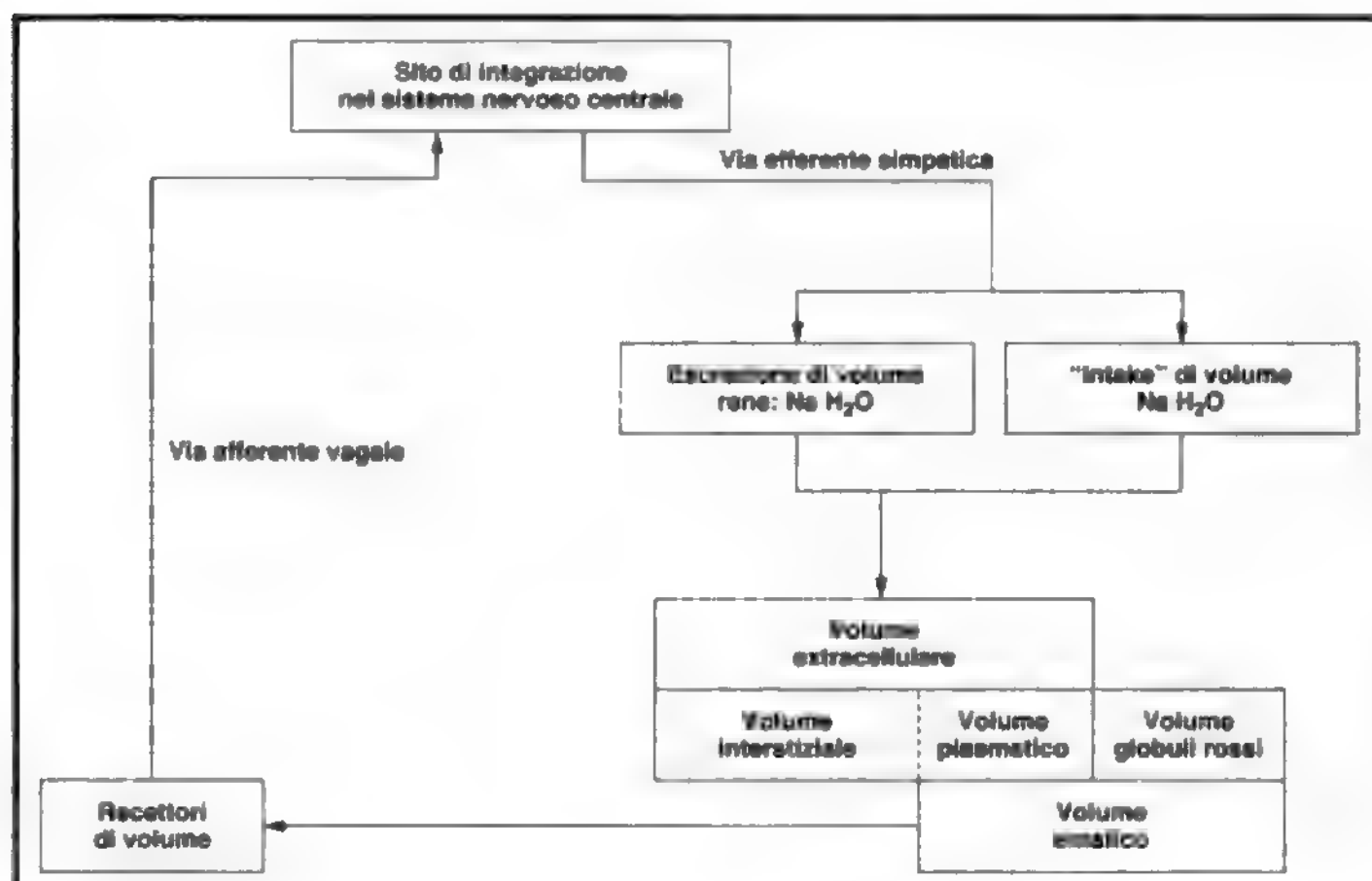
Fig. 3. Emodinamica centrale durante immersione in acqua nel soggetto normale.

del volume circolante nel distretto cardiopolmonare includono sia l'attivazione di un gradiente pressorio idrostatico sulla superficie corporea sia la traslocazione transcapillare di liquido dallo spazio interstiziale al compartimento plasmatico.

Arborelius *et al.* (1972) hanno evidenziato che con l'inizio della manovra di immersione si assiste ad un marcato incremento della pressione venosa centrale (CVP) sino a valori di 14-15 mmHg, della gittata cardiaca (CO), determinata sia con il metodo di Fick che con termodiluizione (incremento medio del 32%), della gittata sistolica (35%) e ad un significativo calo delle resistenze periferiche totali calcolate (-35%). La frequenza cardiaca (HR) risulta significativamente ridotta, mentre il comportamento della pressione arteriosa non appare univoco, avendo alcuni AA. (Epstein *et al.*, 1981) segnalato valori pressori sostanzialmente invariati a fronte di altri rilievi (Coruzzi *et al.*, 1985b; Myers *et al.*, 1988) che evidenziano un significativo decremento sia della pressione sistolica che di quella diastolica (fig. 3).

Skorecki e Brenner (1981) hanno ampiamente dettagliato e discusso sia il ruolo dei sensori preposti al controllo delle variazioni del volume liquido extracellulare che i meccanismi effettori che partecipano alla regolazione dei liquidi circolanti. I principali sensori di volume sono rappresentati dai recettori cardiopolmonari (atriali, ventricolari,

Fig. 4. Meccanismo di regolazione neurogena del volume extracellulare e del volume plasmatico.



del circolo polmonare), dai barocettori arteriosi (carotidei e aortici), dai meccanocettori renali e da recettori di volume sia del sistema nervoso centrale che del territorio epatico.

I meccanismi effettori principali includono il filtrato glomerulare, fattori peritubulari e lumenali renali, i nervi renali, sostanze endocrine (sistema renina-aldosterone, ormone natriuretico, dopamina, prostaglandine, etc.) e la distribuzione intrarenale del flusso ematico.

L'attività dei recettori di volume dell'atrio sinistro rappresenta un esempio classico di meccanismo neurogeno di regolazione del volume circolante. I meccanocettori dell'atrio sinistro, che svolgono il ruolo di sensori nel sistema circolatorio a bassa pressione, posseggono una ben definita distensibilità (*compliance*) che si adegua alle pressioni di riempimento del volume intravascolare e risponde a variazioni della tensione di parete, scaricando impulsi attraverso le afferenze vagali (fig. 4). Le fibre vagali hanno una loro appropriata rappresentazione a livello del sistema nervoso centrale (midollo allungato e ipotalamo), le cui efferenze simpato-neuroendocrine sono in grado di modulare la sensazione di sete, l'escrezione renale di acqua e sodio e la redistribuzione del volume liquido extracellulare. La stimolazione dei meccanocettori dell'atrio sinistro induce, inoltre, una marcata soppressione dell'attività efferente simpatica diretta al rene, con conseguente significativa vasodilatazione renale senza importanti variazioni del filtrato glomerulare (Linden, 1979).

Appare ormai ampiamente documentato il controllo tonico-inibitorio esercitato dall'attivazione dei recettori cardiopolmonari sul traffico simpatico diretto al rene (Linden, 1979). Peraltro, emergono dati conflittuali dalle diverse esperienze sperimentali, alcune delle quali non hanno evidenziato variazioni del filtrato glomerulare e della portata renale plasmatica (PRP) (Epstein, 1978) mentre altre hanno segnalato importanti risposte vasodilatatorie caratterizzate da significativi aumenti della PRP, con marcata riduzione della frazione di filtrazione (FF), in assenza di significative modificazioni del filtrato glomerulare (Coruzzi *et al.*, 1986; Van Tilborg *et al.*, 1995). Anche sulla base dell'analisi del trasporto transglomerulare del destrano, è stato suggerito che, durante immersione, si verifichi un importante decremento della pressione vigente nei capillari glomerulari (Myers *et al.*, 1988b).

Più recentemente è stato anche valutato il comportamento delle resistenze renali totali e in particolare di quelle precapillari glomerulari; Coruzzi *et al.* (1988b) hanno evidenziato che l'immersione si associa a significativo incremento della «pressione di cuneo» intrarenale (*wedged pressure*) a livello dei capillari peritubulari, che si assume essere sovrapponibile alla pressione interstiziale renale. Tale pressione appare, tra i fattori fisici, elemento determinante nella modulazione del riassorbimento sodico, che risulta pertanto inibito durante immersione anche per incremento della pressione interstiziale renale (tab. I).

TAB. I. IPERVOLEMIA CENTRALE ED EMODINAMICA RENALE

(Tratta da *Cardiologia*, 1987, 32 (8), pp. 759-762)

	C_{in} (ml/min)	C_{PAH} (ml/min)	FF (%)	Resistenze precapillari (dyn/cm ⁵)	IRVP (mmHg)
C	109 ± 4	629 ± 34	17.5 ± 0.7	5357 ± 363	18 ± 1.4
W	113 ± 3.7	738 ± 42	15.4 ± 0.5	3378 ± 152	32 ± 1.7
P	NS	< 0,001	< 0,001	< 0,005	< 0,001

C: controllo, W: immersione in acqua. C_{in} : clearance inulina, C_{PAH} : clearance PAH, FF: frazione di filtrazione, IRVP: pressione venosa intrarenale, NS: non significativo.

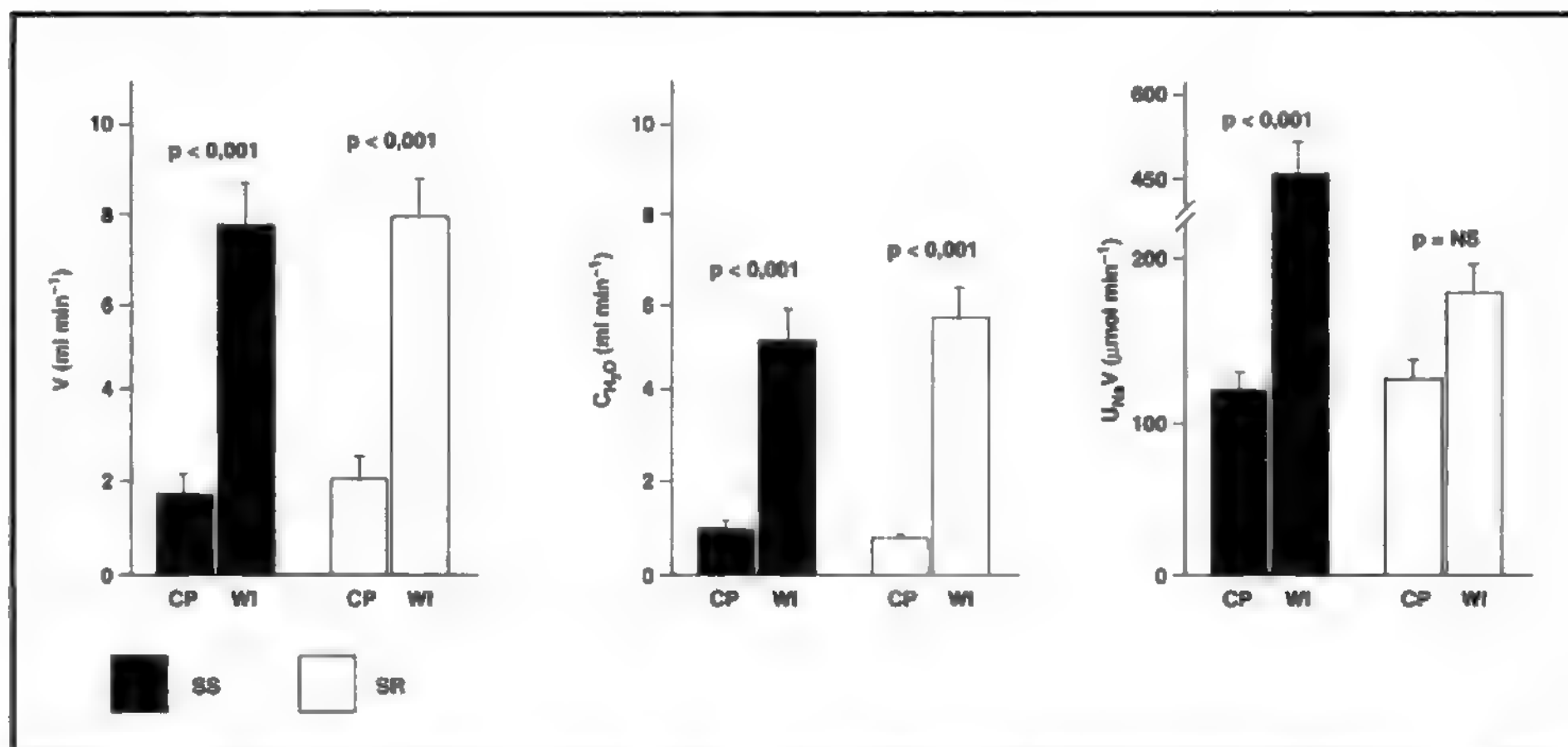


Fig. 5. Volume urinario (V), acqua libera da elettroliti (C_{H_2O}) e risposta natriuretica ($U_{Na}V$) prima (CP) e durante 2 h di immersione (WI) in soggetti sodio-sensibili (SS) e sodio-resistenti (SR). NS) non significativo. (Da Coruzzi et al., 1993b, ridisegnata e modificata).

Appare, infine, appropriato considerare che un marcato incremento della gittata cardiaca si rifletta in un proporzionale aumento sia del flusso splancnico che di altri distretti. È stato così evidenziato che la maggior quota della incrementata gittata cardiaca è diretta verso il tratto gastrointestinale, fegato, milza, senza precoci incrementi del flusso al muscolo scheletrico; più tardivamente, nel proseguo dell'immersione, il flusso sanguigno muscolare aumenta, come dimostrato da rilievi pletismografici, a fronte di una riduzione del flusso addomino-viscerale (Hajduczyk et al., 1987).

V. anche: CIRCOLATORIO APPARATO*, il cuore: recettori atriali. Recettori di volume; VOLEMIA.

Effetti sul ricambio idrico-minerale

L'immersione in acqua fino al collo, in posizione seduta, induce una marcata risposta diuretica e natriuretica.

Un significativo incremento dell'escrezione urinaria di sodio viene segnalato in soggetti normali ed in diverse condizioni patologiche caratterizzate da ritenzione di sodio (Epstein, 1992). La dimostrazione di un significativo incremento della frazione escreta del sodio filtrato (FE_{Na}) indica che l'evento natriuretico è principalmente imputabile ad un ridotto riassorbimento tubulare di sodio piuttosto che a modificazioni del carico filtrato; durante immersione si verifica un importante evento diuretico, sostanzialmente legato ad un aumento della clearance dell' H_2O libera, pur se associato ad incremento significativo della clearance osmolare (fig. 5). La significativa risposta natriuretica appare essere la conseguenza di un ridotto riassorbimento a livello dei segmenti nefronici sia prossimale che distale, con preferenza per il primo, come dimostrato dall'aumento della clearance di marker prossimali, quali litio, fosfato ed ac. urico. Sono molteplici i meccanismi implicati nella modulazione della risposta natriuretica all'immersione: a) inibizione dell'asse angiotensina-aldosterone; b) aumentata secrezione di peptide natriuretico, c) aumento della secrezione di ANP (Atrial Natriuretic Peptide) e di BNP (B-type Natriuretic Peptide) che individua il cuore come organo endocrino (V. FATTORI NATRIURETICI ATRIALI**); d) diminuzione

di catecolamine ad azione sodio-ritentiva diretta, quali la noradrenalina; e) aumentata produzione di dopamina; f) modificazione di fattori fisici, quali la pressione interstiziale renale; g) aumentata produzione di ouabain-like factor (v. sotto), quale inibitore umorale del trasporto sodico (fig. 6).

Alla risposta natriuretica si associa, non invariabilmente, un'importante kaliuresi, pur in presenza di marcata diminuzione dei livelli circolanti di aldosterone. Mentre l'escrezione urinaria di potassio non si rapporta obbligatoriamente a quella del sodio, è stata recentemente individuata una stretta relazione tra escrezione sodica ed eliminazione di calcio in soggetti sia normali che ipertesi sottoposti ad ipervolemia centrale da immersione (Coruzzi et al., 1993a). L'espansione di volume centrale induce un marcato incremento sia della natriuresi che della calciuria risultando i due parametri altamente correlati sia in soggetti normali ed ancor più in pazienti con ipertensione essenziale (fig. 7); la stretta interrelazione tra sodiuria ed escrezione urinaria di calcio è probabilmente in grado di giustificare, come già segnalato da Mac Gregor e Cappuccio (1993), l'elevata incidenza di osteoporosi e nefrolitiasi dell'iperteso, specie se sodio-sensibile. Lo stretto rapporto tra calciuria e sodiuria, durante immersione, è anche confermato dal riscontro di una netta riduzione dell'escrezione di calcio in soggetti immersi che non presentino una significativa risposta natriuretica.

In pazienti che presentano elevata calciuria, durante immersione, si manifesta anche un incremento dell'escrezione urinaria di magnesio, il tutto in assenza di variazioni significative dell'escrezione di fosfato e dei livelli sierici di paratormone.

La manovra di immersione è anche in grado di evidenziare gli stretti rapporti che intercorrono tra escrezione calcica e patrimonio potassico. Dopo prolungata dieta a contenuto potassico drasticamente ridotto (16 mEq/die) si assiste, nei soggetti normali sottoposti ad immersione, ad una perdita urinaria di calcio associata a cospicua natriuresi, così dimostrando che la perdita di calcio è sodio-dipendente e viene potenziata significativamente dalla deple-

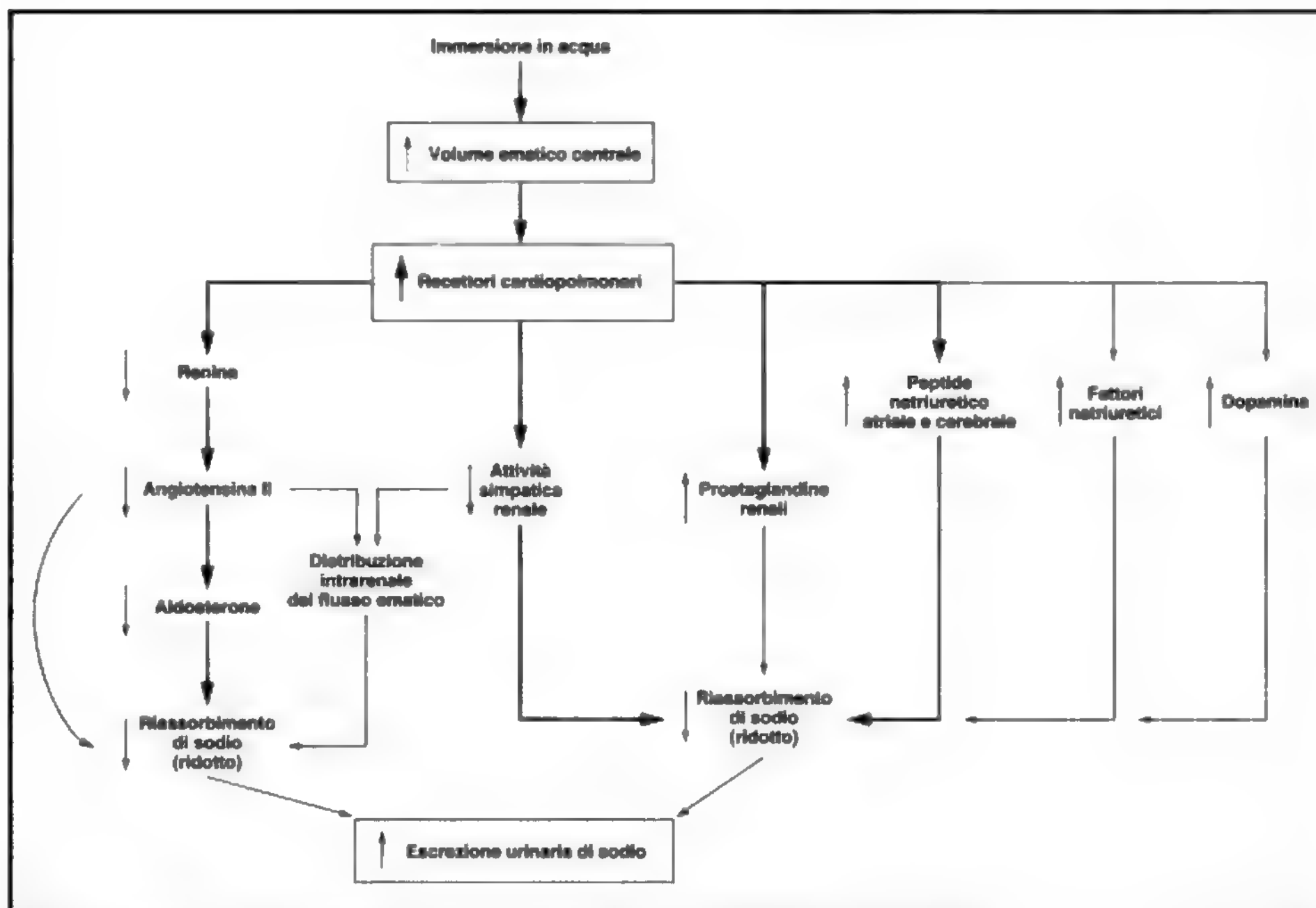


Fig. 6. Meccanismi natriuretici durante ipervolemia centrale da immersione in acqua.

zione dietetica di potassio (Coruzzi e Novarini, dati non pubblicati).

Poiché è ampiamente documentata la particolare predisposizione alla morbidità e mortalità cardiocircolatorie di soggetti che abusano di sale e scarseggiano di apporto dietetico di calcio, potassio e magnesio, l'utilizzo di manovre quali l'immersione può risultare particolarmente indicato al fine di individuare precoci alterazioni a carico del metabolismo dei vari cationi, in soggetti maggiormente a rischio per patologie cardiovascolari.

Effetti endocrini

La stimolazione dei recettori di volume cardiopolmonari induce profonde modificazioni della risposta neuroendocrina implicata nella regolazione sia dei volumi circolanti che dell'omeostasi pressoria.

L'immersione provoca una marcata inibizione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (v. RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE, SISTEMA) sia in soggetti normali che in condizioni di iperaldosteronismo secondario, quali la cirrosi epatica (Epstein *et al.*, 1977), la sindrome nefrosica (Krishna e Danovitch, 1982) e l'ipertensione nefrovascolare (Coruzzi *et al.*, 1985a). Non è stata rilevata, al contrario, una diminuzione degli elevati livelli basali di renina in soggetti con feocromocitoma (Coruzzi *et al.*, 1992), mentre modeste, non significative variazioni dei livelli plasmatici di aldosterone vengono riportate in soggetti con iperaldosteronismo da adenoma surrenalico (immersione come test diagnostico) (Coruzzi *et al.*, 1991; Coruzzi *et al.*, 1994b).

A conferma di precedenti rilievi ottenuti con gonfiaggio di palloncino in atrio destro (Baertschi *et al.*, 1976), si è evidenziato, inoltre, che l'immersione induce inibizione del-

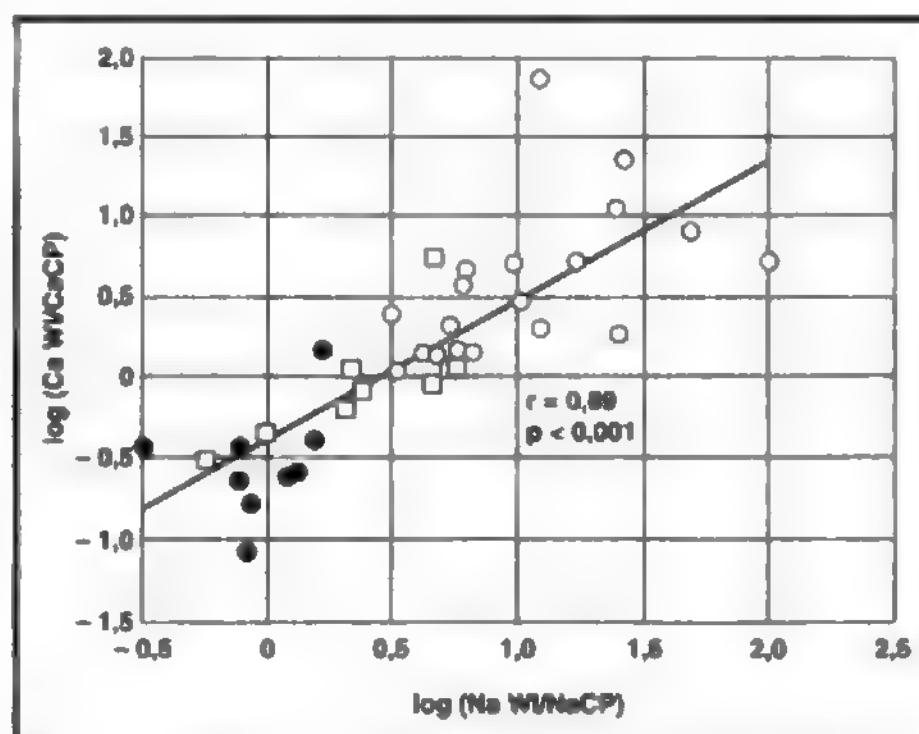


Fig. 7. Rapporto tra sodiuria e calciuria espresso come rapporto tra immersione (WI) e periodo di controllo (CP) in 10 normotesi (○) e 20 ipertesi essenziali (●) (○). (Da Coruzzi *et al.*, 1993a, ridisegnata e modificata).

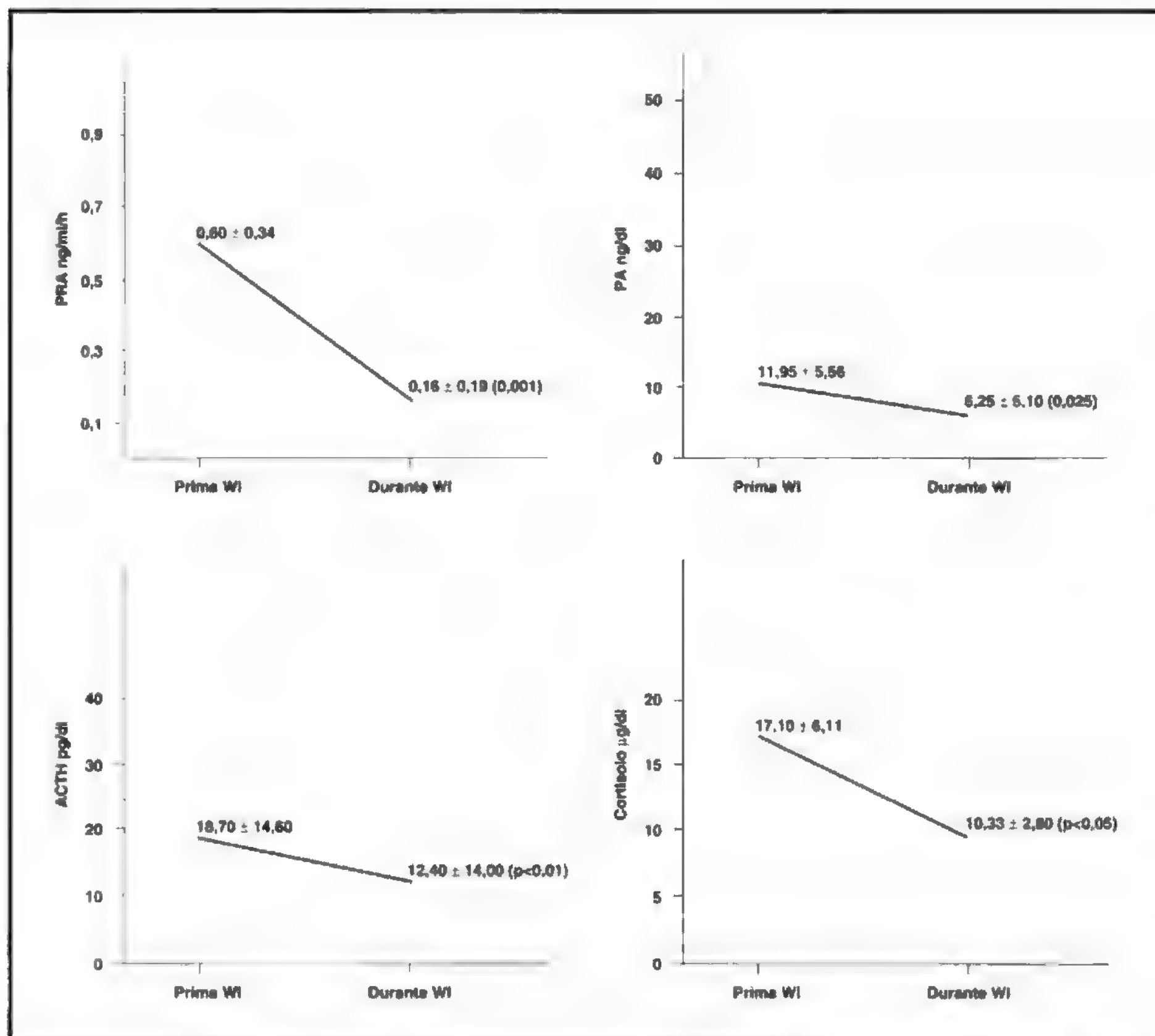


Fig. 8. Variazioni di renina (PRA, attività reninica plasmatica), aldosterone (PA), ormone adrenocorticotropo (ACTH) e cortisolo durante immersione (WI) in soggetti normali. (Da Coruzzi *et al.*, 1984, ridisegnata e modificata).

l'asse ACTH-cortisolo (Coruzzi *et al.*, 1984) (fig. 8) e provoca aumento dei livelli sierici di *ormone della crescita* (Novarini *et al.*, 1982).

L'attivazione del sistema barocettivo a bassa pressione provoca, inoltre, una significativa inibizione dell'asse *argina-vasopressina* (ADH), con risultante risposta diuretica.

Un'intera cascata di *agenti natriuretici* viene di fatto attivata dalla manovra di immersione e comprende: a) la liberazione di un composto plasmatico con attività inibitoria dell' Na^+/K^+ -ATPasi (*ouabain-like factor* [OLF]), la cui concentrazione nel plasma, secondo alcune osservazioni, aumenta a seguito dell'immersione e al cessare di questa prontamente diminuisce; b) pronto e marcato aumento di un peptide di origine atriale (ANP) che si è dimostrato inibire l'attività renale e di aumentare la secrezione di prostaglandine (PGI₂ e 6 keto-PGF_{1α}), associati a risposta natriuretica che può essere bloccata dalla contemporanea somministrazione

di farmaci antinfiammatori non steroidei, quali l'indometacina (Epstein, 1992); d) significativo incremento dei livelli sia plasmatici che urinari di dopamina, con concomitante diminuzione dei livelli circolanti di noradrenalina (Grossman *et al.*, 1992). Il blocco del sistema dopaminergico (v. DOPA E DOPAMINA [v.; v.*]; CATECOLAMINE**), con farmaci antagonisti specifici e non (domperidone e metoclopramide [v.]), induce una risposta antinatriuretica (Coruzzi *et al.*, 1987), e importanti variazioni del sistema oppioidergico endogeno (v. OPIOIDI PEPTIDI*) sono state segnalate durante ipervolemia centrale, a conferma del postulato ruolo degli oppioidi endogeni nella modulazione dell'omeostasi dei volumi circolanti e della pressione arteriosa (Coruzzi *et al.*, 1988a; Van Tilborg *et al.*, 1995).

Immersione in particolari condizioni patologiche

La tecnica di immersione, validata da significativi risultati nell'ambito di indagini fisiopatologiche, è stata anche uti-

lizzata, a fini diagnostico-terapeutici, in diverse condizioni patologiche, quali la cirrosi epatica in fase di compenso e non (Bichet *et al.*, 1983; Epstein, 1986a), la sindrome nefrosica (Berlyne *et al.*, 1981), l'ipertensione essenziale o quella secondaria da iperaldosteronismo, feocromocitoma o nefrovascolare: nel trapianto cardiaco (Myers *et al.*, 1988) e renale (Coruzzi *et al.*, 1994a).

La base razionale per il suo impiego è la considerazione che, in situazioni particolari quali le sindromi edemigene, la riduzione della «volemia efficace», intesa come corretto equilibrio tra contenuto (volume circolante) e contenente (albero vascolare), ha un ruolo di rilievo nel mediare risposte sia emodinamiche (renali in particolare) che neuroendocrine, attivate dalla periferia quale tentativo di compenso, peraltro svantaggioso, della riduzione del volume circolante efficace e della pressione di perfusione. L'immersione può indurre un marcato incremento della volemia efficace centrale, attivando così il sistema barocettivo a bassa pressione con conseguente tonico, inibitorio controllo delle risposte emodinamiche ed endocrine; la inibizione del tono efferente simpatico ai vari distretti periferici, secondaria alla stimolazione dei volocettori, sopprime le esuberanti e spesso controproducenti risposte endocrine ed emodinamiche. Ne risentono favorevolmente sindromi oligo-anuriche di natura funzionale, come la cirrosi scompensata, l'insufficienza renale acuta circolatoria, lo scompenso cardiaco. L'attesa risposta natriuretica è il risultato di tali positive influenze.

L'immersione è in grado di indurre una rapida, intensa espansione della volemia centrale nella cirrosi scompensata e nella sindrome nefrosica, come è dimostrato da un significativo incremento della pressione atriale destra, dell'indice cardiaco e della pressione di cuneo dei capillari polmonari. L'attivazione dei volocettori e la conseguente risposta inibitoria simpatica efferente provocano una netta diminuzione degli elevati livelli di arginina-vasopressina (con marcata diuresi) e di aldosterone (iperaldosteronismo secondario) ed un'attivazione del sistema delle prostaglandine con ulteriore, evidente risposta natriuretica. La diuresi e la natriuresi si manifestano anche in soggetti con sindrome epato-renale sottoposti ad immersione a fini terapeutici (Bichet *et al.*, 1984).

Altro campo di applicazione dell'i.v.a. è rappresentato dall'ipertensione arteriosa primitiva e secondaria, allo scopo di valutare l'abilità omeostatica nei confronti del volume circolante da parte dell'iperteso che è in grado di mantenere l'omeostasi sodica a spese di una pressione arteriosa più elevata (rapporto pressione/natriuresi). I soggetti ipertesi, durante ipervolemia centrale, non dimostrano, peraltro, comportamenti omogenei per ciò che riguarda la capacità di eliminare sodio. Sia il fenomeno della «esagerata natriuresi» sia una ridotta capacità natriuretica sono stati evidenziati in soggetti ipertesi sottoposti ad immersione (Epstein *et al.*, 1986b) e gli aspetti fisiopatologici che sottendono tali differenti comportamenti sono a tutt'oggi oggetto di indagini approfondite al fine di ottimizzare, individualizzandola, la terapia antipertensiva (scelta preferenziale per i diuretici o i calcioantagonisti o gli ACE-inibitori).

Va, infine, segnalata la recente applicazione dell'i.v.a. quale test diagnostico abile a qualificare lo stato di sodio-sensibilità o sodio-resistenza di soggetti sia normali che ipertesi. L'immersione si è rivelata un soddisfacente test di sodio-sensibilità, come è dimostrato dalla evidente, marcata risposta natriuretica esibita dai soggetti sodio-sensibili a confronto con quelli sodio-resistenti (fig. 5) (Coruzzi *et al.*, 1993b). L'immersione è quindi in grado di sostituire, a tale scopo, test più indaginosi e meno confortevoli caratterizzati da prolungati e poco graditi provvedimenti dietetici (diete ipersodiche a confronto con marcate restrizioni di sodio).

Immersione e stati di ipogravità

L'immersione in acqua simula per alcuni aspetti uno stato di microgravità. Ma tra le risposte fisiologiche da immersione e quelle indotte da assenza di peso o da ipogravità in una navicella spaziale o durante volo a traiettoria parabolica su aereo si evidenziano alcune sostanziali differenze. Pur essendo, infatti, elemento comune di entrambe le condizioni l'ipervolemia centrale con aumento della pressione di riempimento cardiaca, quest'ultima riconosce differenti determinanti poiché, durante assenza di peso, l'importanza del *pooling* venoso (fondamentale durante immersione) risulta minimizzata. Va, inoltre, segnalato che la forza gravitazionale è presente sia durante immersione che in ipogravità, ma la sua efficacia è sostanzialmente neutralizzata soltanto durante ipogravità da volo orbitale (Norsk e Epstein, 1991).

Pur potendo l'immersione riprodurre efficacemente risposte da stato di ipogravità, non appare pertanto opportuno e corretto estrapolare in modo semplicistico dagli effetti fisiologici dell'immersione a quelli del volo spaziale umano.

V. SPAZIALE MEDICINA [V.; V.*; V.**].

Future applicazioni

Si è già detto sopra che l'ipertensione essenziale e quella secondaria possono rappresentare un proficuo campo di applicazione della tecnica di immersione in quanto metodo efficace ed altamente riproducibile di redistribuzione del volume ematico circolante.

Il razionale per il suo impiego parte dalla non omogenea risposta natriuretica che si può ottenere nell'iperteso essenziale immerso; il paziente iperteso può, infatti, presentare un comportamento che va da una pressoché nulla risposta natriuretica sino al manifestarsi di una ipernatriuresi nota come «esagerata natriuresi». Lo studio integrato degli eventi emodinamici, neuroendocrini e renali durante immersione potrà forse chiarire tali discrepanze nella risposta natriuretica.

Un ulteriore campo di applicazione della tecnica di immersione potrà essere rappresentato dal suo utilizzo al fine di caratterizzare le risposte endocrine e renali in figli normotesi di genitori ipertesi, dal momento che numerosi Autori hanno individuato, nei primi, precoci alterazioni delle funzioni renale, endocrina e simpatica. Appare, infatti, opportuno delineare meglio le primarie alterazioni dell'ipertensione umana prima dell'avvento di altri meccanismi secondari all'ipertensione stessa, che potrebbero renderne più difficile la corretta interpretazione fisiopatologica. Si propone, quindi, l'utilizzo dell'immersione come approccio non farmacologico per valutare lo spettro delle alterazioni renali che caratterizzano questi soggetti, predisposti all'ipertensione, ma ancora normotesi.

Le risposte renali e neuroendocrine di atleti ben allenati potranno essere confrontate con la *performance* emodinamica (ecocardiografia) di quelli di essi che presentano ipertrofia ventricolare sinistra. In questi soggetti può, inoltre, essere verificata l'abilità o meno da parte del cuore ipertrofico di inibire più o meno adeguatamente, durante immersione, il tono simpatico basale, caratterizzando così, in termini più approfonditi, la incerta «benignità» dello stato ipertrofico dell'atleta.

Le interrelazioni tra sistema oppioide, attività simpatica e sistema vasodilatatore dell'ossido nitrico (v. MONOSSIDO DI AZOTO**) potranno essere studiate durante blocco del sistema oppioidergico (naloxone) o del nitrossido (L-NMMA) in soggetti sia normotesi che ipertesi sottoposti ad espansione del volume cardiopolmonare durante immersione.

IMMERSIONE VERTICALE FINO AL COLLO

V. anche: CIRCOLATORIO APPARATO [v.; v.*; v.**]; RIFLESSI VASCOLARI; SUBACQUEA MEDICINA.

Bibliografia

- Arborelius M. jr., Balldin U. I., Lilja B., Lundgren C. E. G., *Aerosp. Med.*, 1972, **43**, 592.
 Atkov O. Y., Bednenko V. S., Fomina G. A., *Aviat. Space environ. Med.*, 1987, **58** (suppl. 9), A69.
 Baertschi A. J., Ward D. G., Gann D. S., *Am. J. Physiol.*, 1976, **231**, 692.
 Berlyne G. M., Sutton J., Brown C. et al., *Clin. Sci.*, 1981, **61**, 605.
 Bichet D. G., Groves B. M., Schrier R. W., *Kidney Int.*, 1983, **24**, 788.
 Bichet D. G., Groves B. M., Schrier R. W., *Am. J. Kidney Dis.*, 1984, **3**, 258.
 Coruzzi P., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994b, **78**, 455.
 Coruzzi P., Biggi A., Musiari L. et al., *Clin. Sci.*, 1985a, **68**, 609.
 Coruzzi P., Biggi A., Musiari L. et al., *Pfluegers Arch.*, 1986, **407**, 638.
 Coruzzi P., Biggi A., Musiari L. et al., *Metabolism*, 1993a, **42**, 1331.
 Coruzzi P., Musiari L., Biggi A. et al., *J. Hypertens.*, 1987, **5**, 587.
 Coruzzi P., Musiari L., Biggi A. et al., *Kidney Int.*, 1988b, **33**, 875.
 Coruzzi P., Musiari L., Biggi A. et al., *Am. J. Hypertens.*, 1991, **4**, 694.
 Coruzzi P., Musiari L., Biggi A. et al., *J. Hum. Hypertens.*, 1992, **6**, 239.
 Coruzzi P., Musiari L., Mossini G. L. et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1993b, **53**, 593.
 Coruzzi P., Musiari L., Mossini G. L. et al., *Clin. Nephrol.*, 1994a, **41**, 225.
 Coruzzi P., Novarini A., Biggi A. et al., *Nephron*, 1985b, **40**, 309.
 Coruzzi P., Novarini A., Musiari L. et al., *Nephron*, 1984, **36**, 238.
 Coruzzi P., Ravanetti C., Musiari L. et al., *Clin. Sci.*, 1988a, **74**, 133.
 Epstein M., *Physiol. Rev.*, 1978, **58**, 529.
 Epstein M., *Hepatology*, 1986a, **6**, 312.
 Epstein M., *Physiol. Rev.*, 1992, **72**, 563.
 Epstein M., Levinson R., Sancho J. et al., *Circ. Res.*, 1977, **41**, 818.
 Epstein M., Loutzenhiser R., Levinson R., *Hypertension*, 1986b, **8**, 422.
 Epstein M., Preston S., Weitzman R. E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1981, **52**, 256.
 Gauer O. H., Henry J. P., *Physiol. Rev.*, 1963, **43**, 423.
 Grossman E., Goldstein D. S., Hoffman A. et al., *Am. J. Physiol.*, 1992, **262**, R993.
 Hajduczek G., Miki K., Claybaugh J. R. et al., *Am. J. Physiol.*, 1987, **253**, R254.
 Harshorne H., *Water versus Hydrotherapy or an Essay on Water and its true Relations to Medicine*, 1897, Smith, Philadelphia, PA, p. 28.
 Krishna G., Danovitch G. M., *Kidney Int.*, 1982, **21**, 393.
 Kvetnansky R., Davydova N. A., Noskov V. B. et al., *Acta Astronautica*, 1988, **17**, 181.
 Leach C. S., *Aviat. Space environ. Med.*, 1983, **54** (suppl. 1), S50.
 Leach C. S., *Aviat. Space environ. Med.*, 1987, **58** (suppl. 9), A74.
 Linden R. J., *Am. J. Cardiol.*, 1979, **44**, 879.
 Mac Gregor G. A., Cappuccio F. P., *J. Hypertens.*, 1993, **11**, 781.
 Myers B. D., Peterson C., Molin C. et al., *Am. J. Physiol.*, 1988, **254**, F562.
 Norsk P., Epstein M., *Am. J. Nephrol.*, 1991, **11**, 81.
 Novarini A., Coruzzi P., Musiari L. et al., *Eur. Rev. Med. & Pharm. Sci.*, 1982, **IV**, 241.
 Skorecki K. L., Brenner B. M., *Am. J. Med.*, 1981, **70**, 77.
 Thornton W. E., Moore T. P., Pool S. L., *Aviat Space environ. Med.*, 1987, **58** (suppl. 9), A86.
 Van Tilborg K. A., Rabelink T. J., Koornans H. A., *Kidney Int.*, 1995, **48**, 860.
 Weil-Malherbe H., Smith E. R. B., Bowles G. R., *J. Appl. Physiol.*, 1968, **24**, 146.

PAOLO CORUZZI E ALMERICO NOVARINI

IMMUNITÀ [v. vol. VII, coll. 1351-1441; Agg. I, coll. 3607-3619]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2647). - Superantigeni (col. 2648). - Attivazione dei linfociti T (col. 2650). - Attivazione dei linfociti B (col. 2655).

Introduzione

Negli anni trascorsi dopo il precedente aggiornamento del 1991, l'immunologia molecolare ha proseguito nell'analisi dei meccanismi dell'immunità [1], con risultati di grande

interesse per l'immunologia di base e di notevole importanza per le applicazioni cliniche. Questo aggiornamento si limita alla trattazione dei superantigeni e all'approfondimento dei meccanismi di attivazione dei linfociti, rinviando alla voce CITOCHINE (v.***) la descrizione dei meccanismi molecolari della regolazione della risposta immunitaria.

Superantigeni

Gli antigeni T-dipendenti convenzionali, come la maggior parte delle proteine, possono stimolare le cellule T solo dopo degradazione enzimatica della proteina e presentazione dei peptidi alla cellula T associati a molecole MHC (major histocompatibility complex; v. HLA [v.; v.*; v.**]) distalmente alla membrana citoplasmatica della cellula che degrada e presenta l'antigene (APC, Antigen Presenting Cell). Il recettore antigene-specifico (TCR, T Cell Receptor) della cellula T, costituito dalle catene α e β , riconosce specificamente, mediante le regioni variabili V, D e J, il peptide antigenico, situato nell'incavo della molecola MHC, e le α -eliche adiacenti. L'incavo e le α -eliche appartengono alla regione polimorfica della molecola MHC.

Contrariamente agli antigeni convenzionali, i superantigeni (SAG) sono proteine immunogeniche che, senza essere degradate, possono stimolare le cellule T combinandosi con i siti laterali non polimorfici sia del TCR $\alpha\beta$, specificamente nella regione V β , sia della molecola MHC di classe II della APC (fig. 1). Mediante questo duplice legame, il SAG stimola la proliferazione delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺.

I SAG si legano solo ad alcune regioni V β . Nel topo esistono circa 20 geni V β , ciascuno dei quali è espresso nel 5% delle cellule T. Ogni SAG può legarsi a 1-4 specificità V β e quindi può stimolare circa il 20% delle cellule T, contrariamente agli antigeni convenzionali che stimolano sol-

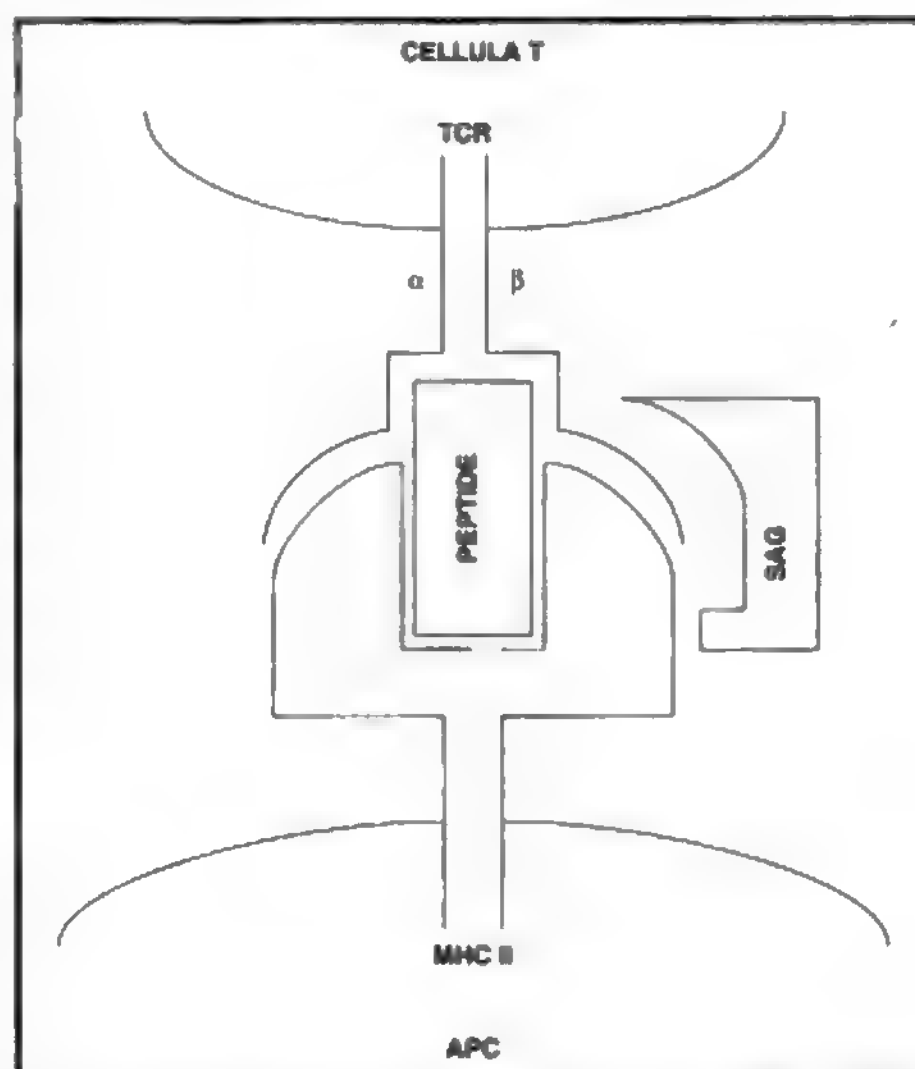


Fig. 1 Interazione tra APC (Antigen Presenting Cell) e cellule T nel riconoscimento di antigeni convenzionali e superantigeni. TCR) T Cell Receptor, SAG) superantigeni. (Cfr. testo).

tanto 1 su 1000-10.000 cellule T. Pertanto, il termine SAG riflette la capacità di questi antigeni di stimolare 1 su 5 linfociti T.

I SAG sono molecole solubili o associate alle membrane cellulari. I SAG solubili sono tossine prodotte da batteri (stafilococchi e streptococchi), micoplasmi e virus. Per es. gli stafilococchi producono le enterotossine A, B, C1, C2, C3, D ed E (SEA, SEB, SEC1-3, SED e SEE) e la tossina che scatena la sindrome dello shock tossico (TSST, *toxic shock syndrome toxin*) (tab. I). La tossicità di queste molecole è dovuta alle grandi quantità di citochine prodotte e rilasciate dai linfociti T stimolati.

L'iniezione di SEB in topi che esprimono V β 8 induce una iniziale espansione della popolazione di cellule T reattive e successivamente morte cellulare per apoptosi (v. **). Durante le prime 12 ore circa il 50% delle cellule T reattive è ucciso dalle citochine (TNF β) rilasciate in grande quantità. Le rimanenti cellule T proliferano e dopo 2-3 divisioni raggiungono un valore massimo al 4° giorno dall'iniezione. Successivamente, le cellule T CD4⁺ muoiono rapidamente per apoptosi e al 10° giorno scendono al 50% del valore iniziale rimanendo a questo livello fino al 30° giorno, mentre la popolazione di cellule T CD8⁺ diminuisce più lentamente e ritorna al valore iniziale al 30° giorno. La rapida diminuzione della popolazione CD4⁺ dopo il 4° giorno potrebbe essere dovuta all'azione citotossica delle cellule T CD8⁺ mediante un meccanismo di riconoscimento specifico idiotipo-anti-idiotipo.

I SAG associati alle membrane cellulari sono frequenti nel topo e sono prodotti da alcuni retrovirus, specialmente

dai virus dei tumori mammari (MMTV, *mouse mammary tumour virus*). Alcuni di questi SAG sono prodotti da MMTV esogeni ma altri sono codificati da provirus (Mtv), integrati nel genoma di topi infettati da MMTV e trasmessi ereditariamente, ed espressi sulla membrana di cellule linfatiche.

Un tipico esempio è rappresentato dagli antigeni Mls (*minor lymphocyte stimulatory*), codificati da Mtv ed espressi in alcuni ceppi di topi sui linfociti B, capaci di stimolare la proliferazione di cellule T di topi di altri ceppi con identico MHC ma privi dello stesso Mls. Le cellule T reattive sono provviste di TCR V β specifico per l'antigene Mls. Per es. Mls-1^a stimola la proliferazione di cellule T che esprimono V β 6, 7, 8.1 oppure 9. Queste specificità V β sono assenti nei tessuti linfatici periferici di topi che ereditano Mtv-7 ed esprimono Mls-1^a, perché durante la maturazione intratimica delle cellule T avviene la selezione negativa contro le cellule autoreattive, mentre sono presenti in topi che non hanno Mtv-7 e quindi non esprimono Mls-1^a. Sono stati identificati 4 SAG Mls, codificati da Mtv integrati in 4 loci di cromosomi diversi. La presenza di un particolare allele Mls in un ceppo di topi è indicata da *a*, mentre l'assenza di un particolare allele Mls è indicata da *b*. Per es. il ceppo AKR che ha integrato Mtv-7 nel cromosoma 1 è definito Mls-1^a, Mls-2^b, Mls-3^b e Mls-4^b mentre il ceppo B10.BR, che non ha alcun Mtv né Mls, è definito Mls-1^b, Mls-2^b, Mls-3^b e Mls-4^b. Pertanto la popolazione di cellule T mature nei tessuti linfatici periferici esprime tutte le specificità V β nel ceppo B10.BR mentre le specificità V β 6, 7, 8.1 e 9 sono assenti nel ceppo AKR.

Lo studio dei SAG Mls ha dimostrato come la selezione negativa delle cellule T autoreattive avviene nel timo di topo. Cellule T V β 6 sono presenti nella corticale e midollare del timo di topi Mls-1^b mentre sono presenti nella corticale ma non nella midollare del timo di topi Mls-1^a. Queste osservazioni suggeriscono che l'eliminazione di cellule T V β 6 in topi che esprimono Mls-1^a avviene nella regione cortico-midollare del timo durante la formazione del repertorio delle specificità delle cellule T mature.

Questo tipo di selezione negativa delle cellule T autoreattive, ben documentato nel topo, non è stato osservato in altre specie animali, compreso l'uomo, nonostante la presenza di retrovirus integrati nel genoma.

Attivazione dei linfociti T

La maggior parte dei linfociti T origina nel timo per maturazione di cellule staminali migrate dai tessuti emopoietici. Avvenuta la selezione positiva e negativa dei timociti, le cellule T mature migrano per via sanguigna dal timo ai tessuti e organi linfatici periferici e da questi alla circolazione linfatica e sanguigna. Le cellule T periferiche sono distribuite clonalmente ed esprimono, in maggioranza, il recettore antigene-specifico TCR $\alpha\beta$, in minoranza il TCR $\gamma\delta$.

Ogni catena polipeptidica del recettore TCR è codificata da geni V, D, J e C riarrangiati durante la maturazione intratimica. I TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ sono associati, mediante legami non covalenti, con i polipeptidi γ , δ , ϵ , ζ e η che partecipano al complesso TCR. Il termine CD3, originariamente riferito a γ , δ e ϵ , è stato esteso a ζ ed η . I 5 polipeptidi si associano a formare i dimeri $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\zeta$ e $\zeta\eta$ (fig. 2). Il TCR $\alpha\beta$ lega specificamente sia il peptide antigenico situato nell'incavo sia i determinanti polimorfici adiacenti della molecola MHC. Le modalità di legame del TCR $\gamma\delta$ non sono state chiarite, ma i segnali e i meccanismi di attivazione della cellula T che originano dalla stimolazione del TCR $\gamma\delta$ sono comuni a quelli iniziati dalla stimolazione del TCR $\alpha\beta$. Anche i corecettori delle cellule T per le molecole accessorie (tab. II) sono espressi su cellule con

TAB. I. SPECIFICITÀ V β DI SUPERANTIGENI (SAG) ENDOGENI ED ESOGENI

SAG di origine batterica	Specificità V β nell'uomo	Specificità V β nel topo
SEA	non determinata	1, 3, 10, 11, 12, 17
SEB	3, 12, 14, 15, 17, 20	7, 8.1, 8.2, 8.3
SEC ₁	12	7, 8.2, 8.3, 11
SEC ₂	12, 13, 14, 15, 17, 20	8.2, 10
SEC ₃	5, 12	7, 8.2
SED	5, 12	3, 7, 8.3, 11, 17
SEE	5.1, 6.1-6.3, 8, 18	11, 15, 17
TSST-1	2	15, 16

Provirus endogeni	Specificità V β	Allele Mls	Cromosoma
Mtv-1	3	4	7
Mtv-2	14		18
Mtv-3	3, 17		11
Mtv-6	3, 17	3	16
Mtv-7	6, 7, 8.1, 9	1	1
Mtv-8	11, 12		6
Mtv-9	5, 11, 12		12
Mtv-11	11, 12		14
Mtv-13	3	2	4

Virus esogeni	Specificità V β
MMTV-C3H	14, 15
MMTV-SW	6, 7, 8.1, 9

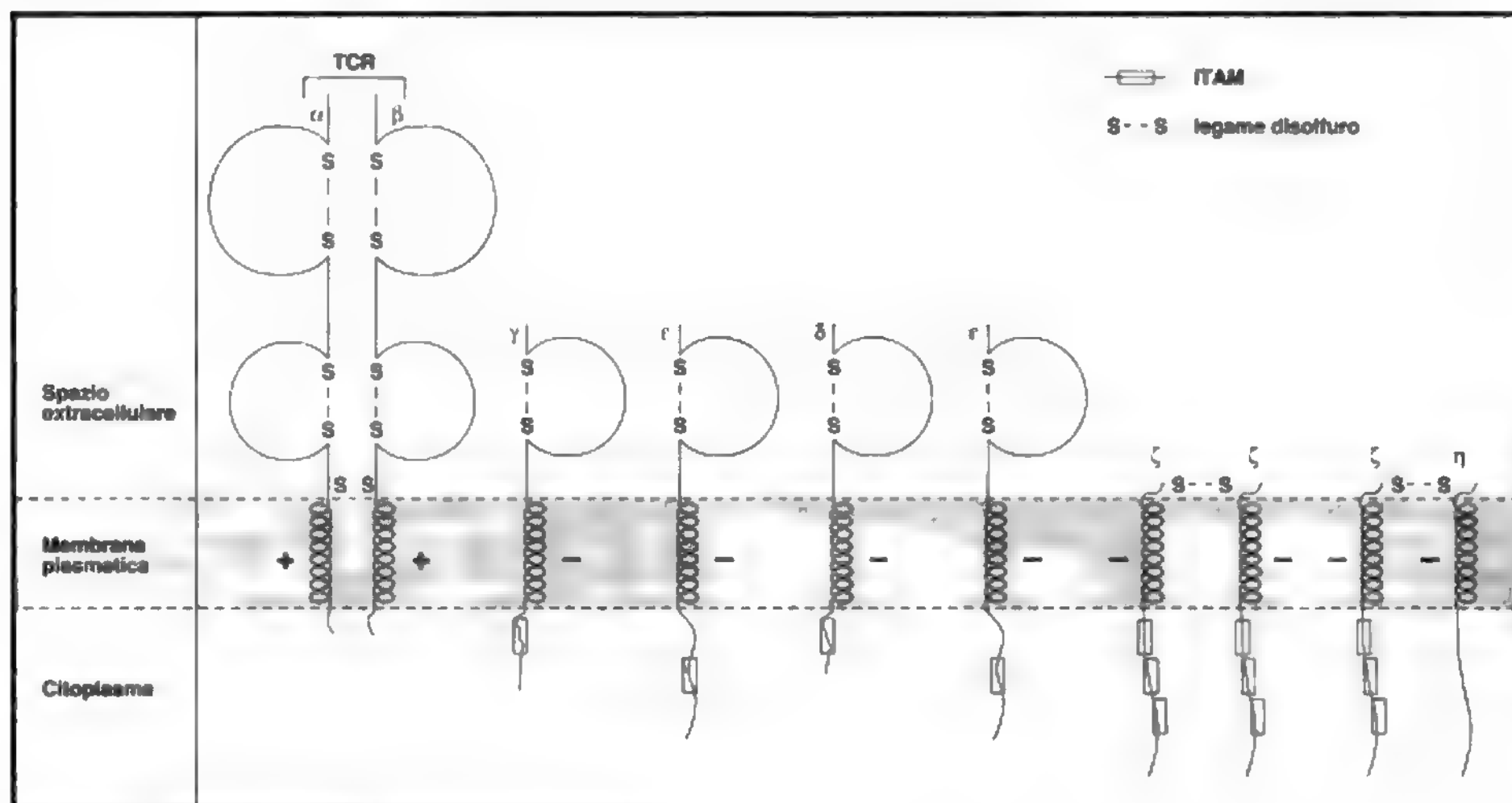


Fig. 2. Componenti del complesso TCR (T Cell Receptor).

TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, con l'eccezione delle molecole CD4 e CD8 che sono assenti in cellule T che esprimono TCR $\gamma\delta$. I TCR e molti corecettori appartengono alla superfamiglia delle Ig, mentre altri (*integrine*) appartengono alla superfamiglia delle molecole di adesione. Le molecole di ciascuna superfamiglia hanno strutture omologhe e suggeriscono che i loro geni sono derivati da un gene ancestrale comune. L'evoluzione e la conservazione della grande varietà di geni delle due superfamiglie hanno consentito lo sviluppo e il mantenimento della capacità di riconoscimento specifico tra cellule e tra cellule e la matrice extracellulare, una proprietà biologica di grande importanza in numerosi processi di migrazione, maturazione ed attivazione cellulare.

La stimolazione antigenica del TCR induce la cellula T a proliferare e a manifestare funzioni effettrici. La proliferazione è mediata dalla produzione di citochine autocrine, IL-2 o IL-4, e dall'espressione dei recettori specifici per queste citochine. Effetto della proliferazione è l'espansione clonale delle cellule T antigene-specifiche, alcune delle quali diventano cellule della memoria immunologica. La funzione effettrice prevalente delle cellule T CD4⁺ è la secrezione di citochine che agiscono sulle stesse e altre cellule T, cellule B, macrofagi, leucociti e cellule endoteliali, promuovendo e regolando le risposte immunitarie, anticorpo- e cellulo-mediate, e infiammatorie. La funzione effettrice prevalente delle cellule T CD8⁺ è la lisi antigene-specifica di cellule bersaglio e la secrezione di alcune citochine.

La stimolazione antigenica del TCR genera una cascata di eventi che conducono all'attivazione e trascrizione di numerosi geni della cellula T. Questi processi sono meglio compresi nelle cellule T CD4⁺ che nelle CD8⁺, ma sono probabilmente comuni ai due tipi cellulari. La cascata di eventi è caratterizzata dalla fosforilazione della tirosina, treonina e serina di alcune proteine, catalizzata da protein-chinasi e seguita dalla rimozione dei gruppi fosfato mediata da proteotirosinasi.

Entro un minuto dalla stimolazione del TCR si può os-

servare la comparsa di proteine di membrana e citoplasmatiche con tirosine fosforilate per intervento delle fosfo-tirosin-chinasi (PTK). La fosforilazione delle tirosine di una proteina può aggregare altre proteine provviste di siti che legano le tirosine fosforilate e, quindi, ancora ed attiva enzimi che esprimono questi siti. Come illustrato in fig. 2, le code citoplasmatiche delle proteine associate al TCR sono costituite da una sequenza di 17 aminoacidi, denominata ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), in γ , δ , ϵ e, in triplicato, in ζ e η . Dopo la stimolazione del TCR le tirosine di ITAM vengono fosforilate e quindi ancorano l'enzima fosfatidil-inositolo-fosfolipasi C- γ 1 (PI-PLC- γ 1) le cui tirosine sono rapidamente fosforilate con conseguente attivazione dell'enzima.

Le PTK che promuovono queste fosforilazioni iniziali sono *lck*, *fyn* e la ZAP-70 (ζ -associated phosphoprotein) chinasi. La PTK *lck* è associata alla coda citoplasmatica di CD4 e CD8, le PTK *fyn* e ZAP chinasi sono associate alla sequenza ITAM di ζ . La successione iniziale degli eventi che conducono all'attivazione della cellula T è la seguente. La stimolazione del TCR induce CD4 o CD8 ad associarsi alle proteine del complesso TCR avvicinando *lck* alle sequenze ITAM. La fosforilazione delle tirosine di queste sequenze determina l'attracco, la fosforilazione e l'attivazione della ZAP chinasi. Anche la PI-PLC- γ 1 viene ancorata alle proteine del complesso TCR e fosforilata dalla ZAP chinasi (fig. 3).

Dopo alcuni minuti dalla stimolazione del TCR la fosforilazione delle tirosine della PI-PLC- γ 1 attiva questo enzima a idrolizzare il fosfolipide di membrana fosfatidil-inositolo-bisfosfato (PIP₂) in due prodotti: inositolo-trisfosfato (IP₃) e di-acil-glicerolo (DAG). L'IP₃ induce un aumento della concentrazione cellulare di Ca²⁺ dovuto alla mobilitazione dai depositi intracellulari e all'ingresso extracellulare di questo ione e attraverso l'apertura dei canali della membrana. L'aumentata concentrazione di DAG e Ca²⁺ attiva le protein-chinasi C (PKC) che fosforilano serina e treo-

nina di altre proteine. L'elevata concentrazione di calcio favorisce il legame di Ca^{++} con la calmodulina e l'attivazione, mediata da questo complesso, di numerose chinasi (diverse da PKC) e protein-fosfatasi quale la calcineurina.

Nei primi 15-30 minuti dalla stimolazione del TCR, avviene la trascrizione di alcuni geni che non richiede sintesi proteica. In questa fase immediata della trascrizione vengono attivati dei fattori di trascrizione preformati (NF-kB) mentre nella fase precoce (prima della mitosi) o tardiva (dopo la mitosi) della trascrizione i fattori devono essere sintetizzati. I primi geni trascritti sono i protooncogeni *c-fos* e *c-myc* i cui prodotti agiscono come fattori di trascrizione che regolano l'espressione di altri geni. La proteina fos è una componente dei complessi AP-1 e NF AT che regolano la trascrizione del gene per IL-2, mentre la proteina myc è necessaria per l'inizio della sintesi del DNA. Altri protooncogeni, come *c-myb*, sono trascritti nella fase precoce dopo che IL-2 ha stimolato la cellula T.

Nella fase precoce dell'attivazione della cellula T vengono trascritti i geni per IFN- γ , IL-2 e altre citochine. Esempio paradigmatico è la trascrizione del gene per IL-2 (fig. 3). L'attivazione di PKC conduce alla fosforilazione di alcune proteine. Per es. I κ B fosforilato si dissocia da NF-kB

permettendo a questo fattore citoplasmatico di entrare nel nucleo, legarsi al promotore del gene per IL-2 e aumentare la trascrizione. Le proteine fosforilate da PKC attivano anche la trascrizione dei geni *fos* e *jun* i cui prodotti costituiscono AP-1, un complesso necessario per indurre la trascrizione del gene per IL-2. L'attivazione della calcineurina defosforila il fattore citoplasmatico NF ATc, che quindi può entrare nel nucleo come NF ATn e combinarsi con AP-1 formando un complesso che si lega alle sequenze del promotore. Altri fattori che si legano al promotore sono NF IL-2A, composto da Oct-1 e OAP, e CD28RE che regolano la trascrizione del gene per IL-2.

La stimolazione del TCR induce precocemente un aumento della trascrizione del gene della catena α dell'IL-2R. L'associazione della catena α con le preesistenti catene β e γ conduce alla formazione dell'IL-2R di alta affinità. Questo recettore stimolato da IL-2 induce la proliferazione della cellula T che passa da G_0 o G_1 alla fase S del ciclo cellulare.

La sola stimolazione del TCR genera segnali insufficienti per l'attivazione della cellula T. Sono necessari altri segnali derivati dall'interazione di molecole costimolatorie espresse dalla APC e i recettori della cellula T (tab. II). La stimo-

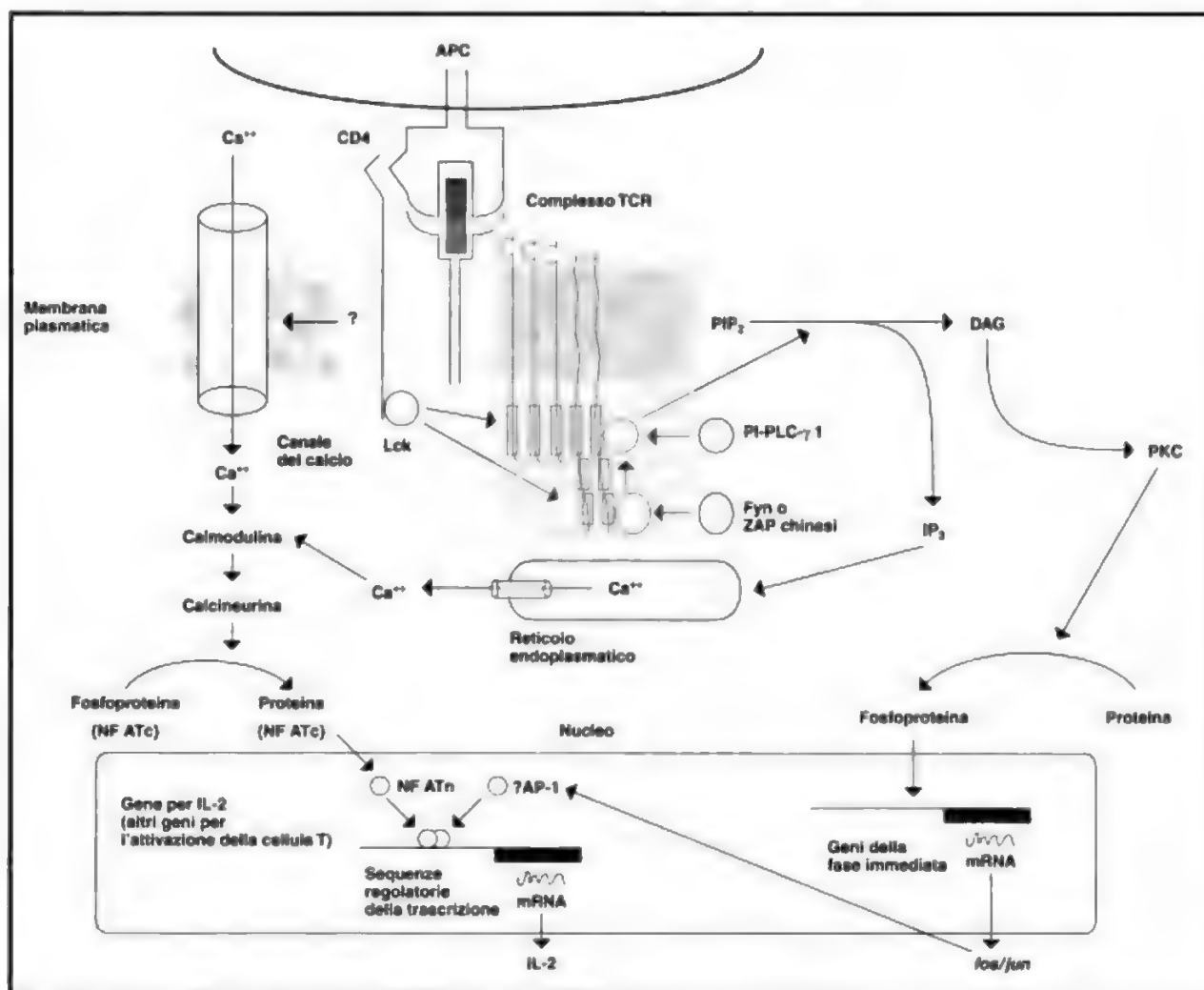


Fig. 3. Segnali intracellulari nell'attivazione antigenica della cellula T.

TAB. II. CORECETTORI DELLE CELLULE T E LORO LIGANTI

Corecettori	Superfamiglia	Liganti
CD4	Ig	MHC di classe II
CD8	Ig	MHC di classe I
CD2 (LFA-2)	Ig	CD58 (LFA-3)
CD28	Ig	CD80/CD86 (B7.1/B7.2)
CTLA-4	Ig	CD80/CD86 (B7.1/B7.2)
CD45	Ig	CD22
CD5	—	CD72
CD49/CD29 (VLA-4,5,6)	Integrine	VCAM-1, molecole della matrice
CD11a/CD18 (LFA-1)	Integrine	CD54 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3

LFA (Lymphocyte Function Associated Antigen), ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), VLA (Very Late Activation).

lazione del TCR in assenza di segnali costimolatori spesso conduce alla tolleranza anziché all'attivazione della cellula T. Molto efficace per l'attivazione è il legame tra B7 espresso su l'APC e il recettore CD28 della cellula T. I segnali originati da questa interazione inducono un fattore CD28RE che, legandosi al promotore, aumenta la trascrizione del gene per IL-2. Altre molecole accessorie che possono agire come costimolatori sono VCAM-1, ICAM-1 e LFA-3 delle APC che legano rispettivamente VLA-4, LFA-1 e CD2 delle cellule T. Anche alcune citochine (IL-1, IL-6) possono avere effetti costimolatori.

Attivazione dei linfociti B

La risposta anticorpale è indotta dall'interazione dell'antigene con i recettori Ig sulla membrana dei linfociti B. Questa interazione provoca aggregazione (*cross-linkage*) dei recettori che stimola la cellula B a entrare nel ciclo cellulare mediante la produzione di messaggeri secondari. Gli antigeni T-dipendenti convenzionali, come la maggior parte delle proteine, sono interiorizzati e degradati nella cellula B (oltre che in altre APC) e i loro peptidi presentati in associazione con molecole MHC di classe II al TCR di cellule T CD4⁺. La cellula T attivata esprime molecole CD40L (gp 39) che si legano a CD40 sulla cellula B inducendo segnali di attivazione. Inoltre le cellule T attivate secernono citochine che stimolano la proliferazione delle cellule B, la secrezione di anticorpi e il cambio (*switch*) di isotipo. Le cellule B attivate producono anticorpi o diventano cellule della memoria immunologica. Gli antigeni T-indipendenti, come i polisaccaridi e glicolipidi, si legano ai recettori Ig e ne inducono l'aggregazione che attiva la cellula B anche in assenza di cellule T.

Il recettore delle cellule B (*B Cell Receptor*, BCR) è un complesso di proteine costituito da una molecola di mIg e due molecole di un eterodimero Igα/Igβ. I recettori Ig della cellula B matura sono di diverso isotipo (mIgM e mIgD), ma identici di tipo perché sono specifici per lo stesso antigene. I recettori mIgM e mIgD hanno code citoplasmatiche di soli 3 amminoacidi e quindi insufficienti a trasdurre il segnale. Il recettore Igα/Igβ, invece, ha una code citoplasmatica di Igα di 61 amminoacidi, quella di Igβ di 48 amminoacidi, e quindi sufficientemente lunghe da potere interagire con i trasduttori intracellulari del segnale (fig. 4).

L'aggregazione delle proteine del BCR causata dall'antigene multivalente induce l'attivazione di PTK e la fosforilazione delle code citoplasmatiche del BCR analogamente a quanto avviene per il complesso TCR. Entro pochi minuti dalla stimolazione antigenica del BCR, l'attivazione della PI-PLC-γ1 induce idrolisi del fosfolipide di membrana PIP₂ in IP₃ e DAG. L'IP₃ mobilizza il Ca⁺⁺ dai depositi intracellulari e ne aumenta la concentrazione citoplasmatica. Il DAG e Ca⁺⁺ attivano le PKC che fosforilano treonina e serina di altre proteine.

Nella prima ora dalla stimolazione del BCR le proteine fosforilate agiscono come fattori di trascrizione di alcuni geni, come *c-fos* e *c-myc*, i cui prodotti regolano l'espressione di altri geni. Dopo circa 12 ore la cellula B passa dalla fase G₀ a G₁ del ciclo cellulare, esprime B7 e i recettori per le citochine prodotte dalle cellule T.

L'insieme dei fenomeni molecolari iniziati dalla stimolazione del BCR rendono la cellula B più adatta a proliferare e a esprimere le funzioni effettrici, come la presentazione dell'antigene alle cellule T e la produzione di anticorpi, ma non sono noti i meccanismi di attivazione della crescita e delle funzioni cellulari e neppure è noto se la trasduzione dei segnali iniziali è necessaria per l'attivazione delle cellule B. Per es. molti antigeni proteici hanno pochi epitopi e, quindi, non sono capaci di aggregare le proteine del BCR. Tuttavia, le cellule T e le loro citochine possono attivare le cellule B anche in assenza di segnali originati dall'interazione dell'antigene con il BCR. In queste condizioni, la principale funzione del BCR è l'internalizzazione dell'antigene per la successiva presentazione dei peptidi antigenici alle cellule T piuttosto che l'induzione di messaggeri secondari. D'altra parte, gli antigeni T-indipendenti che contengono molti epitopi identici e non possono stimolare cellule T con TCR specifico, inducono l'aggregazione del BCR dalla quale originano i segnali biochimici necessari e sufficienti per attivare la crescita e differenziazione delle cellule B. Pertanto, il ruolo dei messaggeri secondari nell'attivazione delle cellule B dipende dall'antigene e dalla partecipazione delle cellule T.

Oltre ai messaggeri secondari originati dall'aggregazione delle proteine del BCR, altri segnali per l'attivazione dei linfociti B derivano dal contatto con cellule T attivate e dalle loro citochine (v.**). La proliferazione delle cellule B che presentano peptidi antigenici alle cellule T CD4⁺ è indotta dal contatto tra molecole di membrana, CD40 sulle cellule B e CD40L sulle cellule T attivate, mentre le citochine prodotte dalle cellule T amplificano la proliferazione e la differenziazione delle cellule B, e determinano l'isotipo degli anticorpi nel corso della risposta immune. La proliferazione delle cellule B attivate è stimolata da IL-2, IL-4 e IL-5. Cellule B già differenziate nella produzione di anticorpi sono stimulate da IL-6 a proliferare. Anche IL-1, IL-10 e TNF hanno azione mitogenica. La secrezione di anticorpi è amplificata da IL-4 e IL-5 nel topo, da IL-2 e IL-6 nell'uomo. Nel topo e nell'uomo IL-4 induce nella cellula B secernente IgM la trascrizione dei geni per IgE. Esperimenti nel topo hanno dimostrato che cellule B stimulate *in vitro* con LPS producono IgM (85%), IgG1 (2%) e tracce di altre Ig (< 1%). L'aggiunta di IL-4 induce un aumento della produzione di IgG1 (20%) e IgE (5%) mentre l'aggiunta di IFN-γ induce un aumento selettivo di IgG2a (10%). L'aggiunta di TGF β e IL-5 favorisce la produzione di IgA (15%). Questi effetti antagonisti e sinergici delle citochine sulla produzione di anticorpi di isotipo diverso sono di notevole interesse per le prospettive cliniche nelle infestazioni parassitarie e nell'ipersensibilità di tipo ritardato, nell'immunità mediata da fagociti opsonizzati e nelle difese umorali delle mucose.

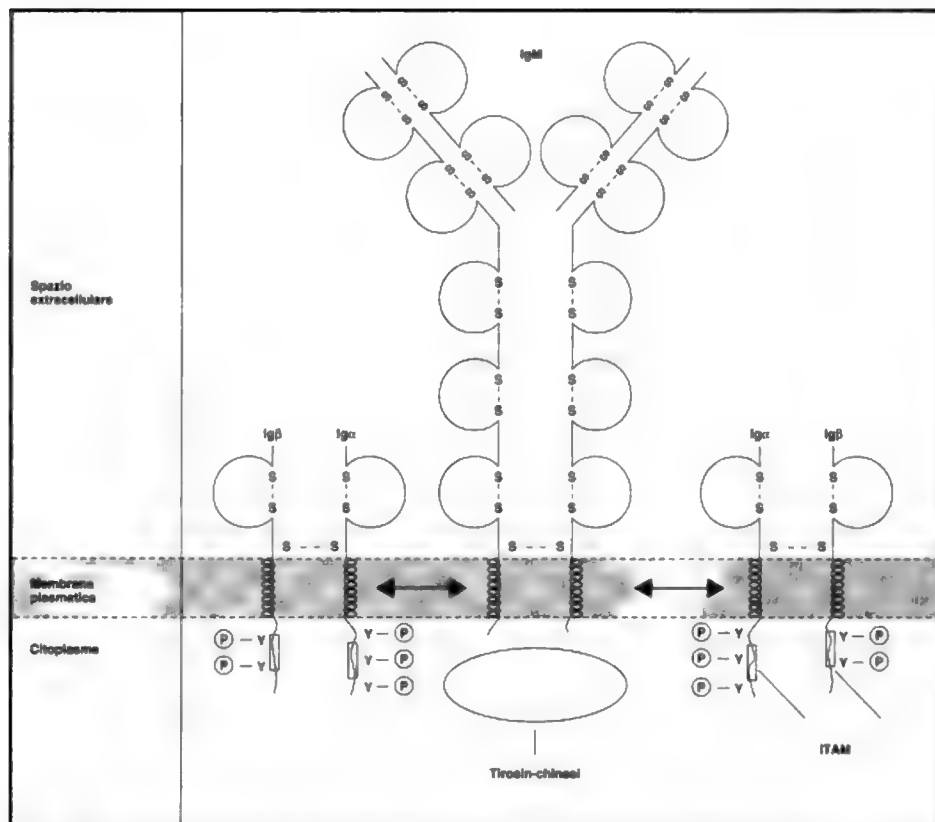


Fig. 4. Componenti del BCR (B Cell Receptor). Y-⊙ indica la posizione delle tirosine che sono fosforilate dopo stimolazione antigenica della cellula B.

Durante la proliferazione e differenziazione delle cellule B attivate, la diminuzione della concentrazione di antigene nel corso della risposta anticorpale favorisce la stimolazione di cellule con BCR di maggiore affinità. L'eterogeneità iniziale delle popolazioni di cellule B di diversa affinità aumenta durante la risposta anticorpale per l'insorgenza di mutazioni somatiche nei geni riarrangiati della variabilità anticorpale. Ne consegue una produzione di anticorpi e di cellule B della memoria con sempre maggiore affinità finché le cellule B mutate possono riconoscere l'antigene di selezione. Questa maturazione dell'affinità del BCR e degli anticorpi è indotta prevalentemente da antigeni T-dipendenti, ma non è noto il ruolo delle citochine nella regolazione di questo fenomeno di grande importanza nelle infezioni batteriche.

Bibliografia

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S., *Cellular and Molecular Immunology*, 1997, 3 ediz., Saunders, London.

Doria G., Adorini L., *Immunologia Generale*, 1998, 3 ediz., Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
 Herman A., Kappler J. W., Marrack P., Pullen A. M., Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune response, *Annual Review of Immunology*, 1991, 9, 745-772.
 Janeway Jr. C. A., Travers P., *Immunobiology*, 1997, 3 ediz., Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., London.
 Klein J., *Immunology*, 1990, 2 ediz., Blackwell Scientific Publications, London.
 Kubly J., *Immunology*, 1997, 2 ediz., Freeman and Co., New York.
 Paul W. E., *Fundamental Immunology*, 1993, 3 ediz., Raven Press, New York.

GINO DORIA

IMMUNOCOMPLESSI, MALATTIE DA [v. vol. VII, coll. 1455-1463; Agg. I, coll. *3619-3629]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2659). - **Interazioni fra immunocomplessi e complemento** (col. 2659). - **Fattori che condizionano la deposizione degli immunocomplessi nei tessuti** (col. 2660).

Introduzione

Piccole quantità di immunocomplessi [IC] sono normalmente rilevabili in circolo anche in assenza di una malattia specifica. Gli antigeni responsabili della formazione di questi IC possono essere di natura alimentare, ambientale, ma anche autoantigeni. Gli IC possono aumentare in maniera drammatica quando l'individuo sviluppa una vigorosa risposta anticorpale verso un antigene circolante presente in quantità elevate. In ogni caso essi vengono neutralizzati dal legame con le proteine complementari che li solubilizzano, ne limitano le dimensioni, e quindi ne facilitano l'eliminazione per fagocitosi.

Le malattie da IC si manifestano in presenza di diversi fattori condizionanti: caratteristiche proprie dell'ospite; caratteristiche dell'antigene, dell'anticorpo e quindi degli IC stessi; fattori anatomici (tipo di endotelio, caratteristiche della matrice interstiziale); fattori fisiologici (caratteristiche del flusso ematico); fattori fisici (pressione arteriosa, temperatura); funzionalità del sistema reticolo-endoteliale; integrità del sistema complementare.

Interazioni fra immunocomplessi e complemento

Una serie di meccanismi sono finalizzati alla effettiva eliminazione degli IC dal circolo e dai tessuti. Il sistema complementare ha un ruolo centrale in questo sistema di protezione.

L'interazione tra IC e complemento può produrre vari effetti quali: attivazione del complemento stesso, riduzione della formazione di IC, solubilizzazione degli IC, eliminazione degli IC da parte del sistema monocito-macrofagico.

La formazione di IC di grandi dimensioni, potenzialmente pericolosi, presuppone non solo il legame multivalente delle regioni Fab delle immunoglobuline (Ig) all'antigene, ma anche interazioni non covalenti delle regioni Fc di molecole di Ig in stretta vicinanza.

Tali interazioni possono essere inibite stericamente dal legame del complemento alle Ig; in tal modo viene quindi limitata la formazione di nuovi IC o viene disaggregata la struttura di quelli già formati. L'attivazione del complemento da parte degli IC, dunque, consente la trasformazione di complessi di grandi dimensioni e scarsamente solubili in complessi di dimensioni minori e più facilmente solubili.

Oltre ad interferire con la formazione dei complessi immuni, il sistema complementare può favorirne l'eliminazione da parte del sistema dei fagociti mononucleati. La reazione di immunoaderenza fu descritta nel 1953 da Nelson; 20 anni dopo, Hebert e coll. dimostrarono che una porzione significativa di IC formati *in vitro* e iniettati in primati si legava agli eritrociti. Questa funzione è in gran parte mediata dai recettori CR1 (Complement Receptor) presenti sulla membrana dei globuli rossi, che costituiscono, in virtù del numero elevato, la grande maggioranza del totale di recettori CR1 dell'organismo. I complessi antigene-anticorpo circolanti attivano il complemento, ed il C3b generato forma legami covalenti con le molecole di anticorpo; i complessi possono essere quindi adsorbiti dai globuli rossi, data l'alta affinità del CR1 per il C3b. Studi condotti *in vivo* nei primati hanno dimostrato che le cellule fagocitarie presenti nel fegato e nella milza sono responsabili della rimozione degli IC, assieme al recettore CR1, dalla membrana degli eritrociti, durante il transito di questi ultimi attraverso i sinusoidi di tali organi.

Il meccanismo dell'aderenza immune, comunque, è ancora controverso. Un ruolo potenziale sarebbe quello che vede il sistema reticolo-endoteliale come sistema «tampone» che può legare IC opsonizzati dal complemento e ridurre la probabilità che si depositino; tale ruolo sarebbe probabilmente molto importante nelle malattie da IC croniche. Un altro ruolo potenziale sarebbe quello che vede gli eritrociti come

«vettori» degli IC che ne facilitano la presentazione alle cellule fagocitarie.

D'altro canto la reazione di immunoaderenza può accelerare la processazione degli anticorpi. Il fattore CR1 sugli eritrociti, infatti, serve come cofattore per il fattore I che facilita la degradazione del C3b legato agli IC in C3b e C3d,g; tale degradazione riduce l'affinità di legame tra gli IC ed il CR1 con liberazione degli IC stessi. Tali prodotti di degradazione vengono riconosciuti da recettori macrofagici ed in tal modo gli IC vengono riconosciuti in modo efficace dalle cellule del sistema fagocitario e quindi eliminati.

Sulla base di tali azioni risulta chiaro come se da un lato deficit complementari con ridotta produzione di fattori proinfiammatori possono avere un effetto benefico, sia però vero anche il contrario. Molti deficit di componenti della cascata complementare, infatti, sono associati a malattie autoimmuni come per esempio il Lupus Eritematoso Sistemico (LES). In pazienti affetti da LES, infatti, è possibile osservare un deficit del fattore C4; pazienti con deficit del C2 hanno una malattia simil-lupica con preminenti manifestazioni cutanee; il deficit omozigote del C3 si associa alla presenza di infezioni ricorrenti, e in alcuni casi a ematuria e proteinuria. Inoltre, anomalie *in vivo* ed *in vitro* della clearance degli IC mediata dal complemento è stata descritta nel LES: in pazienti con LES infatti si può osservare un ritardo nella clearance di eritrociti rivestiti di IgG. Tale alterazione può contribuire alla deposizione degli IC e quindi correlarsi alla attività della malattia.

Nel complesso tali dati sosterrrebbero l'ipotesi che un deficit nelle componenti precoci della via classica della cascata complementare possa portare ad una ridotta capacità di opsonizzare e/o solubilizzare gli IC predisponendo allo sviluppo di una malattia autoimmune.

Fattori che condizionano la deposizione degli immunocomplessi nei tessuti

L'esistenza di malattie dovute ad IC fu sospettata per la prima volta nel 1911 da Clemens Von Pirquet.

La formazione ed il destino degli IC dipende dalle proprietà biosiftiche ed immunologiche dell'antigene e dell'anticorpo. Tali caratteristiche comprendono: le dimensioni, la carica, la valenza dell'antigene; la classe e sottoclasse, l'affinità dell'interazione tra antigene ed anticorpo, la carica netta e la concentrazione di anticorpo; il rapporto molare tra antigene disponibile ed anticorpo; la capacità dell'IC di interagire con le proteine del sistema complementare.

Numerosi fattori condizionano la deposizione degli IC a livello tissutale; tra questi ricordiamo i seguenti.

1. *Le dimensioni dei complessi immuni circolanti:* appaiono il fattore predominante nella localizzazione nei tessuti. Complessi molto piccoli, infatti, non hanno tendenza a depositarsi, mentre quelli di dimensioni molto grandi sono eliminati dai fagociti mononucleati. Di solito sono i complessi di dimensioni piccole e medie quelli che più facilmente si depositano, anche se questa regola può variare in funzione della natura e della diversa combinazione di antigeni e anticorpi.

2. *La capacità dell'ospite di eliminare gli IC dal circolo:* la rimozione degli IC è condizionata dall'integrità funzionale del sistema monocito-macrofagico e dal legame delle proteine complementari ai complessi stessi. Un difetto della fagocitosi può favorire la persistenza e la successiva deposizione tissutale degli IC. Infatti nei pazienti con deficit congeniti di alcune componenti della via classica del complemento, si osservano spesso malattie da IC; la deficitaria produzione di C3b a seguito della reazione antigene-anticorpo e, di conseguenza, il mancato legame dei complessi ai recettori per C3b (un evento essenziale per la fagocitosi

in condizioni normali) porta alla persistenza degli IC in circolo. In queste condizioni, è verosimile che i complessi immuni depositati a livello tissutale reclutino cellule infiammatorie tramite meccanismi indipendenti dal complemento o attivando la via alternativa.

3. *Le caratteristiche fisico-chimiche degli antigeni e degli anticorpi:* carica elettrica, valenza, avidità dell'interazione e isotipo delle Ig, possono influenzare la formazione e la deposizione degli IC. Ad esempio complessi che contengono proteine cationiche si legano avidamente a costituenti caricati negativamente della membrana basale dei glomeruli renali; questi complessi provocano tipicamente gravi e durature lesioni tessutali.

4. *Fattori anatomici ed emodinamici:* sono molto importanti nel condizionare il sito di deposizione degli immunocomplessi.

5. *Legame degli IC alle cellule infiammatorie:* tale legame stimola la secrezione locale di citochine e di mediatori vasoattivi, capaci di provocare un aumento della permeabilità vasale e, tramite l'allargamento degli spazi inter-endoteliali, un incremento della disposizione degli IC a livello della parete: questo fenomeno può costituire un circuito di amplificazione del danno tessutale e della malattia.

6. *Caratteristiche dell'antigene:* gli antigeni sono costituenti critici degli IC, influenzando la natura della risposta umorale e la natura degli IC stessi. Oltre alle dimensioni ed alla valenza, l'antigene può avere caratteristiche uniche che ne condizionano il destino. Per esempio i complessi che contengono un antigene asialo-orosomucoide con un galattoso libero possono legarsi ai recettori per il galattoso presenti sugli epatociti, e complessi contenenti nucleosomi possono legarsi ai fagociti e alla membrana basale glomerulare carica negativamente.

Bibliografia

- Abbas S., Lichtman A., *Immunologia cellulare e molecolare*, 1993, Piccin, Padova.
Edberg J. C., Salmon J. E., in Klippel, Dieppe, *Rheumatology*, 1994, 6(3), 4-11.
Stites D. P., Terr A. I., Parslow T. G., *Basic and Clinical Immunology*, 1994, Lange.
Walport M. J., Lachman P. J., *Arthritis Rheum.*, 1988, 31, 153.

STEFANO BOMBARDIERI E MARTA MOSCA

IMMUNODEFICIENZE [v. vol. VII, coll. 1463-1498; Agg. I, coll. *3630-3639]

SOMMARIO

SINDROMI DA IMMUNODEFICIENZA PRIMITIVA col. 2661
Introduzione (col. 2661). - **Immunodeficienze primitive combinate** (col. 2663): *Immunodeficienza grave combinata (Severe Combined Immunodeficiency; SCID)*. - *Difetto del sistema maggiore di istocompatibilità (classe II)*. - *Difetti delle catene γ ed ϵ del CD3 e difetto di ZAP-70*. - **Immunodeficienze primitive con prevalente difetto anticorpale** (col. 2664): *Agammaglobulinemia legata al sesso*. - *Immunodeficienza con iper-IgM (o sindrome da iper-IgM)*. - *Immunodeficienza comune variabile (ICV)*. - **Altre sindromi da immunodeficienza ben caratterizzate** (col. 2667): *Sindrome di Wiskott-Aldrich (WA)*. - *Anomalia di DiGeorge*. - **Altre immunodeficienze primitive** (col. 2668): *Difetto primitivo dei linfociti CD4 o linfocitopenia CD4 idiopatica*.

ATASSIA-TELEANGIECTASIA col. 2669
Etiologia e patogenesi (col. 2669). - **Anatomia patologica** (col. 2670). - **Sintomatologia** (col. 2670). - **Diagnosi differenziale** (col. 2671). - **Trattamento** (col. 2671). - **Epidemiologia e profilassi** (col. 2672).

SINDROMI DA IMMUNODEFICIENZA PRIMITIVA

Introduzione

Le sindromi da immunodeficienza [ID] rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie in cui la compromissione del

TAB. I. CLASSIFICAZIONE OMS DELLE IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE (1997)

Immunodeficienze combinate

- Immunodeficienza combinata grave (SCID)
 - con cellule B
 - legata al cromosoma X (difetto della catena gamma comune) (XSCID)
 - autosomica recessiva (difetto della proteina Jak3)
 - senza cellule B
 - difetto di RAG 1/2
 - difetto di adenosin-deaminasi (ADA; malattia autosomica) disgenesia reticolare
- Sindrome con iper-IgM legata al cromosoma X
- Difetto di purinucleoside fosforilasi
- Difetto del sistema maggiore di compatibilità (Classe II)
- Difetto delle catene CD3 γ e CD3 ϵ
- Difetto di ZAP-70
- Difetto di TAP-2

Immunodeficienze con prevalente difetto anticorpale

- Agammaglobulinemia legata al sesso di Bruton
- Immunodeficienza con iper-IgM non legata al cromosoma X
- Delezioni dei geni delle catene pesanti delle Ig
- Deficit delle catene α
- Difetto selettivo delle sottoclassi delle IgG con o senza difetto di IgA
- Difetto della produzione di anticorpi con Ig normali
- Immunodeficienza comune variabile
- Difetto selettivo di IgA
- Ipgammaglobulinemia transitoria dell'infanzia
- Agammaglobulinemia autosomica recessiva

Altre sindromi da immunodeficienza ben caratterizzate

- Sindrome di Wiskott-Aldrich
- Atassia-teleangiectasia
- Anomalia di DiGeorge

Difetti del complemento

- Difetti delle frazioni C1q, C1r, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 α , C8 β , C9
- Difetti del C1 inibitore, del Fattore I, Fattore H, Fattore D, della properdina

Difetti della funzione fagocitaria

- Neutropenia grave congenita
- Neutropenia ciclica
- Difetto di adesione dei leucociti di tipo 1
- Difetto di adesione dei leucociti di tipo 2
- Sindrome di Chediak-Higashi
- Difetto dei granuli secondari dei neutrofili
- Sindrome di Schwachman
- Malattia granulomatosa cronica
 - legata al cromosoma X
 - autosomica recessiva
- Difetto della G6PD dei neutrofili
- Difetto della mieloperossidasi
- Difetto del recettore dell'interferone gamma con estrema suscettibilità al micobatterio

Altre immunodeficienze primitive

- Difetto primitivo dei linfociti CD4
- Difetto primitivo dei linfociti CD7
- Difetto di IL-2
- Deficit multiplo di citochine

Difetto della trasduzione del segnale con o senza miopatia

Difetto del flusso di calcio con miopatia

sistema immunitario può essere primitiva o secondaria ad altre condizioni morbose (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.; v.*; v.**]). Negli ultimi anni, soprattutto gli studi di immunogenetica (v.***) hanno portato a considerevoli progressi nella comprensione della patogenesi di alcune sindromi da ID primitiva.

La classificazione delle ID è oggetto dell'attività di uno speciale comitato dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che si riunisce periodicamente. Durante l'ultima riunione (1997) è stata proposta una nuova versione aggiornata della classificazione delle ID primitive, che viene riportata nella tab. I.

Numerose scoperte effettuate negli ultimi anni hanno permesso di definire a livello molecolare il meccanismo patogenetico responsabile per l'insorgenza di alcune malattie da ID primitiva. Inoltre sono state descritte alcune rare nuove sindromi. Tra queste, la linfocitopenia CD4 idiopatica il cui riconoscimento può avere importanza nella diagnosi differenziale con la malattia da HIV.

Molte delle ID primitive sono legate al cromosoma X e precisamente l'agammaglobulinemia tipo Bruton, l'immunodeficienza grave combinata (SCID), la sindrome da iper-IgM e la sindrome di Wiskott-Aldrich (WA).

Immunodeficienze primitive combinate

Immunodeficienza grave combinata (Severe Combined Immunodeficiency; SCID)

In questa grave forma di ID i pazienti vanno incontro, nei primi mesi di vita, a devastanti infezioni fungine e virali, polmonite da *P. carinii* (v. PNEUMOCYSTIS CARINII, INFEZIONI DA*), diarrea intrattabile e difetto di accrescimento. A livello immunologico, la sindrome è caratterizzata da un grave difetto numerico e funzionale dei linfociti T, assenza dell'ombra timica e difetto della produzione di immunoglobuline (Ig). La prognosi è infausta a meno di un pronto intervento di trapianto di midollo, che può avere successo in alcuni casi, o di terapia genica.

La patogenesi della SCID è varia e vanno distinti casi in cui sono presenti i linfociti B e casi con assenza di queste cellule. Nelle forme con linfociti B la SCID è in genere associata al sesso. Il gene responsabile è stato mappato sul braccio lungo del cromosoma X, nella posizione Xq13. È stato dimostrato che la mutazione colpisce il gene che codifica per la catena gamma del recettore dell'interleuchina-2 (IL-2). Il recettore per l'IL-2 era stato studiato in precedenza, dimostrando che è costituito da diverse combinazioni di tre catene: alfa, beta e gamma, e che, tra queste, la catena gamma è la più importante nella trasduzione del segnale.

Sebbene l'IL-2 rappresenti una citochina di fondamentale importanza nell'attivazione delle cellule T (v. INTERLEUCHINE [v.*; v.**]; CITOCINE**), gli studiosi sono rimasti inizialmente sorpresi dal fatto che il difetto di una sola catena del recettore per l'IL-2 portasse a così gravi conseguenze cliniche nei pazienti con SCID. Più recentemente, tuttavia, studi ulteriori hanno dimostrato che la catena gamma è una componente del recettore anche di altre interleuchine ed in particolare dell'IL-4, IL-7, IL-11 e IL-15 (catena gamma comune). Questi dati hanno permesso di comprendere meglio il grave difetto riscontrabile nei soggetti con SCID dal momento che queste citochine sono essenziali nello sviluppo dei linfociti T.

Nella forma autosomica recessiva è stata invece dimostrata l'esistenza di una chinasi intracellulare, denominata Jak3, che si lega alla catena gamma comune (Macchi *et al.*, 1995). In altri casi di SCID sono invece assenti anche i linfociti B. Questa forma può essere dovuta ad un difetto del gene *RAG1/2* del gene dell'adeguato sistema di

alla disgenesia reticolare (in questo caso è presente anche granulocitopenia e trombocitopenia).

Mentre al momento il trapianto di midollo rimane l'unica alternativa per i pazienti con SCID legata al sesso, va segnalato che la somministrazione regolare di ADA coniugata con polietilen-glicol ha dimostrato di essere efficace nel trattamento dei pazienti con SCID autosomica associata a difetto dell'ADA. Tuttavia i costi di questa terapia ne rendono problematica l'attuazione pratica. Inoltre va ricordato che il primo tentativo coronato da successo di terapia genica è stato effettuato in un paziente con difetto dall'ADA (v. TERAPIA GENICA*).

Difetto del sistema maggiore di istocompatibilità (classe II)

Questa malattia (che veniva prima definita sindrome del linfocita nudo o *bare lymphocyte syndrome*) è dovuta ad un difetto delle proteine che promuovono la trascrizione delle molecole del sistema maggiore di istocompatibilità di classe II (v. ISTOCOMPATIBILITÀ*; v. anche HLA [v.; v.*; v.**]). Le molecole di classe II sono espresse costitutivamente sulle cellule che presentano l'antigene, inclusi i linfociti B, sui linfociti T attivati e sulle cellule dell'epitelio timico dove sono importanti per la maturazione dei linfociti CD4. L'incapacità ad esprimere molecole di classe II è stata dimostrata in bambini, specie di origine Nord Africana, che avevano un difetto della crescita, diarrea protratta e infezioni (specie candidiasi e criptosporidiosi).

La malattia è autosomica recessiva e, da un punto di vista immunologico, i pazienti hanno un difetto delle cellule CD4, mentre le CD8 sono normali. I linfociti T non sono in grado di realizzare una risposta specifica agli antigeni. Vi è inoltre ipogammaglobulinemia anche se il numero dei linfociti B è normale. Si tratta di una malattia meno grave della SCID, ma è tuttavia fatale entro il primo o il secondo decennio di vita. Il trapianto di midollo osseo ha dato risultati incoraggianti in alcuni casi.

Il difetto è stato localizzato in mutazioni di geni che controllano la trascrizione dei geni di classe II. Tra i geni mutati, sono stati finora identificati i geni *C2TA*, *RFXAP* (Villard *et al.*, 1997) e *RFX5*.

Difetti delle catene γ ed ϵ del CD3 e difetto di ZAP-70

Sono stati recentemente descritti alcuni rari casi di difetto dell'espressione di alcune catene del complesso CD3, complesso associato al recettore per l'antigene espresso dalle cellule T (*T-Cell Receptor* o TCR). Il CD3 è costituito da diverse combinazioni di quattro catene denominate rispettivamente: γ , δ , ϵ , ζ .

La mutazione del gene di ZAP-70, una tirosina-chinasi associata alla trasduzione del segnale, si accompagna a diminuzione delle CD8. Le cellule CD4 sono presenti ma non funzionanti. Sia i difetti delle catene del CD3, che il difetto di ZAP-70 sono forme a trasmissione autosomica recessiva che si manifestano con un grave difetto dell'immunità cellulo mediata e che possono essere trattate con il trapianto di midollo (v. IMMUNOGENETICA**, tab. I).

Immunodeficienze primitive con prevalente difetto anticorpale

Agammaglobulinemia legata al sesso

L'agammaglobulinemia legata al sesso colpisce soggetti di sesso maschile ed è caratterizzata dall'assenza di linfociti B maturi nel sangue periferico e dall'incapacità conseguente di produrre anticorpi. Ciò espone questi pazienti ad una aumentata suscettibilità alle infezioni che si manifesta dopo pochi mesi dalla nascita quando comincia a declinare il titolo degli anticorpi materni trasmessi per via transplacen-

tale. I pazienti con agammaglobulinemia legata al sesso vengono oggi trattati con terapia profilattica sostitutiva periodica con Ig per e.v., oltre, naturalmente, al trattamento pronto ed energico delle infezioni che si manifestano spesso malgrado il trattamento sostitutivo con Ig.

Dopo anni di ricerche, la base genetica di questa malattia è stata finalmente determinata ed è stato possibile mappare il gene di questa malattia sul braccio lungo del cromosoma X, nella posizione Xq21.2-22. Il gene responsabile è stato clonato e si è visto trattarsi di una tirosina-chinasi che è stata denominata *btk* (*Bruton's tyrosin kinase*, dal nome di Bruton che descrisse per primo l'agammaglobulinemia legata al sesso nel 1952). Sono state descritte diverse mutazioni nel gene che portano alla sua inattivazione. Il gene *btk* è espresso precocemente nello sviluppo dei linfociti B, ma non nelle cellule T o nelle plasmacellule. Nel midollo dei pazienti sono presenti cellule pre-B, ma il tasso di maturazione di queste cellule in linfociti B maturi è estremamente ridotto. Il gene è anche espresso nei granulociti, ma ovviamente il suo ruolo è meno cruciale in queste cellule dato che i difetti dei granulociti si osservano raramente in pazienti con agammaglobulinemia legata al sesso.

Immunodeficienza con iper-IgM (o sindrome da iper-IgM)

La ID con iper-IgM è un rara malattia caratterizzata da un difetto della proprietà che hanno i linfociti B di produrre immunoglobuline di classe IgA ed IgG dopo aver prodotto IgM, mantenendo la stessa specificità. Questa proprietà di cambiare la parte costante delle Ig, mantenendo la stessa porzione variabile viene generalmente definita con l'espressione *switch delle immunoglobuline* (Geha e Rosen, 1994). Come conseguenza di questo difetto, i pazienti con ID con iper-IgM hanno in circolo livelli elevati di IgM con assenza delle altre classi di Ig e vanno incontro anch'essi a infezioni ricorrenti, specie di origine batterica, tra cui frequenti sono le otiti e le polmoniti. Inoltre, questi pazienti hanno un'elevata incidenza di malattie autoimmuni, neutropenia e linfomi. I pazienti vengono generalmente trattati con terapia sostitutiva con Ig per via endovenosa, dal momento che i preparati commerciali di Ig per uso endovenoso contengono quasi esclusivamente IgG.

La ID con iper-IgM, per quanto rara, è una malattia eterogenea e possono essere distinte almeno due forme principali. La forma più comune (che rappresenta circa il 70% dei casi) colpisce i maschi ed è nota da tempo che questa malattia ha una base genetica essendo trasmessa come carattere recessivo associato al cromosoma X. Sono stati descritti tuttavia anche casi nel sesso femminile che dimostrano che la malattia può anche insorgere con un diverso meccanismo patogenetico.

Recentemente è stato possibile dimostrare il difetto genetico associato alla ID con iper-IgM legata al cromosoma X. Il gene è stato localizzato nella regione Xp26. Studi preliminari, volti a dimostrare il meccanismo fisiologico di produzione delle Ig, hanno dimostrato che, una volta che il linfocita B ha prodotto IgM, per ottenere lo *switch* è necessario che sia stimolata la proteina di membrana CD40 presente sui linfociti B, e che questo stimolo sia accompagnato dalla presenza di appropriate citochine (tra cui IL-4 ed IL-10). Il CD40 sui linfociti B viene stimolato dall'interazione con il suo ligando (CD40-ligando o CD40L) che è espresso sui linfociti T attivati. Il gene che codifica per il CD40L si trova sul braccio lungo del cromosoma X (nella posizione Xq26). Nella ID con iper-IgM è stato dimostrato che il difetto è dovuto a mutazioni di questo gene con conseguente impossibilità dei linfociti T ad esprimere il CD40L, che, come abbiamo visto, conferisce, interagendo con il CD40, il segnale necessario a indurre la

produzione di Ig della classe IgA o IgG. Per il difetto presente nei linfociti T, questa forma è ora inquadrata dall'OMS tra i difetti combinati. Studi ulteriori sono tuttavia necessari per comprendere la patogenesi delle patologie associate (malattie autoimmuni, incidenza di linfomi) dal momento che il difetto genetico identificato non è di per sé sufficiente a fornire una spiegazione patogenetica di queste patologie associate. Inoltre, il meccanismo della ID con iper-IgM nei casi non associati al cromosoma X, ed in cui è stato dimostrato che il CD40L è espresso normalmente, deve ancora essere chiarito.

Immunodeficienza comune variabile (ICV)

Si tratta di un termine generico con il quale vengono raggruppati pazienti che hanno probabilmente sindromi distinte, ma non ancora ben caratterizzate, con il dato comune del difetto di produzione degli anticorpi. La diagnosi viene posta per esclusione, una volta escluse le sindromi meglio caratterizzate, come, ad esempio, la forma legata al sesso. La ICV colpisce maschi e femmine e può insorgere ad ogni età, con un picco nel secondo e nel terzo decennio di vita (Spickett *et al.*, 1997). È relativamente frequente, specie nella popolazione di origine europea, con un'incidenza stimata tra 1:50.000 ed 1:200.000 abitanti.

Il quadro clinico è caratterizzato da infezioni piogeniche ricorrenti, specie sino-polmonari. Una diagnosi precoce, prima dell'instaurarsi di irreversibili alterazioni anatomiche polmonari, come le bronchiectasie, è assai importante. Una minoranza dei pazienti ha infezioni con agenti non comuni come *P. carinii*, micobatteri o funghi. Sono frequenti le infezioni intestinali ed in particolare l'infezione cronica da *Giardia lamblia*. I pazienti presentano anche un'elevata incidenza di malattie neoplastiche (specie linfoma e carcinoma gastrico) ed autoimmuni.

Molti studi hanno cercato di identificare la causa della mancata produzione delle Ig nei pazienti con ICV, senza tuttavia arrivare, fino ad oggi, a risultati univoci. Alcuni dati sono a sostegno del fatto che, nella maggioranza dei pazienti, le cellule B sono presenti e capaci di produrre Ig quando un aiuto appropriato alla produzione degli anticorpi è fornito da cellule T normali. Tuttavia, i linfociti B appaiono immaturi in alcuni pazienti con ICV e sono stati anche descritti casi con un difetto primitivo dei linfociti B. Per quanto riguarda il difetto dei linfociti T, non è stato possibile identificare un meccanismo comune. Studi diversi hanno infatti descritto alterazioni dei linfociti T di pazienti con ICV sia per quanto riguarda la loro capacità di attivarsi in risposta ad uno stimolo, sia per quanto concerne la produzione di citochine. Alcuni pazienti presentano infatti un difetto di produzione di alcune citochine tra cui l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 o l'interferone-gamma (Newport *et al.*, 1996). Queste alterazioni non sono tuttavia riscontrabili in tutti i pazienti, ma solo in una minoranza di essi, e pertanto non è noto il ruolo che ricoprono questi difetti nella patogenesi delle ICV. Recentemente è stato anche descritto un difetto dell'espressione del CD40L sui linfociti CD4 di questi pazienti. Dato che i linfociti B richiedono un segnale attraverso il CD40L in presenza di IL-10 per produrre Ig di tipo IgG ed IgA, si è ipotizzato che questo meccanismo possa essere deficitario nei pazienti con ICV. L'IL-10 sembra in grado di indurre produzione di IgG *in vitro* solo in alcuni casi. Si tratta quindi per ora solo di dati preliminari, che comunque non sembrano in grado di spiegare la patogenesi della ICV nella maggioranza dei casi, anche in considerazione del fatto che i pazienti con ICV hanno anche un difetto di produzione delle IgM e non solo un difetto nello *switch* necessario a produrre IgA o IgM (vedi sopra al paragrafo sulla sindrome da iper-IgM, per una spiegazione dello

switch). Un deficit della sottopolazione CD4 è stato descritto da tempo in circa un terzo dei pazienti con ICV ed è possibile che il difetto di questa popolazione possa avere un ruolo nell'insorgenza della ICV, almeno in alcuni pazienti.

Da un punto di vista terapeutico, questi pazienti beneficiano del trattamento sostitutivo con Ig per uso endovenoso che viene effettuato in genere ogni 21 giorni, in ambiente ospedaliero per il possibile insorgere di reazioni allergiche anche gravi. Quando il trattamento viene iniziato prima di irreversibili danni anatomici (come le bronchiectasie), esso in genere consente a questi pazienti una discreta qualità di vita, con una significativa riduzione della frequenza di gravi infezioni, rispetto ai pazienti non trattati. Quando comunque dovessero insorgere le infezioni, queste vanno trattate prontamente con efficace terapia antibiotica. Un serio inconveniente della terapia sostitutiva con Ig è tuttavia rappresentato dalla possibile trasmissione, attraverso le preparazioni di Ig per uso endovenoso, di malattie virali. È stato dimostrato che in passato l'epatite da virus C poteva essere trasmessa per questa via. Si è visto che la frequenza di infezione con virus C dell'epatite è elevata in pazienti con ICV in trattamento sostitutivo con Ig per uso endovenoso. Tuttavia, le preparazioni in commercio sono oggi saggiate per la presenza di anticorpi anti-virus C ed i lotti eventualmente positivi scartati, rendendo così improbabile oggi la trasmissione dell'infezione. Va anche ricordato che il rapporto tra ICV e malattie virali non è del tutto chiarito ed alcuni sostengono che la ICV possa essere, almeno in alcuni casi, secondaria a infezioni virali. Questa ipotesi deve tuttavia essere confermata da evidenze sperimentali che al momento non sono convincenti. Non sono documentati casi di trasmissione dell'HIV.

Altre sindromi da immunodeficienza ben caratterizzate

Queste comprendono la sindrome di Wiskott-Aldrich, l'atassia-teleangiectasia (che viene trattata in un'altra sezione di questa voce di aggiornamento; v. sotto col. **2669-2673) e l'anomalia di DiGeorge.

Sindrome di Wiskott-Aldrich (WA)

Si tratta di una malattia che colpisce soggetti di sesso maschile e che si presenta con diarrea ematica e trombocitopenia. Una grave piastrinopenia caratterizzata da piastrine di volume ridotto e che insorge precocemente è fortemente suggestiva di WA. Inoltre i pazienti presentano eczema e suscettibilità ad infezioni piogeniche ed opportunistiche. I livelli sierici delle IgM sono diminuiti, ma le IgA sono in genere aumentate e le IgG normali. I pazienti non mostrano una adeguata risposta anticorpale contro gli antigeni polisaccaridici. Mentre i linfociti B sono normali o aumentati, i linfociti T diminuiscono progressivamente e mostrano un difetto della risposta mitogenica allo stimolo con anticorpi anti-CD3. I pazienti, in genere, non giungono alla pubertà anche se migliori risultati si hanno oggi con il trattamento sostitutivo con Ig per via endovenosa, la splenectomia o il trapianto di midollo osseo.

Le piastrine ed i linfociti T sono gli elementi del sangue più gravemente compromessi in questa malattia. Le cellule T presentano una disorganizzazione del citoscheletro e perdita dei microvilli. L'esame al microscopio elettronico con scansione dei linfociti fetali consente la diagnosi prenatale. Nei pazienti con WA è stato anche dimostrato un difetto di espressione ed una instabilità di alcune sialoproteine di membrana dei linfociti ed in particolare del CD43.

La sindrome di WA mappa sul braccio corto del cromosoma X in posizione Xp11.23. Questo gene è stato clonato e si è visto che codifica per una proteina di 501 aminoacidi (definita WASP, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) la cui

sequenza non ha relazione con alcuna proteina nota e la cui funzione è attualmente ignota. Sono state identificate diverse anomalie di questo gene, mutazioni, delezioni ed inserzioni. È stato ipotizzato che questa proteina si leghi al domain SH3 delle tirosina chinasi, ma la sua funzione rimane ancora da chiarire, così come il suo ruolo nella patogenesi della sindrome di WA. Mutazioni dello stesso gene sono state anche dimostrate nella trombocitopenia idiopatica legata al sesso, una rara malattia ereditaria caratterizzata da trombocitopenia ereditaria con presenza di piastrine di piccole dimensioni.

Anomalia di DiGeorge

La sindrome di DiGeorge è stata originalmente descritta come un difetto dei linfociti T conseguente ad un'insufficiente differenziazione della terza e quarta tasca faringea che forma il timo e le paratiroidi. È caratterizzata da ipoplasia timica, ipocalcemia, anomalie facciali ed anomalie dell'arco aortico. Da un punto di vista clinico, la presenza di tetania neonatale, di insufficienza cardiaca e di anomalie facciali indirizza la diagnosi. Le infezioni ricorrenti non sono un sintomo frequente alla diagnosi, ma insorgono solo in un secondo tempo. La causa di morte è da ricercare più frequentemente nelle anomalie cardiache. Oggi, con il migliorare delle tecniche di cardiocirurgia, spesso questi pazienti possono avere una migliore prognosi.

Il difetto dei linfociti T (con marcata linfopenia) è in relazione alla mancanza del timo con incapacità di formare linfociti T maturi e conseguente immunodeficienza, ma non è presente in tutti i casi e la sua gravità può variare. Può talvolta essere corretto dalla somministrazione di ormoni timici e, nei pazienti che sopravvivono alle altre malformazioni, spesso si osserva, con il passare del tempo, un miglioramento spontaneo dell'immunità, con acquisizione di cellule T funzionanti.

Negli ultimi anni si è potuto riconoscere che, accanto ai tipici casi di DiGeorge, si possono osservare alcuni pazienti che presentano una più sfumata sintomatologia dovuta a difetti dell'embriogenesi che colpiscono la stessa area. Questi pazienti hanno un più modesto deficit immunologico con presenza tuttavia delle anomalie facciali, cardiache e del palato (questa condizione è stata definita sindrome velocardio-faciale, VCF, o *sindrome di Shprintzen*). Altri pazienti presentano una sintomatologia caratterizzata unicamente da cardiopatie associate a minime anomalie facciali. Da un punto di vista genetico è stato dimostrato che almeno il 90% dei pazienti con DiGeorge e molti con sindrome VCF hanno delezioni (spesso microdelezioni) del cromosoma 22 (22q11). Per raggruppare unitariamente questo gruppo di pazienti con sindromi contigue che colpiscono organi diversi a comune embriogenesi, è stato creato l'acronimo CATCH 22 (dalle parole inglesi *Cardiac defects, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, and Hypocalcemia* che risultino da delezioni di 22q11). I pazienti con questa sindrome rappresentano quindi un gruppo eterogeneo che va dai tipici casi di DiGeorge ai casi che presentano solo anomalie cardiache associate ad altre minori alterazioni facciali (Budarf *et al.*, 1995). Sebbene il gene responsabile per questa sindrome sia stato localizzato sul cromosoma 22 (in posizione q11), non è stato tuttavia ancora clonato e non è noto quale sia il suo significato funzionale.

Altre immunodeficienze primitive

Difetto primitivo dei linfociti CD4 o linfocitopenia CD4 idiopatica

Nel 1992 sono stati descritti alcuni rari casi di pazienti che presentavano un quadro clinico caratterizzato da infezioni

opportunistiche simili a quelle che si osservano nella sindrome da immunodeficienza acquisita (v.*; v.**; AIDS), e con difetto grave del numero assoluto di linfociti CD4 nel sangue periferico (meno di 400 cellule CD4/mm³). Sebbene questo quadro clinico facesse ovviamente pensare alla malattia da HIV, tuttavia, in questi rari casi, il virus HIV non poteva essere dimostrato con nessuna tecnica (Elisa, Western Blot, PCR, etc.). Si arrivò quindi alla descrizione di una nuova sindrome denominata difetto primitivo dei linfociti CD4 o *linfocitopenia CD4 idiopatica*, sindrome caratterizzata dalla presenza di un grave difetto dei linfociti CD4 senza concomitante infezione da HIV. Si tratta di una malattia molto rara: solo due pazienti su oltre 230.000 casi presenti nei registri del Centro per il controllo delle malattie (CDC) di Atlanta, rientravano in questa diagnosi. Non si tratta verosimilmente di una sindrome apparsa solo nel 1992, in quanto casi simili possono essere rintracciati retrospettivamente, ma probabilmente è stata definita solo al momento in cui si è cominciato a prestare maggiore attenzione al numero assoluto delle cellule CD4 a causa della malattia da HIV.

Da un punto di vista clinico e di laboratorio, la linfopenia idiopatica dei CD4 si distingue dall'AIDS per il fatto che i livelli delle cellule CD4 in questi pazienti sono in genere stabili (anche se bassi) ed in alcuni casi si è osservato anche una spontanea remissione; si ha sovente un concomitante difetto dei linfociti CD8 ed i livelli delle Ig sieriche non sono aumentati (come nell'AIDS), ma normali o spesso diminuiti. Studi virologici ed epidemiologici suggeriscono che la causa di questa sindrome non sia da attribuirsi, almeno nella maggioranza dei casi, ad un agente trasmissibile noto o ignoto. La prognosi è grave nella maggioranza dei pazienti, ma in alcuni casi si assiste ad un recupero spontaneo.

Per ulteriori notizie sulle ID primitive, v. anche IMMUNOGENETICA** (coll. **2719-2722).

Bibliografia

- AA. VV., *Advances in primary Immunodeficiency*, Suppl. a *Clin Immunol. Immunopathol.*, 1995, **76**, S145.
 Budari M. L. et al., *Nature Genetics*, 1995, **10**, 269.
 Carbonara A., Brusco A., Carbonara C., *Ann. Ital. med. Int.*, 1996, **11**, 180-186.
 Conley M. F., *Immunol. Today*, 1995, **16**, 313.
 Gelfand R. S., Rosen F. S., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1008.
 Macchi P. et al., *Nature*, 1995, **337**, 65.
 Newport M. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**, 1941.
 Rosen F. S., Cooper M. D., Wedgwood J. P., *The primary immunodeficiencies*, in *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 431.
 Rosen F. S., Seligman M. eds., *Immunodeficiencies*, 1993, Chur, Switzerland, Harwood Academic Publishers, Philadelphia.
 Spickett G. P. et al., *Immunol. Today*, 1997, **18**, 325.
 Villard J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 748.
 WHO Scientific Group, *Primary immunodeficiency diseases*, in *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, **109** (Suppl. 1), 1-28.

FRANCO PANDOLFI

ATASSIA-TELEANGIECTASIA

Etiologia e patogenesi

L'ataxia-teleangiectasia [a.t.], o sindrome di Louis-Bar, è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva. I caratteri clinici fondamentali della malattia sono costituiti da atassia cerebellare, immunodeficienza, aumentata incidenza di neoplasie (soprattutto tumori linfoidi), ed ipersensibilità alle radiazioni ionizzanti. Il gene responsabile della a.t. (ATM), localizzato sul cromosoma 11 nella regione q22-23, è stato identificato e caratterizzato a livello molecolare nel Giugno 1995 (Savitsky et al., 1995). Esso codifica per una proteina simile a varie chinasi di lievito e di mammifero che regolano la ricombinazione meiotica ed il riparo del DNA e controllano il ciclo cellulare.

La mutazione a.t. determina, nelle cellule degli individui omozigoti, un difetto di riparazione del DNA che si traduce in una aumentata suscettibilità ai danni (alterazioni cromosomiche e morte cellulare) indotti dalle radiazioni ionizzanti e dagli agenti radiomimetici. Contrariamente a quanto osservato nello xeroderma pigmentoso (v.; v.**), le cellule di pazienti affetti da a.t. non sono ipersensibili alle radiazioni ultraviolette. Le cellule a.t. presentano il peculiare fenomeno della «sintesi radioresistente del DNA», che consiste nella mancanza della transitoria inibizione della sintesi di DNA che si verifica, in cellule normali, dopo esposizione a un danno genotossico (ad es. radiazioni ionizzanti). Sono state anche riscontrate anomalie della progressione del ciclo cellulare.

Scarse sono le informazioni sul rapporto patogenetico tra il deficit di riparo/ricombinazione del DNA e le manifestazioni fenotipiche principali della sindrome (ipoplasia cerebellare, immunodeficienza, teleangiectasia). Per quanto riguarda il deficit immunitario, un'ipotesi patogenetica è basata sull'osservazione che, mentre i danni cromosomici indotti *in vitro* nelle cellule a.t. dagli agenti radiomimetici sono distribuiti in maniera casuale, le alterazioni cromosomiche spontanee che si osservano nei linfociti dei pazienti coinvolgono selettivamente le regioni dei cromosomi 7 e 14 dove sono localizzati i loci che codificano per le catene dei recettori $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ dei linfociti T e per le catene pesanti delle immunoglobuline. Questo fa ritenere che l'immunodeficienza caratteristica della a.t. sia causata da un difetto nei meccanismi di ricombinazione del DNA che si verificano fisiologicamente in questi loci durante il differenziamento dei linfociti T e B. Il fatto che il difetto differenziale dei linfociti sia, secondo questa ipotesi patogenetica, intrinsecamente determinato spiegherebbe anche la mancata efficacia delle terapie immunostimolanti (ad es. con ormoni timici). Questo stesso difetto ricombinativo, facilitando le traslocazioni cromosomiche, determina probabilmente anche l'aumentata incidenza in questi pazienti di tumori linfoidi. Non vi sono invece attualmente ipotesi patogenetiche sui rapporti tra deficit di riparo/ricombinazione del DNA e la degenerazione dei neuroni cerebellari di Purkinje alla base della conseguente sindrome atassica, o con le altre manifestazioni fenotipiche della malattia.

Anatomia patologica

L'alterazione anatomopatologica più caratteristica della a.t. consiste in una degenerazione corticale cerebellare, che coinvolge prevalentemente le cellule di Purkinje ed i neuroni granulari ed è più evidente a livello del verme cerebellare. Altri tipici riscontri sono l'aplasia del timo e delle ovaie e le alterazioni progredite della cute e degli annessi cutanei (canzere precoce).

Il difetto immunitario, caratteristico della malattia, si manifesta comunemente con una riduzione di alcune classi di immunoglobuline (IgA, IgE, e IgG₂) e con un aumento delle IgM nel siero. I linfociti T sono spesso ridotti di numero e presentano talora importanti difetti funzionali (ad es. scarsa risposta *in vitro* ai mitogeni ed agli antigeni). Un caratteristico reperto è l'aumento dei livelli di alfa-1 fetoproteina nel plasma, che si osserva quasi in tutti i pazienti.

Sintomatologia

Il quadro sintomatologico della a.t. è dominato dalla atassia cerebellare, che è in genere evidente al momento in cui il bambino inizia la deambulazione e presenta un andamento ingravescente. Spesso l'uso della sedia a rotelle diviene necessario intorno al decimo-dodicesimo anno di età. Altri tipici segni neurologici sono l'aprassia oculomotoria (praticamente patognomonica della a.t.) (fig. 1) e, più raramente, la coreoatetosi. Il deficit immunitario rende i pazienti su-



Fig. 1. Aspetto di un paziente con a.t., in cui sono evidenti il difetto posturale, l'aprassia oculare e le teleangiectasie oculari.

scettibili alle infezioni da parte di microrganismi opportunistici. Le infezioni prevalenti sono quelle caratteristiche dei pazienti con difetti della produzione di anticorpi, e cioè infezioni batteriche recidivanti delle mucose respiratorie (bronchiti e broncopneumoniti), otiti ed enteriti croniche. Più raramente i pazienti con a.t. sono suscettibili alle infezioni virali, fungine e protozoarie caratteristiche nei soggetti con deficit a carico dei linfociti T.

Le teleangiectasie sono tipicamente evidenti a livello delle congiuntive bulbari, dei padiglioni auricolari e delle pliche cutanee. Tuttavia esse appaiono piuttosto tardivamente (all'età di 3-10 anni) ed in alcuni casi non si manifestano affatto.

Circa il 15% dei pazienti affetti da a.t. sviluppa tumori, rappresentati nella maggior parte dei casi da linfomi non-Hodgkin e da leucemie linfoidi.

Diagnosi differenziale

La principale diagnosi differenziale è con le eredoatassie, ed in particolare con l'atassia di Friedreich (v. FRIEDREICH, MALATTIA DI**). L'a.t. è facilmente sospettabile quando sono presenti le telangiectasie oculocutanee, ma esse sono spesso tardive. I principali elementi che consentono la diagnosi differenziale con altre sindromi atassiche sono laboratoristici: 1) dimostrazione del deficit immunologico (difetto di IgA e IgG₂ con iper-IgM e, in alcuni pazienti, diminuzione numerica e difetti funzionali dei linfociti T circolanti); 2) elevati livelli di alfa-1 fetoproteina nel siero; 3) presenza di alterazioni cromosomiche caratteristiche (aumentata frequenza nei linfociti del sangue periferico di riarrangiamenti spontanei coinvolgenti i cromosomi 7 e 14); 4) dimostrazione *in vitro* della ipersensibilità delle cellule ai danni indotti da agenti radiomimetici (aumentata frequenza di rotture cromosomiche indotte e ridotta sopravvivenza delle cellule rispetto alle cellule di soggetti normali). Queste ultime due indagini, per la loro relativa complessità tecnica ed interpretativa, dovrebbero essere effettuate solo in centri forniti di specifica esperienza nella diagnostica di questa sindrome.

Una variante dell'a.t., la *sindrome di Nijmegen*, è caratterizzata dalla presenza di microcefalia anziché di ipoplasia cerebellare isolata.

Trattamento

Non esiste la possibilità di curare la malattia, e le principali possibilità di trattamento consistono nella prevenzione delle

infezioni e nella terapia riabilitativa dei deficit motori. Le infezioni respiratorie possono essere ridotte di frequenza e gravità mediante una appropriata fisioterapia (drenaggio posturale delle bronchiectasie, etc.) ed un attento uso degli antibiotici. L'unica forma di immunoterapia di dimostrata efficacia consiste nella somministrazione profilattica di gammaglobuline umane normali per via e.v., con uno schema simile a quello impiegato nei pazienti con agammaglobulinemia congenita (ad es., 300 mg/kg di gammaglobuline somministrate ogni 20-25 giorni). In pratica, è opportuno riservare la somministrazione profilattica delle gammaglobuline ai casi in cui la frequenza delle infezioni respiratorie sia significativamente aumentata ed in cui sia dimostrabile un deficit di IgG₂. La sola mancanza delle IgA non costituisce una indicazione alla somministrazione di gammaglobuline mentre, di converso, la normalità dei livelli delle IgG sieriche totali non ne costituisce una controindicazione se è documentato un deficit di IgG₂ o di un'altra sottoclasse IgG (con l'esclusione delle IgG₄).

Sostanze immunomodulanti (ad esempio ormoni timici, levamisolo, metisoprinolo, etc.) non sono efficaci nei pazienti con a.t., così come altre forme di terapia empirica (es. vitamine ad alte dosi, farmaci antiossidanti, etc.), sporadicamente riportate in letteratura, non hanno dimostrato alcuna utilità.

Il trapianto di midollo osseo, effettuato in rarissimi casi, non riveste interesse pratico, in quanto le conseguenze del deficit immunitario possono essere efficacemente trattate con terapie conservative e le principali cause di disabilità (deficit neurologici) e di morte (neoplasie) non vengono prevenute da questo trattamento.

L'uso diagnostico delle radiazioni ionizzanti (radiografie, TAC, etc.) deve essere riservato ai casi di assoluta necessità, a causa della radiosensibilità dei pazienti e del conseguente rischio di facilitare l'insorgenza di neoplasie. È inoltre assolutamente indispensabile evitare di trattare leucemie o altri tumori con radiazioni ionizzanti e farmaci radiomimetici (ad es. la bleomicina), in quanto queste terapie possono risultare di per sé fatali per i pazienti con a.t. I tumori insorti in questi pazienti possono essere invece trattati, a volte con ottimi risultati, utilizzando farmaci citostatici non radiomimetici (ad es. antimetaboliti).

Epidemiologia e profilassi

L'incidenza della malattia in Italia è stimata intorno ad un caso ogni 40.000 nati. Essa è più rara in altri paesi (fino ad 1:100.000) ed è più frequente in alcune etnie (ad es. Turchi, Ebrei Ashkenazi, Amish). La frequenza genica (cioè la percentuale di soggetti eterozigoti) è valutata, in Italia, intorno all'1-2% della popolazione.

Numerosi studi hanno suggerito l'esistenza di quattro gruppi di complementazione nell'ambito dell'a.t. Tuttavia, il recente clonaggio di un singolo gene, che è risultato mutato in pazienti rappresentativi di tutti i gruppi di complementazione noti, ha dimostrato la monogenicità della malattia. È probabile che i gruppi di complementazione precedentemente descritti riflettano risultati artefactuali dovuti a peculiari caratteristiche radiobiologiche delle cellule dell'a.t.

Studi epidemiologici in eterozigoti obbligati per la mutazione a.t. (genitori di pazienti) hanno dimostrato che essi sono esposti ad un rischio di neoplasie significativamente superiore a quello osservato nella popolazione generale. Diversamente da quanto osservato nei soggetti omozigoti, negli eterozigoti è aumentata la frequenza di tumori solidi (ad es. il rischio di carcinoma della mammella è aumentato di sei volte) anziché di leucemie e linfomi.

L'unica possibile forma di profilassi della a.t. consiste nella diagnosi prenatale di malattia nel caso di famiglie con

casi indice. La diagnosi prenatale di a.t. è stata finora molto difficoltosa, in quanto basata sullo studio della sensibilità degli amniociti agli agenti radiomimetici oppure, più recentemente, sull'analisi molecolare dei cromosomi 11 trasmessi al feto mediante la complessa analisi dei «polimorfismi dei frammenti di restrizione» (RFLP). Ambedue queste tecniche, peraltro fino ad ora utilizzate in un numero molto limitato di casi, non consentono una certezza diagnostica. La recente identificazione del gene responsabile della malattia offre, per il futuro prossimo, la possibilità di una diagnosi prenatale certa basata su tecniche di diagnostica molecolare.

Un altro importante aspetto della epidemiologia della a.t. consiste nella possibilità, ora teoricamente possibile anche se limitata dai costi molto elevati, di identificare i soggetti eterozigoti nella popolazione generale. Questo permetterebbe di attuare programmi di prevenzione dei tumori in questa popolazione di soggetti ad elevato rischio neoplastico.

Bibliografia

- Bridges B. A., Harnden D. G., *Ataxia-Teleangiectasia: a Cellular and Molecular Link between Cancer, Neuropathology and Immune Deficiency*, 1982, John Wiley & Sons, Chichester, England.
 Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., *DNA Repair and Mutagenesis*, 1995, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 Gatti R. A., Swift M., *Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a Degenerative Disease of Child Hood*, 1985, Alan R. Liss, New York.
 Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., *Science*, 1995, **268**, 1749-1753.

MASSIMO FIORILLI

IMMUNODIAGNOSTICA

F. *diagnostic en immunologie*. - I. *immunodiagnosis*. - T. *immunologische Diagnostik*.

QUADRO SISTEMATICO

AGGLUTINAZIONE (I, 899-908)
 AGGLUTININE FREDDI (I, 908-911)
 ALLERGIA** (*217-238)
 ALLERGIE ALIMENTARI* (*230-244; **238-241)
 ASMA BRONCHIALE (II, 1373-1397; **631-651)
 BENCE JONES, PROTEINA DI (II, 2188-2198)
 BLOTING* (*1084-1091)
 CITOMETRIA A FLUSSO* (*1683-1695; **1249-1254)
 COMPLEMENTO, reazioni di fissazione (IV, 819-830)
 CONGELUTINAZIONE (IV, 1051-1056)
 COOMBS, REAZIONE DI (IV, 1051-1056)
 CUTIREAZIONI (IV, 949-952)
 FLOCCULAZIONE (VI, 1768-1771)
 ENOAGGLUTINAZIONE (V, 1337-1359); v. anche AGGLUTININE FREDDI (I, 908-911); COOMBS, REAZIONE DI (IV, 1051-1056); SANGUIGNI GRUPPI (XIII, 1961-2022); VIROLOGIA (XV, 2107)
 EMOLISI (V, 1450-1453); v. anche COMPLEMENTO (IV, 819-830); IMMUNODIAGNOSTICA** (*2683-2684)
 HLA (VII, 1022-1040; *3550-3563; **2607-2623)
 IMMUNODIFFERENZA (VII, 1441-1443)
 IMMUNOCOMPLESSI, MALATTIE DA, *diagnosi e dosaggio* (VII, 1461-1462; *3626-3629; **2658-2661)
 IMMUNOELETTROFORESI (VII, 1498-1511)
 IMMUNOENZIMATICI SAGGI (VII, 1513-1518; *3639-3645)

IMMUNOFLOURESCENZA (VII, 1530-1536); v. anche IMMUNODIAGNOSTICA** (*2673-2712); MICROSCOPIA E MICROSCOPIO (IX, 1263; *5096-5097)
 IMMUNOGLOBULINI, dosaggio (VII, 1558-1562)
 INFIAMMAZIONE (VII, 1888-1925; *3751-3773)
 ISTOCOMPATIBILITÀ (VIII, 749-766; *4209-4220); v. anche TRAPIANTI (XV, 240-243; *7205-7208)
 LECOCITRINI (*4615-4619)
 MALATTIE AUTOIMMUNI (IX, 151-184; **3492-3525)
 NEUTRALIZZAZIONE, REAZIONE DI (X, 1062-1067)
 ONCOCELLI ANTIGENI (X, 1713-1718; *5526-5532)
 OPSONINE (X, 1739-1740); v. anche FAGOCITOSI (VI, 648)
 ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI (X, 1878-1892; *5558-5573)
 PRECIPITAZIONE (XII, 866-878)
 RADIOIMMUNOCONEUGATI*; v. anche SCINTIGRAFIA**, radioimmunoscintigrafia
 RADIOIMMUNOLOGIA (XII, 2386-2410; *6272-6275)
 REUMATOIDE FATTORI (XIII, 1256-1260)
 SIERODIAGNOSTICA (XIV, 208-218); v. anche IMMUNODIAGNOSTICA** (*2673-2712)
 TRAPIANTI, immunologia (XV, 232-239; *7202-7209); v. anche ISTOCOMPATIBILITÀ (VIII, 749-766; *4209-4220), HLA (VII, 1022-1040; *3550-3563; **2607-2623)
 TUBERCOLINA E TUBERCOLINOREAZIONE (XV, 627-638)
 WAALER E ROSE, REAZIONE DI (XV, 2289)

ADCC (*Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*) XV, 838; *5566; *6674; *7344
 Anticorpi antifosfolipidi IMMUNODIAGNOSTICA** SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI (V; v.*)
 Anticorpi anti-insule pancreatiche IMMUNODIAGNOSTICA**: DIABETE MELLITO**
 Anticorpi antimitocondriali (AMA) IMMUNODIAGNOSTICA** (*4704-4705)
 Anticorpi antinucleici IMMUNODIAGNOSTICA**: ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI (V; v.*)
 Anticorpi antitiroidei IMMUNODIAGNOSTICA**: TIROIDE (XIV, 2302-2305)
 Autoanticorpi IMMUNODIAGNOSTICA**: MALATTIE AUTOIMMUNI (IX, 151-184; **3492-3525); ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI (V; v.*)
 Biotina-avidina SCINTIGRAFIA**
 Elettroimmunodiffusione PRECIPITAZIONE (XII, 877-878)
 ELISA IMMUNOENZIMATICI SAGGI (VII, 1513-1518; *3639-3645)
 Immunoblotting BLOTING* (*1090-1091)
 Immunodiffusione PRECIPITAZIONE (XII, 873-875)
 Immunoelettromicroscopia MICROSCOPIA ELETTRONICA (IX, 1241-1244)
 Immunoscintigrafia SCINTIGRAFIA**
 Linfocitotossicità, test di PRIST e RAST LINFOCITI (VIII, 1882-1883)
 IMMUNODIAGNOSTICA**: IMMUNOGLOBULINE (VII, 1561-1562); RESPIRATORIO APPARATO (XIII, 808-809)
 Radioimmunoscintigrafia SCINTIGRAFIA**, immunoscintigrafia

INTRODUZIONE	col. 2675
METODICHE GENERALI DI STUDIO DELL'IMMUNITÀ UMORALE E CELLULARE	col. 2676
Dosaggio delle immunoglobuline sieriche e secretorie (col. 2676). - Identificazione di popolazioni e sottopopolazioni cellulari (col. 2678). - Tipizzazione HLA (col. 2679).	
METODICHE ATTE A RILEVARE REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO	col. 2679
METODICHE ATTE A RILEVARE REAZIONI CELLULO-MEDIATE	col. 2683
METODICHE DI STUDIO DEI SISTEMI DEL COMPLEMENTO, DELLA COAGULAZIONE E DELLA FIBRINOLISI	col. 2683
IMMUNODIAGNOSTICA NELLE MALATTIE INFETTIVE	col. 2684
IMMUNODIAGNOSTICA IN ALLERGOLOGIA	col. 2688
Test <i>in vivo</i> (col. 2689). - Test <i>in vitro</i> (col. 2691).	
IMMUNODIAGNOSTICA NELLE SINDROMI DA IMMUNODEFICIENZA	col. 2699
IMMUNODIAGNOSTICA NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI	col. 2700
Autoanticorpi antinucleari (col. 2701). - Anticorpi anti-gammaglobulinici (fattori reumatoidi) (col. 2701). - Anticorpi antifosfolipidi (col. 2703). - Altri anticorpi rivolti verso strutture non-organo-specifiche (col. 2705). - Anticorpi anti-tiroidei (col. 2706). - Anticorpi anti-cellule parietali gastriche, anti-fattore intrinseco e anti-cellule produttrici gastrina (col. 2707). - Anticorpi anti-insule pancreatiche (col. 2707). - Anticorpi rivolti contro elementi cellulari del sangue (col. 2708). - Altri anticorpi organo- o tessuto-specifici (col. 2708). - Anticorpi anti-recettori (col. 2709).	
IMMUNODIAGNOSTICA NELLE REAZIONI ISOIMMUNI	col. 2709
IMMUNODIAGNOSTICA IN ONCOLOGIA	col. 2710
ALTRE APPLICAZIONI DELL'IMMUNODIAGNOSTICA	col. 2712

INTRODUZIONE

L'immunodiagnostica comprende una vasta gamma di indagini *in vivo* o *in vitro*, praticate con metodiche di tipo immunologico (*immunoassays*, che comprendono vari dosaggi immunodiagnostici ed immunometrici), che possono consentire:

a) di effettuare la diagnosi in molte malattie ad etiologia ben definita (anche a patogenesi non immunologica, come nel caso delle malattie infettive), mediante la documentazione di una reazione immune dell'organismo verso l'agente responsabile. La ricerca di anticorpi verso antigeni diversi (presenti nel siero, nei liquidi biologici od in vari tessuti) è ormai impiegata da molti decenni nelle malattie infettive e, nel campo dell'allergologia e dell'immunologia clinica, per l'individuazione di anticorpi specifici verso allergeni diversi ovvero di autoanticorpi e di isoanticorpi, con tecniche che negli ultimi decenni sono divenute sempre più affidabili per sensibilità e specificità, spesso in completa automazione;

b) di precisare, in varie altre affezioni, alcuni *marker* indicativi dei meccanismi operanti nel determinismo della sindrome (alterazioni primitive o secondarie dell'immunità umorale o cellulare, determinazione di autoanticorpi o di immunocomplessi, determinazione nel siero od in altri liquidi biologici di *marker* tumorali o dei livelli di ormoni, farmaci, etc.).

Ovviamente, la trattazione sarà limitata ai dati fondamentali di ordine biologico, rimandando per ulteriori dettagli alle singole voci (indicate nel testo e nel quadro sistematico), mentre maggior rilievo sarà dato alle applicazioni pratiche nei vari campi della patologia umana.

Le principali metodiche immunodiagnostiche possono essere così distinte:

- 1) Metodiche generali di studio dell'immunità umorale e cellulare.
- 2) Metodiche atte a rilevare reazioni antigene-anticorpo.
- 3) Metodiche atte a rilevare reazioni cellulo-mediate.
- 4) Metodiche di studio del sistema del complemento, della coagulazione e della fibrinolisi.

METODICHE GENERALI DI STUDIO DELL'IMMUNITÀ UMORALE E CELLULARE

Lo studio dell'immunità umorale può essere eseguito mediante il dosaggio delle immunoglobuline sieriche e secretorie, l'esame funzionale dei linfociti B e, a fini di ricerca, l'esame della produzione di anticorpi *in vitro*.

Invece, lo studio dell'immunità cellulare può avvenire mediante l'identificazione e l'analisi funzionale di popolazioni e sottopopolazioni cellulari, soprattutto linfocitarie, e, per fini particolari, mediante la tipizzazione HLA.

Dosaggio delle immunoglobuline sieriche e secretorie

Il dosaggio delle immunoglobuline (v. anche IMMUNOGLOBULINE, VII, 1558-1562) può essere effettuato con varie metodiche, alcune delle quali sono state impiegate già da vari decenni, come l'immuno-elettroforesi (v.), l'immunodiffusione radiale semplice o l'elettroimmunodiffusione (v. PRECIPITAZIONE), mentre attualmente vengono impiegate soprattutto metodiche radioimmunologiche (RIA; v. RADIOIMMUNOLOGIA [v.; v.*]) e immunoenzimatiche (EIA; ELISA; v. IMMUNOENZIMATICI SAGGI [v.; v.*]), molto più sensibili, con antisieri specifici per le varie classi e sottoclassi immunoglobuliniche e per le loro subunità.

I valori medi ed alcune caratteristiche delle varie classi delle immunoglobuline sieriche sono riportati nella tab. I, mentre nella fig. 1 sono rappresentati schematicamente i livelli normali delle immunoglobuline nelle varie età della vita.

Una diminuzione dei livelli sierici delle immunoglobuline si riscontra nelle immunodeficienze (v.; v.*; v.**), primitive e secondarie, soprattutto nelle ipogammaglobulinemie (in cui vi è una riduzione globale di tutte le classi immunoglobuliniche) e nelle disgammaglobulinemie (in cui vi è un deficit selettivo di una o più classi: deficit di IgA, di IgM, di IgG e IgA, di IgG o di sottoclassi IgG, etc.), oltre che nelle

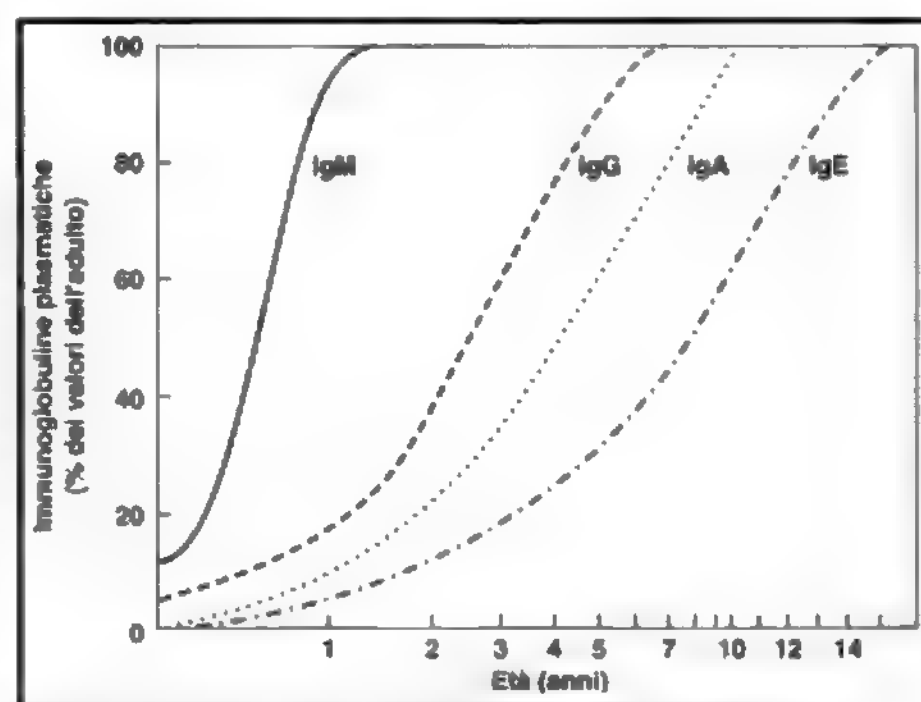


Fig. 1. Andamento delle immunoglobuline plasmatiche dalla nascita all'adolescenza. (Da Errigo, 1994).

TAB. I. PRINCIPALI CARATTERISTICHE DELLE VARIE CLASSI IMMUNOGLOBULINICHE

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Peso molecolare (D)	150.000	160.000	960.000	180.000	190.000
Forma molecolare	Monomero	Monomero, dimeri, etc.	Pentamero	Monomero	Monomero
Sottoclassi	IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄	IgA ₁ , IgA ₂	?	—	—
Contenuto in carboidrati (%)	~4%	~10%	~15%	~9%	~18%
Fissazione del complemento					
Via classica	+	—	+	—	—
Via alternativa	(IgG ₁ ,) +	+	—	+	—
Concentrazione sierica (mg/dl)	1200 ± 300	200 ± 50	125 ± 50	4 ± 1	0,02-0,03
Percentuale rispetto a tutte le Ig sieriche	~80%	~13%	~7%	~0,3%	~0,003%
Emivita (giorni)	~23	~6	~5	2-3	1,5-5

sindromi nefrosiche (in cui la perdita proteica è generalmente limitata alle IgG e alle IgA).

Viceversa, un aumento dei livelli sierici delle immunoglobuline si riscontra nelle gammopatie monoclonali (connettiviti, epatopatie, processi infettivi cronici, etc.).

Un'aumentata sintesi delle singole classi, sottoclassi o subunità immunoglobuliniche si osserva essenzialmente nelle gammopatie monoclonali, come nel plasmocitoma (v. v.*; v.**; generalmente IgG, più raramente altre classi) e nella sindrome di Waldenström (IgM), oltre che nelle parassitosi (IgE), nelle sindromi allergiche (IgE) e nelle infezioni virali acute (IgG o IgM).

Ai fini diagnostici il dosaggio delle singole classi immunoglobuliniche risulta essenziale nei casi di sospette immunodeficienze, primitive o secondarie, o di sospette gammopatie monoclonali, oltre che nella crioglobulinemia, caratterizzata dalla presenza di immunoglobuline che precipitano in maniera reversibile alle basse temperature. Per quanto riguarda il dosaggio delle IgE, si rinvia al paragrafo dedicato all'immunodiagnostica in allergologia (v. sotto, col. 2688; v. ALLERGIA**).

Nelle secrezioni (secreto nasale e bronchiale, saliva, muco gastro-intestinale, colostro, etc.) è possibile effettuare dosaggi delle IgA secretorie. Nei secreti si riscontra in condizioni normali un'elevata concentrazione di IgA, con un rapporto IgG/IgA notevolmente inferiore a 1, mentre nel siero tale rapporto è di poco inferiore a 4 (tab. II).

Un deficit di IgA secretorie si riscontra in varie sindromi allergiche (in particolare, nell'asma bronchiale e nelle sindromi da allergia alimentare), nelle infezioni dell'apparato respiratorio (bronchiti e polmoniti ricorrenti, spesso associate a bronchiectasie) ed in alcune affezioni gastro-intestinali (gastroenteriti, morbo celiaco, parassitosi intestinali, etc.).

Nelle urine il dosaggio delle immunoglobuline o di frazioni immunoglobuliniche risulta utile nel plasmocitoma (v. v.*; v.**; ricerca della proteinuria di Bence Jones [v. BENCE JONES, PROTEINE DI]) e nell'amiloidosi.

Sempre per quanto riguarda lo studio dell'immunità umorale,

possono essere studiate le isoemoagglutinine sieriche dirette contro isoantigeni gruppo-ematici; è attualmente possibile, inoltre, lo studio funzionale dei linfociti B, anche al fine di esaminare la produzione di anticorpi specifici in vitro, il cui studio è ancora appannaggio di pochi laboratori di ricerca.

Identificazione di popolazioni e sottopopolazioni cellulari

L'identificazione delle varie popolazioni e sottopopolazioni cellulari, soprattutto linfocitarie, è di fondamentale importanza nella diagnostica delle malattie immunoproliferative e delle sindromi da immunodeficienza, primitive o secondarie, oltre che nel monitoraggio dell'evoluzione clinico-biologica e della terapia di queste affezioni.

Per quanto riguarda le metodiche per l'analisi dei marcatori cellulari, si usano attualmente tecniche di immunofluorescenza (v.) con anticorpi monoclonali. L'immunofluorescenza tradizionale è stata ormai sostituita dall'impiego del citofluorimetro a flusso (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorter), in cui le cellule, attivate con anticorpi monoclonali fluorescinati, vengono fatte passare attraverso una corrente fluida incrociata da un raggio laser, che eccita il fluorocromo utilizzato per la marcatura dell'anticorpo; i segnali ottici vengono poi trasformati in segnali elettrici ed analizzati (v. IMMUNOFLUORESCENZA; CITOMETRIA A FLUSSO [v.*; v.**]).

La mappa degli antigeni di superficie leucocitari, definiti come «gruppi di differenziazione» (CD: clusters of differentiation), fornisce approfondite conoscenze sulla differenziazione, sulla funzione e sulla crescita dei vari elementi cellulari, nelle malattie immunoproliferative, in particolare nelle leucemie linfoblastiche acute e nelle leucemie linfoidi croniche, e nelle sindromi da immunodeficienza (v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]; LEUCEMIE [v.; v.*; v.**]; LINFOCITI [v.; v.*; v.**]; LINFOMI [v.; v.*; v.**]).

Per l'analisi funzionale delle popolazioni linfocitarie si rinvia al paragrafo dedicato alle metodiche atte a rilevare reazioni cellulo-mediate.

TAB. II. RAPPORTO TRA CONCENTRAZIONI DI IgG E IgA NEL SIERO E IN VARI SECRETI

	Siero	Saliva	Secr. duoden.	Secr. nasali	Colostro
Rapporto IgG/IgA	3,8	0,07	0,33	0,11	0,008

Tipizzazione HLA

In alcuni casi la tipizzazione HLA può essere effettuata ai fini diagnostici, per l'esistenza di alcune malattie, come la spondilite anchilosante o la sindrome di Reiter, in cui si riscontra una significativa associazione con la specificità HLA (malattie HLA-associate). Il rischio relativo è, infatti, la stima dell'incremento di probabilità di andare incontro ad una determinata malattia quando si possiede nel patrimonio genetico una determinata specificità nell'ambito del sistema HLA (v. HLA; HLA*; HLA**).

La tipizzazione degli antigeni di istocompatibilità (v. v.*) riveste, inoltre, particolare importanza nei trapianti di organo (v. TRAPIANTI; TRAPIANTI*).

METODICHE ATTE A RILEVARE REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO

Varie tecniche, basate sulla rilevazione di una reazione antigene-anticorpo, sono comunemente impiegate per mettere in evidenza anticorpi specifici (nel siero, in altri liquidi biologici o nei tessuti) ovvero, all'inverso, per identificare antigeni (batterici, virali, etc.) a livello cellulare o tissutale.

Con alcune metodiche la reazione antigene-anticorpo provoca fenomeni ben visualizzabili (agglutinazione, precipitazione, emolisi); in altri casi, invece, per aumentare la sensibilità analitica di tale reazione è necessario ricorrere all'artificio di marcare (con traccianti diversi: radioisotopici, enzimatici, fluorescenti, chemiluminescenti, etc.) uno dei due reagenti, generalmente l'anticorpo, al fine di rilevare la presenza di antigeni o di anticorpi nel siero o in altri liquidi biologici ovvero di utilizzare il tracciante topografico per l'identificazione a livello cellulare o tissutale, anche ultrastrutturale, di una reazione antigene-anticorpo (tab. III).

Queste reazioni possono essere *dirette* (generalmente da marcatura dell'anticorpo) ovvero *indirette*; in queste ultime si ottiene in una prima fase la formazione di un complesso antigene-anticorpo, mentre nella seconda fase si aggiunge all'immunocomplesso un anti-anticorpo marcato (ad esempio, un anticorpo anti-immunoglobuline ovvero rivolto contro una singola classe immunoglobulinica), che può permettere di mettere in evidenza la reazione.

Le *reazioni di agglutinazione* si basano sul principio secondo cui antigeni particolati (emazie, batteri, etc.), incubati in presenza dell'anticorpo specifico in appropriate concentrazioni, si aggregano saldamente tra loro e sedimentano. Una valutazione quantitativa può essere effettuata con successive diluizioni del siero, in grado di agglutinare una quantità costante di antigene (v. AGGLUTINAZIONE).

TAB. III. PRINCIPALI METODICHE IMPIEGATE PER RILEVARE REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO

Metodiche basate sulla visualizzazione diretta

- Metodiche di agglutinazione
- Metodiche di precipitazione
- Metodiche di emolisi

Metodiche basate sulla marcatura di uno dei due reagenti

- Metodiche di immunofluorescenza
- Metodiche di marcatura con materiali elettrondensi
- Metodiche radioimmunologiche (RIA)
- Metodiche immunoenzimatiche (EIA)
- Metodiche di immunofluorimetria
- Metodiche di chemiluminescenza

Metodiche atte a rilevare reazioni da immunocomplessi

- Test del legame del C3q
- Altre metodiche

Questa tecnica, che può essere adattata ad antigeni solubili, mediante legame covalente dell'antigene a *carrier* particolari (particelle al lattice, emazie, etc.), viene ancor oggi impiegata, oltre che per la determinazione degli antigeni gruppo-ematici (v. SANGUIGNI GRUPPI [v.; v.*]), per dimostrare la presenza di anticorpi specifici nelle malattie infettive e di alcuni autoanticorpi.

Il *test di agglutinazione diretta* è quello classico, in cui anticorpi specifici si legano direttamente a cellule od a sospensioni cellulari. In alcuni casi, comunque, perché avvenga l'agglutinazione si rendono necessari la sostituzione della soluzione fisiologica (in cui viene diluito il siero) con un mezzo a più alta viscosità (5-30% di albumina sierica bovina o destrano) ovvero il trattamento delle emazie con alcuni enzimi, al fine della dimostrazione di agglutinine incomplete (v. EMOAGGLUTINAZIONE).

Il *test di agglutinazione indiretta (passiva)* prevede l'impiego di antigeni adsorbiti o legati covalentemente a cellule (emazie) od a particelle inerti (lattice, bentonite, etc.) ovvero di anticorpi adsorbiti o legati covalentemente a particelle (in quest'ultimo caso si parla di agglutinazione passiva inversa).

Il *test dell'antiglobulina* prevede l'aggiunta al complesso antigene-anticorpo, nella seconda fase, di un siero anti- γ -globulina. Nel *test di Coombs*, ampiamente impiegato nelle anemie emolitiche autoimmuni o isoimmuni, vengono classicamente impiegati anticorpi anti-IgG umane da coniglio; si parla di test diretto se vengono usate emazie del paziente, di test indiretto se vengono usate cellule di riferimento (v. COOMBS, REAZIONE DI). Anche la *reazione di Waaler e Rose* è un test dell'antiglobulina, che impiega emazie di pecora sensibilizzate con IgG anti-eritrociti di pecora; il fattore reumatoide classico, una IgM 19S, si combina con l'IgG fissata, provocando l'agglutinazione (v. WAALER E ROSE, REAZIONE DI).

Esiste poi un *test di inibizione dell'agglutinazione*, che permette di rilevare e dosare antigeni solubili. L'anticorpo, incubato con l'antigene presente nel campione, si lega all'antigene stesso; l'immunocomplesso formatosi viene successivamente aggiunto ad una sospensione di particelle rivestite con l'antigene. La mancanza di agglutinazione indica che i siti di legame dell'anticorpo sono stati saturati dall'antigene, per cui essi non sono disponibili a legarsi con l'antigene adeso alle particelle (v. EMOAGGLUTINAZIONE).

Le *reazioni di precipitazione* consistono nel produrre in un mezzo gelificato o fluido la precipitazione di immunocomplessi antigene-anticorpo, sotto forma di aggregati macroscopici.

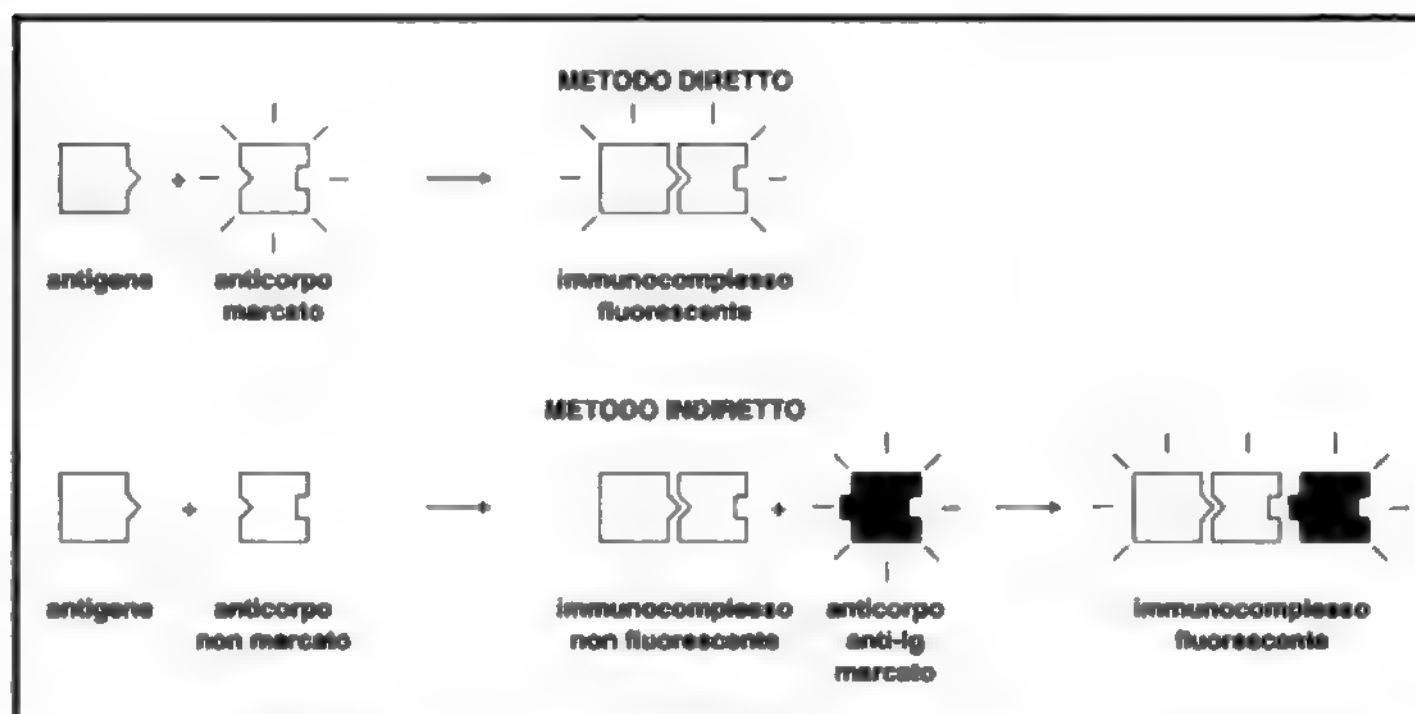
Esistono varie tecniche di *immunodiffusione* (radiale semplice o tecnica di Mancini, doppia bidimensionale o tecnica di Ouchterlony), di *immuno-elettroforesi* (IEF, con le varianti di IEF bidimensionale, immunofissazione, controimmuno-elettroforesi o elettroimmunodiffusione doppia unidimensionale e di rocket-immuno-elettroforesi), di *immunonefelometria* e *immunoturbidimetria* (v. PRECIPITAZIONE).

Con le tecniche di *immunoblotting* è poi possibile la caratterizzazione del profilo della reattività anticorpale specifica verso distinti determinanti antigenici (epitopi) (v. BLOTTING*).

Le *reazioni di emolisi* comprendono varie tecniche, basate sulla *fissazione del complemento* (v. COMPLEMENTO [v.; v.*]); atte a valutare la capacità del sistema complementare di emolizzare emazie eterologhe sensibilizzate, dopo incubazione con un complesso antigene-anticorpo.

Le *tecniche di immunofluorescenza*, diretta o indiretta, permettono la rilevazione di antigeni cellulari o di anticorpi rivolti contro di essi (fig. 2). A livello tissutale o cellulare

Fig. 2. Reazioni di immunofluorescenza. (Da Romagnani e Morrea, 1989).



l'impiego di anticorpi fluoresciniti rivolti contro frazioni complementari può documentare l'esistenza di immunoreazioni complemento-mediate. Alle tecniche tradizionali, che impiegavano come fluorocromi la fluoresceina e la rodamina, si sono aggiunte valide tecniche alternative (ad es., il sistema biotina-avidina), che determinano una fluorescenza particolarmente brillante. Ovviamente, per l'osservazione dell'immunofluorescenza a livello cellulare necessita un'apparecchiatura adeguata di microscopia, con opportuni filtri (v. IMMUNOFLUORESCENZA; MICROSCOPIA E MICROSCOPIO [IX, 1263; *5096-5097]).

Per la lettura al microscopio elettronico può essere praticata la marcatura degli anticorpi con *materiali elettronici* (ferritina, citocromo C, etc.; v. MICROSCOPIA ELETTRONICA*).

Le tecniche radioimmunologiche (RIA: *RadioImmunoAssays*; v. RADIOIMMUNOLOGIA [XII, 2386-2410; *6272-6275]) e immunoenzimatiche (EIA: *EnzymeImmunoAssays* denominate anche ELISA [*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*]; v. IMMUNOENZIMATICI SAGGI [VII, 1513-1518; *3639-3645]), automatizzate o semi-automatizzate, sono quelle oggi più largamente impiegate, non soltanto nella diagnostica etiologica di molte malattie infettive e di varie malattie allergiche, ma anche per la dimostrazione di autoanticorpi o per il dosaggio di analiti diversi.

Queste metodiche, infatti, sono dotate di estrema specificità e sensibilità (è possibile dosare sostanze presenti in quantità infinitesimali, fino a 10^{-12} g). Le tecniche RIA e EIA sono da considerare pressoché sovrapponibili, in quanto cambia soltanto il marcatore (un radioisotopo nel RIA ed un enzima nell'EIA), tanto è vero che, a parità di analiti e di reagenti, si osserva un'ottima concordanza dei risultati di RIA ed EIA. I vantaggi delle metodiche EIA sono essenzialmente di carattere pratico: i coniugati sono stabili e possono essere conservati per lungo tempo; le procedure tecniche sono del tutto esenti da rischi per il personale che le esegue; il materiale necessario può anche essere limitato ad apparecchiature abbastanza economiche, essendo peraltro possibile il ricorso a strumentazioni di alta precisione ed automatizzate.

Esistono poi tecniche immunofluorimetriche (FIA: *Fluorescence ImmunoAssays*), ancora più sensibili, e tecniche di immunochemiluminescenza (LIA: *Luminescence ImmunoAssays*), anch'esse dotate di notevole sensibilità.

Le metodiche per la rilevazione degli immunocomplessi circolanti (ICC) sono numerose e si basano in gran parte sull'attitudine degli ICC di legare il frammento Fc delle

IgG o delle IgM con la prima componente del complemento, cioè con la frazione C1q (v. COMPLEMENTO; IMMUNOCOMPLESSI, MALATTIE DA [v., VII, 1461-1462; v.*, 3626-3629; v.**, 2658-2661]). Il test del legame del C1q (C1qBA: *C1q Binding Assay*) permette di determinare la quantità di C1q marcato che si lega agli ICC: si cimenta con il siero in esame C1q marcato, separando poi mediante precipitazione con polietilenglicole il C1q libero da quello legato agli ICC.

Un'altra tecnica è quella della *conglutina bovina in fase solida*, che si basa sul legame tra la conglutina ed il frammento C3d del complemento fissato agli ICC (v. CONGLUTINAZIONE). Altre metodiche prevedono l'uso di recettori cellulari, come il test con cellule di Raji, che sfrutta la presenza di recettori per il C3b su una linea cellulare derivata da linfociti B da linfoma di Burkitt.

Le malattie in cui si riscontrano ICC sono esposte schematicamente nella tab. IV, suddivise in tre gruppi, a seconda della natura degli antigeni presenti negli ICC.

Per quanto concerne il significato clinico della ricerca di ICC, basti ricordare che in alcune malattie (lupus eritematoso sistemico, etc.) si riscontra un'ampia correlazione tra titoli di ICC e fasi cliniche di attività, per cui questa indagine fornisce utili elementi per la formulazione di un giudizio prognostico, per la scelta di un protocollo terapeutico e per il monitoraggio della terapia, ad esempio dopo trattamenti con scambi plasmatici (*plasma exchange*).

TAB. IV. MALATTIE ASSOCIATE AD IMMUNOCOMPLESSI CIRCOLANTI (ICC)

I. Malattie associate ad ICC che coinvolgono antigeni endogeni	
Immunoglobuline (artrite reumatoide, crioglobulinemia mista)	
Antigeni nucleari (lupus eritematoso sistemico ed altre connettiviti)	
Antigeni cellulari (tiroiditi autoimmuni ed altre malattie autoimmuni organo-specifiche)	
II. Malattie associate ad ICC che coinvolgono antigeni esogeni	
Antigeni di natura farmacologica (sieri, penicillina, etc.)	
Antigeni ambientali (spore fungine, proteine animali, allergeni alimentari, etc.)	
Antigeni di agenti infettivi (batteri, virus, protozoi, elminti)	
III. Malattie associate ad ICC che coinvolgono antigeni sconosciuti	

METODICHE ATTE A RILEVARE REAZIONI CELLULO-MEDIATE

L'analisi funzionale delle popolazioni linfocitarie, in risposta a stimoli specifici od aspecifici, comprende test diversi:

a) *test di trasformazione linfoblastica* (TTL), che studia la capacità dei linfociti a proliferare in risposta a mitogeni aspecifici (fitoemoagglutinina, concanavalina, etc.) ovvero ad antigeni specifici (v. LINFOCITI [v.; v.*; v.**]). Un particolare tipo di stimolazione antigenica è rappresentato dalla coltura linfocitaria mista, impiegata per lo studio dei soggetti compatibili ai trapianti di organo, in cui gli attivatori sono rappresentati da antigeni di istocompatibilità (HLA) di linfociti allogenici, del donatore e del ricevente (v. HLA [v.; v.*; v.**]; TRAPIANTI [v.; v.*]);

b) *produzione e dosaggio di citochine* (IL-1, IL-2, etc.) (v. CITOCINE**); INTERLEUCINE [v.*; v.**]);

c) *test di citotossicità*, per lo studio dell'attività «killer» dei linfociti verso cellule bersaglio (v. LINFOCITI, *test di*, VIII, 1879-1882).

Vi sono, inoltre, numerosi *test in vitro* che consentono di valutare l'immunità cellulare aspecifica, che costituisce il primo meccanismo di difesa dell'organismo, in cui sono coinvolti numerosi elementi cellulari (neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi, etc.):

— *studio della chemiotassi* (v. INFIAMMAZIONE [v.; v.*]);

— *studio della capacità opsonizzante* (v. OPSONINE);

— *studio della capacità fagocitaria e del «killing» batterico* (v. FAGOCITOSI).

Per la valutazione dell'immunità cellulare possono essere effettuati anche *test in vivo*, mediante reazioni intradermiche di antigeni ubiquitari o di richiamo (tubercolina, candidina, streptochinasi-streptodornasi, etc.).

Questi test rivestono particolare importanza diagnostica in alcune affezioni, ad esempio nella malattia granulomatosa cronica, nelle sindrome da iper-IgE e nelle deficienze immunitarie combinate gravi (v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]).

Per valutare l'immunità cellulare specifica, possono essere impiegati *test in vivo* con antigeni specifici, a fini diagnostici, in varie malattie infettive e parassitarie (test alla tubercolina, test di Casoni nell'idatidosi, test di Kveim nella sarcoidosi, etc.) e nelle dermatiti allergiche da contatto (v. CUTIREAZIONE; ECHINOCOCCOSI; SARCOIDOSI; TUBERCOLOSI [v.; v.*]).

METODICHE DI STUDIO DEI SISTEMI DEL COMPLEMENTO, DELLA COAGULAZIONE E DELLA FIBRINOLISI

Come è noto, un'attivazione complementare, attraverso la via classica o la via alternativa, interviene nei processi infiammatori ed in varie malattie a patogenesi immunologica, amplificando gli effetti delle reazioni immuni (v. COMPLEMENTO [v.; v.*]).

Una prima modalità di studio del sistema complementare è costituita dalla *determinazione quantitativa dei diversi componenti*, con varie tecniche (RIA, EIA, immunodiffusione radiale, etc.). Ai fini pratici il solo dosaggio di C3 e C4 può consentire una prima valutazione della via classica e della via alternativa; è utile, comunque, il dosaggio contemporaneo di C1q e del fattore B, al fine di disporre di più dettagliate informazioni.

Alcuni test funzionali, come i *test di emolisi in vitro*, consentono elementi di valutazione più precisi. I test emolitici più usati sono il CH50 (Complement Haemolytic 50%) e l'AP50 (Alternative Pathway 50%), in cui si usano emazie come cellule bersaglio e la misura dell'attività funzionale del complemento viene fornita dalla lisi indotta dall'aggiunta di siero o di plasma.

Con varie tecniche, soprattutto con metodiche RIA o EIA, si possono poi effettuare la ricerca dei prodotti di degradazione (*split products*), lo studio quantitativo e funzionale degli attivatori, degli inibitori e degli inattivatori del complemento e la ricerca di immunoconglutinine, cioè di autoanticorpi rivolti verso componenti del complemento.

L'utilità dello studio del sistema complementare è notevole, non soltanto nelle malattie da deficit complementari, congeniti od acquisiti (come nel caso dell'angioedema ereditario, dovuto a deficit di C1INH; v. COMPLEMENTO* col. *1827), ma anche nelle malattie da immunocomplessi e nelle sepsi, in cui si riscontra frequentemente una correlazione tra fasi di attività della malattia e deficit complementari.

Mediante l'uso di anticorpi rivolti contro i singoli componenti del sistema complementare, marcati con fluorocromi, è possibile rilevare frazioni complementari a livello tissutale, cioè in sede di reazioni immunologicamente mediate. Anticorpi rivolti verso le frazioni complementari possono essere anche impiegati per la rilevazione di esse a livello delle membrane cellulari, ad esempio nelle emocitopenie autoimmuni.

Con tecniche diverse, soprattutto RIA o EIA, è possibile approfondire lo studio ai sistemi della coagulazione e della fibrinolisi, frequentemente coinvolti nelle reazioni immunitarie, soprattutto in quelle complemento-mediate (v. COAGULAZIONE DEL SANGUE*; FIBRINOLISI [v.; v.*]; SANGUE, *studio del sistema emostatico*, XIII, 1951).

IMMUNODIAGNOSTICA NELLE MALATTIE INFETTIVE

La ricerca di anticorpi sierici per la conferma del sospetto diagnostico di una malattia infettiva è complementare alla ricerca diretta, spesso difficoltosa e talora impossibile, dell'agente infettante mediante tecniche microscopiche, colturali o biologiche (v. SIERODIAGNOSTICA).

Al fine di documentare la reazione dell'ospite verso l'agente infettante, già alla fine del secolo scorso erano state messe a punto tecniche sierologiche relativamente semplici, come i test di agglutinazione o di precipitazione, che ancora oggi, con successivi affinamenti, mantengono la loro validità diagnostica, ad es. nel caso della febbre tifoide (v.) o della brucellosi (v.).

La recente tipizzazione antigenica degli agenti infettivi, con la precisazione dei determinanti antigenici (*epitopi*), ha condotto alla produzione di anticorpi altamente specifici, anche monoclonali, per cui attualmente si dispone di tecniche relativamente semplici, dotate di elevatissima specificità e di ottima sensibilità, che forniscono risultati affidabili e ben riproducibili.

I limiti della sierodiagnostica sono principalmente legati al fatto che la sieropositività compare dopo alcune settimane dall'esordio della malattia, che non è, pertanto, documentabile con queste tecniche nelle fasi iniziali. Va ancora ricordato che in alcune malattie infettive, come nella tubercolosi, la risposta immunitaria dell'organismo è essenzialmente cellulo-mediata, documentabile con test cutanei *in vivo* (v. TUBERCOLINA E TUBERCOLINOREAZIONE), mentre la diagnosi è affidata principalmente all'identificazione diretta dell'agente infettivo (v. TUBERCOLOSI [v.; v.*]).

Nella tab. V vengono riportate le principali indagini immunodiagnostiche che vengono eseguite nelle malattie infettive.

Alcuni test diagnostici debbono essere considerati di I livello e necessitano successivamente di ulteriori approfondimenti diagnostici.

Ad esempio, nell'AIDS il test di I livello consiste nella ricerca di anticorpi specifici anti-HIV, effettuabile soprat-

TAB. V. INDAGINI IMMUNODIAGNOSTICHE NELLE PRINCIPALI MALATTIE INFETTIVE

Malattie	Principali indagini immunodiagnostiche
Malattie da infezioni batteriche	
Brucellosi	Agglutinazione diretta (reazione di Wright)* o indiretta, EIA per IgG e IgM*, FC
Infezioni da streptococchi di gruppo A	Ricerca di anticorpi diretti contro la streptolisina O (titolo anti-O-streptolisinico = TAOS)* o contro vari enzimi streptococcici, EIA, test al lattice
Legionellosi	IFI nell'espettorato, nelle urine od in altri liquidi biologici*, EIA*, <i>immunoblotting</i> , immunoistochimica
Leptospirosi	Agglutinazione*, EIA per IgM*, IFI per IgG, IgM e IgA, IHA, FC
Pertosse	EIA per IgG, IgM e IgA*, IFI per IgM, agglutinazione, FC, <i>immunoblotting</i>
Sifilide	Test specifici, verso antigeni treponemici: IFI (FTA-Abs)* per IgM, TPHA*, immobilizzazione treponemica (test di Nelson), <i>immunoblotting</i> Test meno specifici, verso antigeni cardiolipidici: FC (reazione di Wassermann)*, flocculazione (VDRL)*
Tifo addominale	Agglutinazione (reazione di Widal)* con ricerca di agglutinine anti-O e anti-H, emoagglutinazione indiretta, IFI, EIA
Tubercolosi	Test cutanei (per puntura multipla o Tine test* o per intradermoreazione alla Mantoux)
Yersiniosi	Agglutinazione, FC
Malattie da infezioni virali	
Infezioni da adenovirus	EIA per IgG, IgA e IgM*, FC, IEA, neutralizzazione
Infezioni da arbovirus	IFI per IgG e IgM*, IEA, FC
Infezioni da Cytomegalovirus	EIA per IgM e IgG*, IFI per IgG e IgM*, ricerca dell'antigenemia periferica con IFI, <i>immunoblotting</i> , PCR
Infezioni da coronavirus	EIA*, FC, IFI
Infezioni da enterovirus	
Poliovirus	EIA*, FC, IFI, neutralizzazione
Virus ECHO	EIA*, FC, IFI, neutralizzazione
Virus coxsackie	EIA*, FC, IFI, neutralizzazione
Infezioni da rinovirus	RIA o EIA*
Infezioni da rotavirus	EIA (sulle feci o su tamponi rettali)*
Infezioni da retrovirus (HIV)	EIA*, <i>immunoblotting</i> *, PCR, immunoistochimica
Infezioni da virus di Epstein-Barr	Test specifici: EIA per IgM e IgG*, EIA e IFI per l'antigene capsidico (VCA)*, per l'antigene precoce (EA), per l'antigene nucleare (EBNA)*, <i>immunoblotting</i> Test meno specifici, per anticorpi eterofili: reazione di Paul-Bunnell*, Monotest*
Infezioni da virus epatitici	
Epatite A	— Ricerca di HAVAb: EIA* per IgM e IgG
Epatite B	— Ricerca di HBsVAg (antigene di superficie): RIA o EIA*, RPHA, test al lattice — Ricerca di HBcVAg (antigene del «core»): RIA o EIA*, IF diretta o immunoelettromicroscopia su tessuto epatico — Ricerca di HBsVAb: RIA o EIA per IgM*, RPHA — Ricerca di HBcVAb: RIA o EIA per IgM* e IgG — Ricerca di HCVAb: RIA o EIA*, RIBA
Epatite C	— Ricerca di HDVAg: RIA o EIA*, <i>immunoblotting</i> (IF su tessuto epatico)
Epatite D	— Ricerca di HDVAb: RIA o EIA* per IgM e IgG — Ricerca di HEAg: RIA o EIA*
Epatite E	— Ricerca di HEAb: RIA o EIA*
Infezioni da virus herpes simplex	RIA o EIA per IgM e IgG*, FC, IFI, emoagglutinazione passiva, immunoistochimica
Infezioni da virus influenzali	RIA o EIA per proteina M ed altri antigeni virali*, FC*, IEA*, IFI
Infezioni da virus morbilloso	RIA o EIA per IgM e IgG*, IFI per IgM e IgG*, FC
Infezioni da virus parainfluenzali	EIA*, IFI, IEA, FC
Infezioni da virus parotiteico	RIA o EIA per IgM e IgG*, IFI per IgG e IgM*, FC, IEA, neutralizzazione virale
Infezioni da virus poliomieltico	FC*, neutralizzazione*
Infezioni da virus rabbico	IFI
Infezioni da virus respiratorio sinciziale (VRS)	RIA o EIA per IgM e IgG*, IFI per IgM e IgG*, FC, RPHA
Infezioni da virus rubeolico	EIA per IgG e IgM*, IFI per IgG e IgM*, IEA*, FC

(segue)

IMMUNODIAGNOSTICA

segue: TAB. V

Malattie	Principali indagini immunodiagnostiche
Infezioni da virus varicella-zoster	EIA per IgM e IgG*, IFI per IgM e IgG*, FC*, immunoblotting, immunoprecipitazione, immunoistochimica
Infezioni da Chlamidie	
Clamidiosi	EIA per IgG e IgM*, IFI per IgG e IgM*
Infezioni da Rickettsie	
Rickettsiosi	EIA e IFI per IgG e IgM*, agglutinazione (reaz. di Weil-Felix)*, FC
Infezioni da micoplasmi	
Infezioni da <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	EIA e IFI per IgG e IgM*, agglutinine fredde
Infezioni fungine	
Aspergillosi	Immunodiffusione*, IFI, FC
Candidiasi	EIA e IFI per IgG, IgM e IgA*, agglutinazione al lattice*, immunodiffusione
Criptococcosi	Agglutinazione al lattice*
Istoplasmosi	FC, immunodiffusione, agglutinazione al lattice
Sporotricosi	Agglutinazione
Infezioni da parassiti	
Amebiasi	EIA per IgG, IgM e IgA*, IFI*, RPHA
Cisticercosi	EIA, immunodiffusione
Coccidiosi intestinali	IFI (su strisci fecali)
Distomatosi	IFI, RPHA
Echinococcosi	RIA o EIA* per IgE, IFI, immunoelettroforesi, emoagglutinazione passiva, immunoblotting
Filariosi	EIA*, IFI
Giardiasi	IFI (su strisci fecali)
Leishmaniosi	EIA*, IFI*, emoagglutinazione passiva
Malaria	IFI*, immunodiffusione
Microsporidiosi	EIA* o IFI*
Pneumocistosi	RIA o EIA*, IFI*, CIE, immunoblotting, immunoistochimica
Schistosomiasi (Bilanziosi)	RIA o EIA*, IFI*, emoagglutinazione indiretta
Toxocariasi	EIA* per IgG, RAST per IgE
Toxoplasmosi	EIA per IgG e IgM*, IFI*, immunoblotting, emoagglutinazione indiretta, FC, test di Sabin-Feldmann (dye test), immunoistochimica
Trichinosi	EIA*, IFI*
Tripanosomiasi	EIA*, IFI, FC, emoagglutinazione indiretta

* Metodiche più comunemente impiegate. Abbreviazioni: Ab = anticorpi; Ag = antigene; CIE = contromunoelettroforesi; EIA = test immunoenzimatici; FC = fissazione del complemento; IFI = inibizione dell'emoagglutinazione; IIA = emoagglutinazione indiretta; IF = immunofluorescenza; IFI = immunofluorescenza indiretta; PCR = Polymerase Chain Reaction; RAST = RadioAllergo Sorbent Test; RIA = test radioimmunologici; RIBA = Recombinant Immunoblot Assay; RPHA = emoagglutinazione passiva inversa; TPHA = Treponema Pallidum HaemoAgglutination.

tutto con tecniche EIA, particolarmente adatte per *screenings* in campioni di popolazione. La specificità e la sensibilità dei test EIA sono nettamente migliorate nei *kits* diagnostici di nuova generazione, che impiegano peptidi sintetici corrispondenti agli epitopi sierologicamente attivi dell'HIV (p18, p24, gp41, gp120, etc.); inoltre, la scoperta di alcuni casi di AIDS dovuti ad HIV-II ha suggerito l'inserimento di antigeni di HIV-II nei *kits* diagnostici. Un approfondimento diagnostico deve essere poi effettuato con tecniche di immunoblotting (v. *BLOTTING**, *1090-1091), molto affidabili e specifiche, che mettono in evidenza anticorpi diretti contro diverse proteine del «core» virale e contro le glicoproteine di rivestimento permettendo anche di monitorare l'evoluzione dei diversi quadri anticorpali nel corso della malattia (v. *SINDROME DA DEFICIENZA ACQUISITA* [v. *; v. *]).

Deve essere ricordato comunque, che l'immunodiagno-

stica in infettivologia, oltre alla conferma di un sospetto diagnostico, trova altri impieghi:

- a) per *screening* sierodiagnostici, su donatori di sangue od in soggetti a rischio, onde escludere la presenza di agenti infettivi (virus epatitici, HIV, etc.);
- b) per verifica dell'efficacia di trattamenti vaccinici;
- c) per verifica dell'esistenza di una immunità acquisita (ad es., alla varicella in donne prima della gravidanza o alla tubercolosi nel personale medico o paramedico di reparti specializzati).

IMMUNODIAGNOSTICA IN ALLERGOLOGIA

La diagnostica delle malattie allergiche presenta caratteristiche ed aspetti particolari. Infatti, il problema diagnostico non si esaurisce nell'accertamento della forma clinica, ma consiste soprattutto nel riconoscimento e nella dimostra-

TAB. VI. PROVE DIAGNOSTICHE SPECIFICHE NELLE ALLERGOPATIE

Test in vivo

- Test cutanei diretti (per puntura, per scarificazione, intradermici, epicutanei)
- Test cutanei indiretti (trasporto passivo locale)
- Test mucosi
- Test di eliminazione (o di sospensione)
- Test di provocazione (o di scatenamento)

Test in vitro

- Ricerca di IgE ed IgG specifiche (con metodi radioimmunologici, immunoenzimatici, etc.)
- Test di *releasability* dei mediatori (dosaggio dell'istamina e di altri mediatori liberati dai basofili, etc.)
- Ricerca di anticorpi precipitanti o emoagglutinanti, etc.

zione dei fattori etiologici specifici (allergeni) che determinano la malattia (v. ALLERGIA**).

La diagnosi etiologica appare di estrema importanza anche da un punto di vista pratico, in quanto si può ottenere la scomparsa delle manifestazioni cliniche mediante l'allontanamento del paziente dall'esposizione all'allergene o mediante un trattamento iposensibilizzante specifico.

I test diagnostici specifici sono elencati nella tab. VI. La scelta delle indagini più appropriate nel singolo caso deve essere effettuata in rapporto: a) alle manifestazioni cliniche presentate dal paziente ed al tipo di immunoreazione che si presume in causa; b) alle presunte modalità di sensibilizzazione del paziente; c) alla natura dell'allergene da saggiare (tab. VII).

Test in vivo

I *test cutanei* sono, tra le varie indagini diagnostiche, quelli più noti e più frequentemente praticati e conservano tuttora un'indiscussa validità, purché siano correttamente eseguiti e, soprattutto, correttamente valutati.

La metodica più impiegata è quella del *prick test*, che consiste nell'applicazione di una goccia dell'estratto allergenico sulla cute (in genere, sulla superficie volare dell'avambraccio) e nel pungere poi attraverso la goccia gli strati superficiali della cute con una lancetta sterile dotata di punta da 1 mm; la goccia deve essere poi rapidamente asciugata dopo la puntura.

Meno usato è attualmente il *test per via intradermica*, consistente nell'iniezione di 0,02-0,03 ml di estratto allergenico con siringhe tipo tuberculina, munite di ago sottile che

viene orientato in direzione quasi parallela alla superficie cutanea (v. CUTIREAZIONI).

È stato, invece, ormai praticamente abbandonato il *test per scarificazione (scratch test)*.

Si usano normalmente in una prima seduta pannelli standard di allergeni, cui possono essere aggiunti, in sedute successive, altri allergeni meno comuni, selezionati in base ai dati anamnestici ed alle caratteristiche delle manifestazioni cliniche del paziente.

Le eventuali reazioni cutanee positive, di tipo eritemato-pomfoide, sono di tipo immediato, per cui si manifestano entro 15-30' minuti dall'esecuzione della prova diagnostica. Esse sono dovute alla degranulazione mastocitaria locale, con liberazione di istamina e di altri mediatori (è stato calcolato che la reazione cutanea di un *prick test* sia prodotta da 10^8 molecole di allergene, che vengono in contatto con circa 10.000 mastociti cutanei, cui sono fissate 10^5 IgE allergene-specifiche).

I *test epicutanei (patch test)*, da praticare generalmente sulla cute del dorso, rappresentano le prove diagnostiche elettive nelle dermatiti da contatto. Anche per questi test si impiega inizialmente una serie preordinata degli allergeni più comunemente responsabili; nei singoli casi possono essere usate altre sostanze allergeniche sospette.

Le eventuali reazioni positive, cellulo-mediate, sono di tipo ritardato, per cui la lettura deve essere effettuata dopo 24-48 h ed anche oltre, e consistono in manifestazioni localizzate eczematiformi (v. CUTIREAZIONI).

I *test di trasporto passivo locale* sono stati ormai abbandonati, soprattutto per l'elevato rischio di trasmettere con il siero del paziente alcune infezioni a riceventi sani, usati come «reattivi biologici».

I *test mucosi* (nasali, congiuntivali, etc.), che equivalgono a veri e propri test di provocazione, sono brevemente descritti in seguito.

I *test di eliminazione* (o di sospensione) consistono nell'osservazione clinica di eventuali variazioni sintomatologiche in rapporto all'eliminazione dell'esposizione del paziente all'allergene sospetto. Queste prove trovano elettiva applicazione nelle forme di allergia alimentare (v. ALLERGIE ALIMENTARI [v.*; v.**]), in cui sono state proposte varie diete di eliminazione, che debbono essere protratte per alcune settimane, ma possono essere effettuate in casi di sospette sindromi allergiche da farmaci, in cui deve essere immediatamente sospeso il medicamento che si suppone possa aver dato luogo ad una sindrome reattiva, ed anche in alcuni casi particolari di sindromi allergiche da allergeni da

TAB. VII. CRITERI DI SCELTA DELLE PROVE DIAGNOSTICHE IN RAPPORTO ALLA NATURA DELL'AGENTE ETIOLOGICO

Allergeni	Test in vivo				Test in vitro	
	Cutanei	Epicutanei	Eliminazione	Esposizione	IgE specifiche	Precipitine
Pollini, dermatofagoidi, altri allergeni da inalazione	++		±	+	++	
Spore fungine	+		+	+	+	+
Alimenti	±		+	+++	±	±
Farmaci	++		+	+++	±	
Veleni di insetti	++				++	
Allergeni da contatto		++	+	++		

* La prova può presentare rischi per il paziente

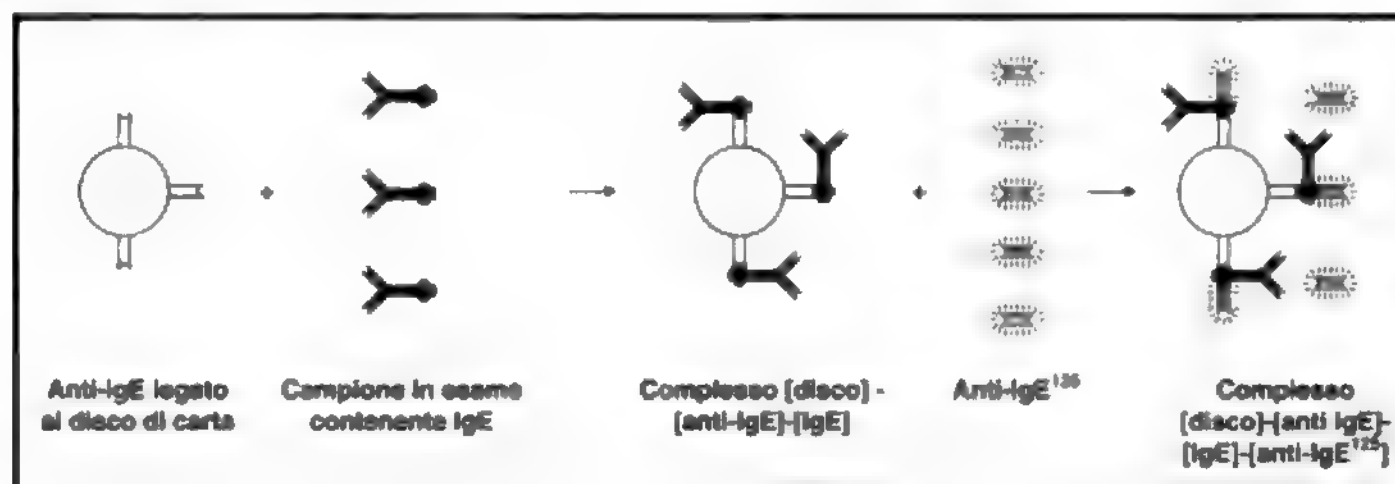


Fig. 3. Rappresentazione schematica del PRIST. (Da Errigo, 1994).

inalazione (sospensione temporanea dell'attività lavorativa, allontanamento di animali domestici, etc.) o da contatto.

I test di provocazione, all'inverso, tendono a riprodurre il quadro sintomatologico in seguito all'esposizione all'allergene sospetto. Ovviamente, queste prove di scatenamento (*challenge test*) comportano un certo rischio, per cui debbono essere praticate in ambiente ospedaliero e soltanto in pazienti nella cui anamnesi non figurino episodi, anche solo sospetti, di shock anafilattico o di edema della glottide.

Questi test possono essere eseguiti per via *bronchiale*, *nasale*, *congiuntivale* od *orale* (con farmaci ovvero con alimenti ed additivi alimentari).

Oltre all'osservazione del quadro clinico, si può eseguire lo studio immunochimico e cellulare dei liquidi di lavaggio (bronchiale, nasale, etc.) dopo test di provocazione; possono essere analizzati, inoltre, i livelli di alcuni mediatori nel siero (istamina, triptasi, ECP [proteina cationica eosinofila], etc.) o nelle urine (LTD4 [leucotriene D4], etc.).

Test in vitro

L'impiego dei test *in vitro*, con varie metodiche introdotte negli ultimi decenni, ha comportato significativi progressi nella diagnostica delle malattie allergiche IgE-mediate. Tra i vantaggi di tali test, globalmente considerati, vanno indicate soprattutto la sensibilità e la specificità notevolmente elevate, la buona riproducibilità, l'assoluta innocuità per il paziente; gli svantaggi rispetto ai test cutanei si riassumono, in pratica, nel costo relativamente elevato.

La determinazione delle *IgE totali* sieriche, che viene effettuata con metodiche RIA o EIA (il prototipo delle tecniche di dosaggio è il PRIST: *Paper Radiolabel Immuno Sorbent Test*, fig. 3; v. anche IMMUNOGLOBULINE, VII, 1561-1562) e che viene ancora oggi molto frequentemente richiesta, riveste scarso valore diagnostico.

Se è vero, infatti, che valori molto elevati di IgE totali, superiori a 200 kU/l (1 kU/l = 2-3 ng/ml) si riscontrano nelle malattie allergiche, è altrettanto vero che vi siano

TAB. VIII. VALORI «NORMALI» DI IgE NELLE DIVERSE ETÀ DELLA VITA

Età	Valori di IgE (kU/l)
Neonati	0,5-2
Da 1 mese a 1 anno	< 20
Da 1 a 5 anni	< 70
Da 5 a 10 anni	< 100
Da 10 a 12 anni	< 200
Da 12 a 19 anni	< 150
Da 19 anni in poi	< 200

molti casi di pazienti sicuramente allergici con valori «normali» di IgE totali (tab. VIII). Inoltre, le IgE totali aumentano in varie condizioni patologiche sicuramente non allergiche (ad esempio, nelle parassitosi intestinali e nelle connettiviti, oltre che, ovviamente, nella sindrome da iper-IgE e nei rarissimi casi di mieloma IgE), per cui non risulta possibile formulare una diagnosi generica di sindrome allergica sulla base della sola determinazione delle IgE totali.

Comunque, il rilievo di elevati valori di IgE totali, quando i test cutanei o sierologici per i comuni allergeni siano negativi, deve indurre ad ulteriori approfondimenti diagnostici. Inoltre, il riscontro di alti livelli delle IgE totali nel cordone ombelicale del neonato (oltre 0,9 kU/l) o nella prima infanzia può costituire un *marker* di rischio per allergopatie.

Ben altro significato diagnostico riveste, invece, la dimostrazione di *IgE specifiche* sieriche verso un determinato allergene, che può consentire di effettuare una diagnosi

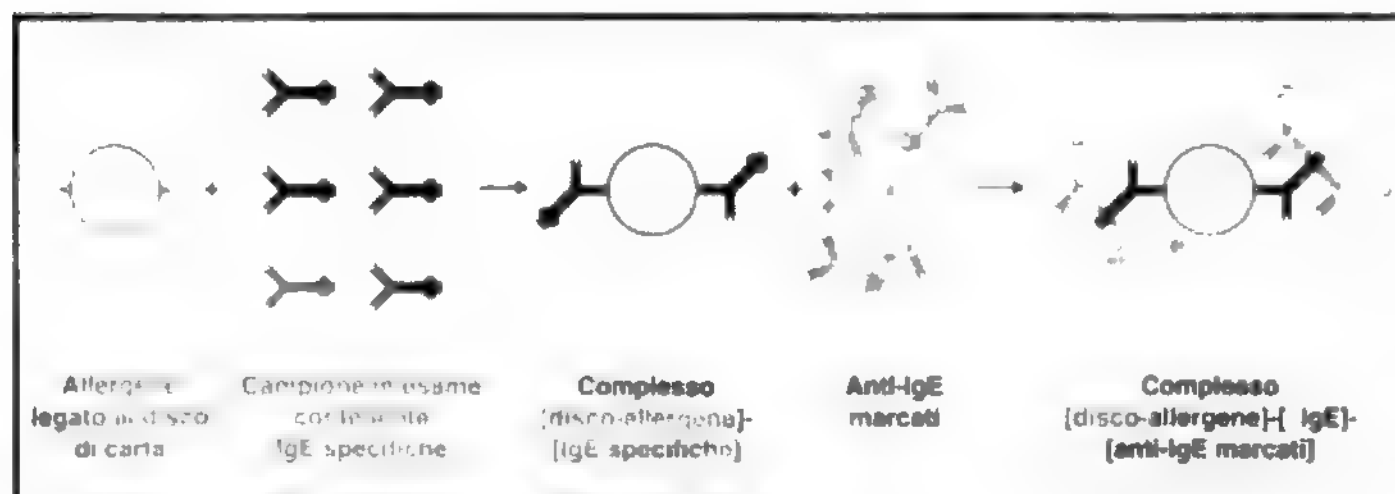


Fig. 4. Rappresentazione schematica del RAST. (Da Errigo, 1994).

etiologica *in vitro*, anche perché vi è una concordanza pressoché totale tra i test cutanei e questi test *in vitro*, soprattutto per quanto riguarda gli allergeni da inalazione.

Il RAST (*RadioAllergoSorbent Test*) (fig. 4; v. anche IMMUNOGLOBULINE, VII, 1561-1562) ha costituito la prima metodica introdotta in campo applicativo; da allora, numerose altre metodiche RIA o EIA si sono rese disponibili (tab. IX). Tra l'altro, vi sono attualmente numerosi sistemi automatici e semiautomatici per la determinazione delle IgE specifiche ed altri (tra cui l'UniCAP[®]) ne sono stati annunciati.

In pratica, si possono distinguere fondamentalmente due tipi di metodiche.

1. Metodiche basate sulla marcatura di anti-IgE (metodi *sandwich*), con impiego di sistemi allergene-fase solida e con marcatura di anti-IgE con tecniche radioimmunologiche od immunoenzimatiche. Queste metodiche, che hanno avuto il loro sviluppo con il RAST, sono quelle ancora più largamente impiegate nella pratica clinica. È da rilevare

che con queste metodiche le IgE reagiscono come anticorpi (frammento Fab).

2. Metodiche basate sulla marcatura dell'allergene (*antigen binding assays*), con impiego di anti-IgE su fase solida, cui si legano le IgE, totali e specifiche. Le prime metodiche proposte (PTRIA [*Polystyrene Tubes Radio Immuno Assay*], radioimmunodiffusione, etc.) risultavano notevolmente indaginose, per cui per lungo tempo sono state utilizzate quasi esclusivamente a fini di ricerca scientifica. Negli ultimi anni sono state, però, introdotte alcune metodiche «a cattura», che prevedono l'uso di micropiastre cui sono legate le anti-IgE.

Attualmente si impiegano quasi esclusivamente metodiche immunoenzimatiche. Sia per i test radioimmunologici che per quelli immunoenzimatici è necessario eseguire confronti con preparazioni standard di controllo contenenti IgE specifiche per quel determinato allergene in concentrazioni diverse. Mediante il confronto con queste preparazioni standard di controllo è possibile effettuare, entro certi limiti, una valutazione quantitativa delle IgE specifiche (in

TAB. IX. PRINCIPALI SISTEMI IMMUNOENZIMATICI DISPONIBILI IN ITALIA PER LA DETERMINAZIONE DELLE IgE SPECIFICHE

Metodiche basate sulla marcatura di anti-IgE					
Metodica	Allergeni in fase solida	Anticorpi anti-IgE marcati	Substrato	Lettura	Standardizzazione
ENEASYSTEM	Adesi ad una fase solida in PVC (ACE)	Policlonali, coniugati con ureasi	Urea	Fotometrica	Curve specifiche per famiglie di allergeni
UniCAP	Adesi ad un derivato di cellulosa attivato con bromuro di cianogeno	Mix di policlonali e monoclonali coniugati con β -galattosidasi	Metil-umbelliferil-galattoside	Fluorimetrica	IgE totali (WHO 75/502)
FAST	Adesi a micropiastre	Monoclonali, coniugati con fosfatasi alcalina	Metil-umbelliferil-fosfato	Fluorimetrica	IgE totali (WHO 75/502)
HY-TEC	In fase solida, predisposti in tubi	Fosfatasi alcalina	Para-nitrofenilfosfato	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
AlaSTAT	In fase liquida	Perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
CLAS	In fase liquida	Perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
Magic Lite SQ	Adesi a particelle paramagnetiche	Monoclonali, coniugati con estere di acridino		Luminometrica	Curva di G6
ACCESS	In fase liquida, adesi a particelle paramagnetiche	Legati a fosfatasi alcalina	Dioxetano	Luminometrica	IgE totali (WHO 75/502)
MATRIX	Pannelli prefissati di allergeni	Coniugati con fosfatasi alcalina	Bromo-cloro-indolil-fosfato	Fotometrica	Curva per ciascun allergene
Metodiche basate sulla marcatura dell'allergene					
Metodica	Anti-IgE e fase solida	Allergeni marcati	Substrato	Lettura	Standardizzazione
Immulite	Tubi con biglie coattate con anti-IgE	In fase liquida, coniugati con fosfatasi alcalina	Adamantil dioxetano fosfato	Luminometrica	IgE totali (WHO 75/502)
ALLERTECH	Micropozzetti coattati con anti-IgE	Allergeni in fase liquida biotilati/streptavidina-perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
CARLA	Micropiastre coattate con anti-IgE	Allergeni in fase liquida biotilati/streptavidina-perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)
REALTEST	Micropiastre coattate con anti-IgE	Allergeni in fase liquida biotilati/streptavidina-perossidasi	Tetrametilbenzidina	Fotometrica	IgE totali (WHO 75/502)

kU/l o in UI/ml) presenti nel siero del paziente in esame verso un determinato allergene, cioè stabilire *classi di positività* per ciascun allergene. La classe 0 è negativa (cioè nel campione in esame non sono svelabili anticorpi specifici verso quell'allergene), la classe 1 è da considerare molto dubbia, mentre le classi comprese tra 2 e 6 sono da considerare positive (tanto più alta è la classe tanto più alto è il livello delle IgE specifiche per un determinato allergene).

Ovviamente, la ricerca di IgE specifiche può essere eseguita, oltre che sul siero, anche su altri liquidi biologici (secreto nasale, lacrime, etc.); è stato anche proposto di effettuare in età pediatrica, per una migliore *compliance* dei piccoli pazienti, la ricerca delle IgE specifiche nella saliva.

Nel complesso, comunque, i test sierologici per la ricerca di IgE specifiche si dimostrano molto affidabili. Tra l'altro, negli ultimi anni il numero degli allergeni disponibili per la ricerca di IgE, inizialmente piuttosto limitato, è considerevolmente aumentato, sì da essere ormai paragonabile a quello degli allergeni che si possono utilizzare per i test cutanei. Gli allergeni, inoltre, sono standardizzati contro i riferimenti WHO (Organizzazione Mondiale della Sanità) e NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control).

La concordanza tra test sierologici per IgE specifiche e test cutanei risulta notevolmente elevata, soprattutto per gli allergeni da inalazione.

La determinazione delle IgE specifiche verso *allergeni alimentari* presenta tuttora alcuni problemi, sia di tipo tecnico (in rapporto alla possibile allergenicità di prodotti del metabolismo, e non degli alimenti interi, ed al frequente intervento di meccanismi non IgE-mediati), sia di tipo metodologico (in rapporto alla scarsa purificazione di molti allergeni alimentari ed agli elevati valori di *binding* aspecifico).

La ricerca di IgE verso *farmaci* comporta una problematica simile a quella segnalata per gli alimenti. Soltanto per pochi farmaci, tra l'altro, appare indiscutibile la dimostrazione che possano indurre sindromi reattive IgE-mediate; tra questi, si ricordano in particolare la penicillina, l'insulina, la corticotropina naturale e sintetica.

La ricerca di IgE sieriche verso *veleni di Imenotteri* appare, invece, di elevato interesse diagnostico.

L'utilità clinica del dosaggio delle *IgG specifiche* totali e delle *sottoclassi IgG specifiche* (tab. X), con metodiche RIA o EIA, è tuttora controversa, almeno dal punto di vista diagnostico, anche se può rivestire un certo interesse nei casi di ipersensibilità ad alimenti od a veleni di Imenotteri.

La risposta IgG-specifica ad alimenti (ovalbumina, β -lattoglobulina, etc.) è prevalentemente di tipo IgG₁, anche se si possono repertare in misura minore anticorpi specifici appartenenti alle altre sottoclassi.

Per quanto riguarda l'ipersensibilità a veleni di Imenotteri, significativi livelli di IgG specifiche possono essere ri-

levati in apicoltori ed in altri soggetti dopo punture accidentali, indipendentemente dal fatto che abbiano presentato o meno manifestazioni cliniche di rilievo.

Maggiore è l'importanza del dosaggio delle IgG specifiche (soprattutto delle IgG₁) nel monitoraggio dell'immunoterapia specifica, anche se non vi è una costante correlazione tra risultati clinici ed aumento delle IgG₁ dopo tale tipo di trattamento (v. IMMUNOTERAPIA).

Oggi è anche possibile la caratterizzazione del *profilo della reattività anticorpale specifica verso distinti determinanti antigenici di un allergene*. Alcune metodiche immunochimiche (*Western blot* o *Immunoblot*; v. BLOTTING*) consentono di separare elettroforeticamente i diversi determinanti antigenici (epitopi) di un allergene in bande a differente peso molecolare, che sono poi trasferite su un supporto ad alta capacità legante per le proteine, posto poi a reagire con il siero in esame. Gli anticorpi specifici eventualmente presenti nel siero vanno a legarsi selettivamente con i singoli determinanti antigenici. Si può poi procedere alla rilevazione del complesso antigene-anticorpo mediante incubazione con un antisiero anti-isotipo (anti-IgE o anti-IgG) coniugato con un enzima e successiva incubazione con un substrato cromogeno.

Esistono poi vari test di «*releasability*» dei mediatori, che misurano la capacità delle cellule effettrici (mastociti tessutali, basofili, eosinofili, etc.) di liberare mediatori in seguito a stimolazione con l'allergene specifico. Questi test possono essere impiegati a fini diagnostici ovvero, più utilmente, per monitorare lo stato di attività di un'allergopatia, considerando i mediatori *marker* solubili di immunoflogosi.

Scarsamente impiegato, in quanto non completamente attendibile, è il dosaggio dell'*istamina*, con metodiche fluorimetriche (LHRT: *Leukocyte Histamine Release Test*), RIA o EIA. Il test di *releasability* si effettua aggiungendo *in vitro* al sangue intero eparinato concentrazioni scalari dell'allergene da provare. L'istamina (v.), inoltre, ha una breve emivita plasmatica per cui, dopo un test di provocazione *in vivo*, compare in circolo entro 2', raggiunge i valori massimi dopo 5' e ritorna ai valori basali entro 15-30'.

L'istamina liberata viene rapidamente catabolizzata a derivati dell'acido imidazolacetico ed a metil-istamina, che può essere ritrovata nelle urine. Il dosaggio della *metilistamina nelle urine* può essere effettuato anche su campioni di urine prelevati a distanza di 1-2 ore dall'insorgenza di un episodio di tipo anafilattico (ad esempio, da punture di Imenotteri, alimenti o farmaci).

Viceversa, la determinazione nel siero o in altri liquidi biologici dei livelli di *triptasi*, che ha un'emivita di alcune ore, rappresenta un buon indice di attivazione mastocitaria. Il dosaggio della triptasi viene effettuato con metodiche RIA. Nella maggior parte dei sieri normali si riscontrano valori di triptasi inferiori a 1,3 ng/ml (per sicurezza, comun-

TAB. X. CARATTERISTICHE DELLE SOTTOCLASSI IgG

	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
Codice alfa sintole	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4
Peso molecolare	146.000	146.000	170.000	146.000
Costante di diffusione (Svedberg)	1,8-14,3	0,4-8,9	0,09-3,2	0,01-1,8
Percentuale sierica	66%	23%	7%	4%
Attività catalitica (attività)	+	+	+	-

que, vengono considerati nella norma livelli inferiori a 5 ng/ml); nello shock anafilattico i valori sierici aumentano 15-30' dopo l'esposizione all'allergene, raggiungono i valori massimi dopo 1-2 h e successivamente decrescono, con un'emivita di 1,5-2,5 h. Il dosaggio della triptasi sierica può rivelarsi utile per la diagnosi *post-mortem* di shock anafilattico in soggetti andati incontro a morte improvvisa ovvero *in vivo*, dopo test di provocazione, nel liquido di lavaggio broncoalveolare (elevati livelli nell'asma bronchiale ad etiopatogenesi allergica), nel secreto nasale (nella rinite allergica), nelle lacrime (nella congiuntivite allergica) e nel liquido di bolla cutanea (nella fase immediata di un test cutaneo con allergeni). Scarsamente attendibile appare, invece, il test di degranulazione dei basofili, che dà luogo spesso a false positività ovvero, più raramente, a false negatività.

Per quanto concerne i mediatori eosinofilo-derivati, di notevole interesse sono i test RIA e EIA per il dosaggio della proteina cationica eosinofila (ECP) nel siero ed in altri liquidi biologici. Nei soggetti normali i livelli sierici di ECP vanno da 2 a 20 mcg/l, mentre negli allergopatici, in particolare negli asmatici, si riscontrano valori sierici di ECP notevolmente più elevati. Tra l'altro, vi è una significativa correlazione tra ECP sierico e ECP nel liquido di lavaggio broncoalveolare, per cui il dosaggio dei livelli sierici di ECP, anche dopo test di provocazione bronchiale, può risultare utile per il monitoraggio delle riacutizzazioni nei pazienti asmatici. Si è reso disponibile, inoltre, un altro test per la determinazione della neurotossina eosinofila (EDN/EPX), le cui concentrazioni sieriche, in soggetti adulti normali, oscillano entro un range piuttosto ampio (8-40 mcg/l).

In merito ai mediatori neutrofilo-derivati, è attualmente disponibile anche un test RIA per la determinazione della mieloperossidasi (MPO) nei liquidi biologici (siero, liquido di lavaggio broncoalveolare, etc.), che consente pertanto di accertare *in vivo* l'attività dei granulociti neutrofili. Recentemente, inoltre, è stata commercializzata una metodica EIA per la determinazione della endopeptidasi neutra (NEP) nei granulociti neutrofili e nel siero. Possono essere, inoltre, dosati altri componenti proteici dei granuli dei neutrofili: la lipocalina (presente solo nei neutrofili), l'elastasi ed il lisozima (presenti, come la MPO, anche nei monociti/macrofagi), la lactoferrina (prodotta anche da molte ghiandole sierose).

Di particolare interesse appare un nuovo test immunoenzimatico (CAST) per il dosaggio dei sulfidoleucotrieni, mediante un anticorpo monoclonale in grado di svelare non soltanto LTC₄, ma anche LTD₄ e LTE₄, con eguale sensibilità e specificità, prodotti dai leucociti del sangue del paziente in esame dopo stimolazione *in vitro* con l'allergene sospetto. Deve essere ricordato che, mentre l'istamina ed altri mediatori sono preformati in vari elementi cellulari, per cui la loro liberazione può avvenire anche passivamente in seguito a distruzione cellulare, dando luogo ad eventuali false positività, i leucotrieni sono sintetizzati attivamente *de novo*, per cui non vi è il rischio di falsi risultati positivi (v. LEUCOTRIENI*).

Sempre a proposito dei sulfidoleucotrieni, il dosaggio di LTE₄ escreto con le urine costituisce un buon marker di attivazione del metabolismo dell'acido arachidonico (ad esempio, aumenta dopo *challenge* con ASA nei soggetti aspirina-intolleranti).

È stato poi proposto recentemente un test *in vitro* (PART: PAF Acether Release Test) per la valutazione della liberazione di PAF da sospensioni leucocitarie del paziente in presenza di opportune concentrazioni dell'allergene (v. PIATRINE, XI, 1893).

Si possono studiare, inoltre, vari marker del collagene: propeptide N-terminale del collagene di tipo III (PIINP), propeptide C-terminale del collagene di tipo I (PICP), propeptide N-terminale del collagene di tipo I (PINP), collagene di tipo IV (NC1 antigen), escrezione urinaria di idrossiprolina.

Altri test *in vitro*, per la diagnostica delle allergopatie non IgE-mediate, comprendono la ricerca di anticorpi precipitanti (utile per la diagnosi etiologica dell'asma bronchiale da sensibilizzazione ad aspergilli o ad altri miceti e delle pneumopatie da ipersensibilità) ed il test di emoaagglutinazione passiva con emazie sensibilizzate all'allergene sospetto (nelle immunocitopenie da farmaci), mentre scarsamente impiegati sono i test di trasformazione linfoblastica o di inibizione della migrazione macrofagica in presenza dell'allergene specifico. Non sufficientemente affidabili sono alcuni test di citotossicità, che si basano su variazioni di numero o di volume di varie popolazioni cellulari (piastrine, granulociti, etc.) su un campione di sangue, dopo lisi delle emazie e dopo incubazione con l'allergene sospetto.

Recentemente sono stati introdotti in commercio, soprattutto ai fini di ricerca scientifica, test EIA in fase solida per dosare alcune citochine (v.***) nel siero, nel liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) ed in altri liquidi biologici e nei sovranatanti di colture cellulari, così come per mezzo di anticorpi monoclonali anti-citochine è possibile lo studio del contenuto citochinico di vari elementi cellulari. Negli asmatici in fase acuta si riscontrano, nel BAL, notevoli aumenti dei livelli di varie citochine, soprattutto di tipo Th2 (IL-4, IL-5, TNF- α , GM-CSF, etc.), come conseguenza di un'attivazione delle cellule T, dei macrofagi alveolari e di vari altri elementi cellulari. Reperti analoghi si riscontrano nel liquido di lavaggio nasale dei soggetti con rinite allergica e nella cute di pazienti con dermatite atopica.

Di notevole interesse, sempre a fini di ricerca, appare la determinazione delle frazioni solubili di alcune molecole di adesione (v. ADESIONE, MOLECOLE DI**), i cui livelli si ritrovano aumentati nelle fasi acute delle sindromi allergiche: sICAM-1 (Soluble Inter-Cellular Adhesion Molecule), sVCAM-1 (Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule), sELAM-1 (Soluble Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule). Queste molecole di adesione vengono, infatti, dismesse («shedded») dall'epitelio, per cui la loro presenza nel siero od in altri liquidi biologici (lacrime, secreto nasale, etc.) può essere utilizzata come marker indiretto di immunoflogosi.

Nel complesso, la situazione attuale della diagnostica delle malattie allergiche deve ritenersi soddisfacente soltanto per quanto riguarda la diagnostica etiologica delle allergopatie respiratorie IgE-mediate, prodotte da allergeni da inalazione, che costituiscono, comunque, almeno i 2/3 delle sindromi allergiche che si riscontrano nella pratica clinica quotidiana, e, per quanto concerne le reazioni non IgE-mediate, delle dermatiti da contatto.

Sussistono ancora, invece, alcune problematiche relative alla diagnostica dell'allergia alimentare (per l'ancora scarsa caratterizzazione degli allergeni alimentari impiegati nei test diagnostici) e dell'allergia a farmaci (per la pressoché totale indisponibilità di metaboliti attivi dei farmaci). Assolutamente insoddisfacente deve ritenersi, inoltre, la situazione attuale della diagnostica etiologica delle sindromi allergiche non IgE-mediate (con l'eccezione, sopra ricordata, delle dermatiti da contatto) e delle reazioni pseudo-allergiche, che pur si riscontrano con discreta frequenza.

Un reale progresso potrà aversi soltanto, in questi settori, con l'impiego di allergeni ben caratterizzati e standar-

dizzati. Ciò è particolarmente urgente ed importante per gli allergeni alimentari, così come è importante poter disporre, ai fini della diagnostica etiologica delle reazioni da ipersensibilità ai medicinali, dei metaboliti attivi dei farmaci.

Notevoli progressi potranno derivare, invece, dalla semplificazione dei test di provocazione, seguiti non soltanto dall'osservazione clinica delle eventuali variazioni sintomatologiche e di alcuni parametri obiettivi, bensì dallo studio citologico ed immunochimico delle secrezioni o dei liquidi di lavaggio. È auspicabile, comunque, l'introduzione di test *in vitro* analoghi ai test di provocazione *in vivo*, semplici, sicuri ed affidabili, che consentano, anche nelle sindromi non IgE-mediate e nelle reazioni pseudo-allergiche, di accertare l'agente responsabile.

V. anche: ALLERGIA**; ASMA BRONCHIALE*; ASMA BRONCHIALE**.

IMMUNODIAGNOSTICA NELLE SINDROMI DA IMMUNODEFICIENZA

Come è noto, le sindromi da immunodeficienza sono forme morbose diverse, caratterizzate da una compromissione, più o meno estesa, delle risposte immuni, specifiche od aspecifiche, dell'organismo.

Le forme *primitive*, congenite, possono riguardare una esclusiva o preminente compromissione dell'immunità umorale (agammaglobulinemie o meglio ipogammaglobulinemie, con deficit globale di tutte le classi immunoglobuliniche, ovvero disgammaglobulinemie, con deficit di una o più classi immunoglobuliniche) o cellulare (sindrome di DiGeorge) o di entrambe; possono esservi, inoltre, varie sindromi da compromissione della chemiotassi e della fagocitosi e sindromi da deficit complementari primitivi (ad esempio, deficit di C1INH, cioè dell'inibitore di C1) (v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]; v. anche MALATTIE AUTOIMMUNI [IX, 178-179]; v.**).

Le forme *secondarie*, acquisite, si possono distinguere in ipogammaglobulinemie (da perdite massicce di proteine o da mancato apporto proteico), disgammaglobulinemie (come nel plasmocitoma, in cui vi è un aumento omogeneo di una sola classe immunoglobulinica) e sindromi da compromissione secondaria dell'immunità cellulo-mediata (come nel linfoma di Hodgkin, nella sarcoidosi e nella lebbra lepromatosa). Una particolare forma di immunodeficienza acquisita è rappresentata dall'AIDS, in cui il retrovirus (v.*; v.**), responsabile (HIV) penetra nei linfociti CD4, dando luogo ad un grave deficit dell'immunità cellulare (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.; v.*; v.**]).

Le indagini diagnostiche di I livello comprendono tutte le metodiche generali di studio dell'immunità umorale e cellulare, riportate in precedenza.

Le indagini diagnostiche di II livello, effettuabili con tecniche complesse e talora molto sofisticate, richiedono una valutazione approfondita delle varie popolazioni e sottopopolazioni cellulari, uno studio completo della risposta linfocitaria *in vitro* e della reattività cellulo-mediata *in vivo* e *in vitro*, il dosaggio di citochine (v.***) ed eventuali dosaggi enzimatici, nonché indagini biotiche (midollari, linfonodali, intestinali, etc.).

Ad es., nell'AIDS, oltre alla ricerca di anticorpi sierici anti-HIV, debbono essere ricercate varie anomalie immunologiche caratteristiche: a) diminuzione dei linfociti CD4, che può divenire estremamente spiccata nelle fasi avanzate della malattia; b) riduzione od inversione del rapporto CD4/CD8; c) riduzione della risposta proliferativa dei linfociti, dopo stimolazione con mitogeni o con antigeni di-

versi; d) diminuzione delle risposte cutanee con antigeni di richiamo; e) aumento policlonale delle immunoglobuline, soprattutto delle IgG e delle IgA negli adulti e delle IgM nei bambini (questa ipergammaglobulinemia, che sembra paradossale, risulta spiegabile con il fatto che alcune sottopopolazioni di linfociti ad attività «helper» non sono colpite o sono addirittura proporzionalmente aumentate); f) presenza di immunocomplessi circolanti (nel 30-80% dei casi); g) riscontro di fenomeni disregolativi dei monociti/macrofagi, delle cellule NK e dei polimorfonucleati; h) presenza di autoanticorpi (incostante); i) ridotta sintesi di IL-2; l) ridotta produzione di α - e γ -interferone (mentre si riscontra spesso un α -IFN acido-resistente, analogo a quello spesso riscontrabile nel LES ed in altre connettiviti); m) aumento dei livelli sierici di α_1 -timosina, cui fa riscontro una netta diminuzione del fattore timico circolante; n) aumento dei livelli sierici di alcuni marcatori aspecifici di infezione (lisozima, β_2 -microglobulina, etc.), nonché dei livelli urinari di neopterinina (indice di un'attivazione del sistema delle citochine).

IMMUNODIAGNOSTICA NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

Le indagini diagnostiche di I livello comprendono essenzialmente la ricerca di autoanticorpi rivolti verso costituenti normali dell'organismo, mentre le indagini di II livello debbono essere volte alla precisazione dei meccanismi patogenetici operanti nella malattia in esame e del suo stato di attività, nonché all'individuazione di eventuali significative alterazioni del sistema immunitario, ai fini di un più sicuro orientamento diagnostico e di un adeguato trattamento terapeutico. Si dovranno ricercare, pertanto, altri autoanticorpi di meno frequente riscontro, con il loro monitoraggio nelle fasi attive e di remissione della malattia, eventuali immunocomplessi circolanti e meccanismi di immunità cellulare (ADCC: *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*; v. XV, 838; *5566; *6674; *7344); infine, indagini immunocitochimiche potranno essere eseguite in sede di lesione, su frammenti biotici.

Gli *autoanticorpi*, che possono essere ricercati con varie metodiche (RIA, EIA, IF, etc.), possono assumere significati diversi: a) costituire veri e propri *marker* di malattia, con importanza patogenetica oltre che diagnostica, quale documentazione di un meccanismo immunologico sostanzialmente operante in una determinata condizione morbosa; b) intervenire, condizionandone alcuni aspetti clinici o di decorso; c) rappresentare un epifenomeno, di scarso o nessun significato patogenetico.

Un criterio discriminante è, generalmente, rappresentato dall'isotipo e, soprattutto, dal titolo degli autoanticorpi: i titoli più elevati, infatti, si riscontrano generalmente in alcune malattie autoimmuni, organo-specifiche (tiroiditi e gastriti autoimmuni, etc.) o non organo-specifiche (LES ed altre connettiviti, etc.) (tab. XI) (v. MALATTIE AUTOIMMUNI [v.; v.**]).

Una comparsa transitoria di autoanticorpi circolanti, in genere a basso titolo, può intervenire anche in soggetti normali, in condizioni fisiopatologiche diverse (processi infettivi acuti o cronici, neoplasie, vaccinazioni, senescenza, etc.). La presenza costante e persistente di autoanticorpi, invece, può essere considerata espressione di una diatesi autoimmunologica, di una fase preclinica asintomatica di una malattia autoimmune ovvero di una pregressa malattia autoimmune (v. anche ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI [v.; v.*]; MALATTIE AUTOIMMUNI [v.; v.**]).

TAB. XI. MALATTIE AUTOIMMUNI

Malattia	Autoanticorpi
<i>Malattie autoimmuni non organo-specifiche</i>	
Lupus eritematoso sistemico	ANA*, anti-fosfolipidi, anti-antigeni di membrana
Artrite reumatoide	Fattori reumatoidi, anti-RANA
Sclerodermia	ANA*
Dermatomiosite/polimiosite	ANA*
Sindrome di Sjögren	ANA*
Connettivite mista	ANA*, anti-RNP
<i>Malattie autoimmuni organo-specifiche</i>	
Tiroidite di Hashimoto e mixedema primitivo	Anti-tireoglobulina, anti-antigene microsomale, anti-CA2
Anemia perniciosa	Anti-cellule parietali gastriche, anti-fattore intrinseco
Gastrite del fondo (tipo A)	Anti-cellule parietali gastriche
Gastrite del fondo (tipo B)	Anti-cellule della gastrina
Diabete mellito tipo I	Cellule beta pancreatiche
Morbo di Addison primario	Anti-corteccia surrenale
Ipogonadismo primitivo	Anti-spermatozoi, anti-ovaie
Ipoparatiroidismo	Anti-cellule paratiroidi
Ipopituitarismo parziale	Anti-cellule secernenti PRL o GH
Diabete insipido	Anti-cellule ipotalamiche
Colite ulcerosa, morbo di Crohn	Anti-colon
Epatite cronica attiva	Anti-muscolo liscio
Cirrosi biliare primitiva	Anti-mitochondriali
Sindrome di Dressler, sindrome post-pericardiotomia	Anti-fibrocellule muscolari cardiache
Sindrome di Goodpasture	Anti-membrana basale
Pemfigo e pemfigoide	Anti-costituenti cutanei
Vitiligine	Anti-melanociti
<i>Malattie da immunità anti-recettoriale</i>	
Morbo di Basedow	Verso i recettori per il TSH (di tipo stimolante)
Miastenia grave	Verso i recettori per l'acetilcolina (di tipo bloccante)
Insulino-resistenza	Verso i recettori per l'insulina

* Per gli anticorpi antinucleari (ANA), v. tab. XIII.

Autoanticorpi antinucleari

Gli autoanticorpi antinucleari (ANA) costituiscono un gruppo assai ampio di anticorpi rivolti verso diversi antigeni del nucleo cellulare.

Il test citomorfologico per la ricerca delle cellule L.E., che per molti anni è stato l'unico test disponibile, è stato gradualmente sostituito da altre tecniche di ricerca (RIA, EIA, IF, immunodiffusione doppia, controimmunolettroforesi, etc.) degli ANA.

Va rilevato che le tecniche di IF indiretta, su cinetoplasti di flagellati (*Trypanosoma lewisi*, *Crithidia luciliae*, etc.), costituiscono tuttora le metodiche di indagine più sensibili e specifiche. Con l'IF, utilizzando come substrati sezioni crio-statiche di tessuti, si possono osservare 4 differenti aspetti: a) omogeneo, prodotto da ANA rivolti verso il complesso DNA-proteina; b) punteggiato o flocculare (*speckled*), prodotto essenzialmente da anticorpi anti-ENA; c) nucleolare, indotto da anticorpi rivolti verso l'RNA nucleolare; d) periferico, correlabile alla presenza di anticorpi anti-DNA.

Nella tab. XII sono riportati schematicamente i principali ANA, mentre nella tab. XIII sono elencate le correlazioni tra varianti cliniche del LES e ANA. Infine, nella tab. XIV viene riportata la frequenza del riscontro dei vari ANA nelle diverse connettiviti (v. ARTRITE REUMATOIDE [v.; v.*; v.**]; LUPUS EREMATOSO SISTEMICO [v.; v.*]; SHARP, SINDROME DI*).

Anticorpi anti-gammaglobulinici (fattori reumatoidi)

I fattori reumatoidi sono autoanticorpi rivolti specifica-

mente verso determinanti antigenici presenti sul frammento Fc delle IgG (non soltanto autologhe, ma anche omologhe ed eterologhe).

Oltre al classico *fattore reumatoide* (FR), costituito da IgM 19S anti-IgG, esistono altri FR appartenenti ad altre classi immunoglobuliniche (IgG, IgA, IgD ed anche IgE), sempre rivolti contro l'Fc delle IgG.

Esistono poi FR «atipici», che più esattamente andrebbero denominati «fattori anti-gammaglobulinici», rivolti verso determinanti antigenici diversi (anti-catene leggere, anti-Fab, etc.) o reattivi verso IgG trattate con pepsina o con altri enzimi.

L'identificazione dei FR, oltre che con le comuni tecniche di agglutinazione (test al lattice, reazione di Waaler e Rose), viene attualmente effettuata mediante altre tecniche più sensibili (RIA, EIA, IF, immunoadsorbimento, frazionamento su colonna, ultracentrifugazione in gradiente di densità, etc.), che consentono di rilevare FR «atipici», presenti nelle cosiddette «artriti reumatoidi sieronegative» (v. REUMATOIDE FATTORE).

I FR, ad alti titoli e persistenti, sono caratteristici dell'artrite reumatoide (v.; v.*; v.**), ma non sono certamente esclusivi di questa malattia, in quanto si possono riscontrare in varie connettiviti e, sia pure a basso titolo e spesso temporaneamente, in numerose affezioni (malattie immuno-proliferative, epatopatie acute e croniche, infezioni croniche, etc.), oltre che in soggetti apparentemente sani (in particolare, nella senescenza e dopo vaccinazioni).

TAB. XII. PRINCIPALI ANTICORPI ANTINUCLEARI (ANA)

Anticorpi anti-DNA	
Anti-DNA nativo (DS-DNA, a doppia elica o «double-stranded»)	«Marker» sierologici specifici del LES in fase attiva (positivi nel 50-60% in fase di acuzie o di recidiva)
Anti-DNA denaturato (SS-DNA, a singola elica o «single-stranded»)	Presenti non soltanto nel LES, ma anche in altre connettiviti e, a basso titolo, in varie affezioni, immunologiche o non immunologiche
Anticorpi anti-ENA (<i>Extractable Nuclear Antigen</i>)	
Anti-RNP	Rivolti verso le ribonucleoproteine, a titoli elevati sono <i>marker</i> della connettivite mista o sindrome di Sharp (95% dei casi); a titoli inferiori si possono ritrovare nel LES (30-40% dei casi) e, meno frequentemente, nell'artrite reumatoide, nella sindrome di Sjögren e nella sclerodermia
Anti-Sm	Rivolti verso piccole strutture nucleari (<i>Small Nuclear Ribonuclear Proteins</i>), sono assai specifici per il LES, anche se presenti solo in 1/3 dei casi
Anti-SS-A/Ro	Rivolti verso antigeni citoplasmatici (SS-A), si ritrovano frequentemente nella sindrome di Sjögren (60-70% dei casi), ma anche in alcuni casi di LES, soprattutto nel lupus neonatale
Anti-SS-B/La	Rivolti verso antigeni citoplasmatici e nucleari (Ha e SS-B), sono abbastanza specifici per la sindrome di Sjögren (40-60% dei casi), ma si ritrovano anche nel LES (15% dei casi)
Anti-PCNA	Rivolti verso un antigene presente soltanto nei nuclei di cellule in attiva proliferazione (PCNA: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>), si ritrovano quasi esclusivamente nel LES (3% dei casi)
Anti-RANA	Rivolti verso un antigene nucleare (RANA: <i>Rheumatoid Arthritis Nuclear Antigen</i>) presente su linee linfoblastoidi infettate con EBV, si ritrovano nel 90% circa dei casi di artrite reumatoide
Anti-centromero	Rivolti verso antigeni del cinetocoro, sono caratteristici della sclerodermia, soprattutto della sindrome CREST (60% circa dei casi)
Anti-PM-Scl	Rivolti verso proteine nucleari non istoniche, di diverso p.m., sono abbastanza specifici per la sclerodermia e per la dermatomiosite-polimiosite
Anti-Mi1 e Anti-Mi2	Rivolti verso proteine nucleari di diverso p.m., si ritrovano spesso nella dermatomiosite e nelle sindromi da sovrapposizione
Anti-56 kD	Rivolti verso una particella ribonucleoproteica, si ritrovano nell'80-90% dei casi di dermatomiosite-polimiosite e nel 10% circa dei casi di altre connettiviti
Anti-Jo-1	Rivolti verso una ribonucleoproteina citoplasmatica (aminoacil-tRNA/sintetasi), si riscontrano frequentemente nelle polimiositi (18-20% dei casi), soprattutto nelle forme recidivanti e con fibrosi polmonare
Anti-PL-7, Anti-PL-12, Anti-OJ	Rivolti verso altre ribonucleoproteine citoplasmatiche (aminoacil-tRNA/sintetasi), si ritrovano in pochi casi (2-3%) di dermatomiosite-polimiosite
Anti-antigeni nucleolari	Rivolti contro RNA e RNP nucleolari, si ritrovano nel 30-40% dei casi di sclerodermia
Anti-Istomi (H₁, H₂A, H₂, B, H₃, H₄)	Si ritrovano soprattutto nel LES da farmaci

Anticorpi antifosfolipidi

Questi anticorpi, rivolti contro molecole fosfolipidiche (normali costituenti di molte membrane biologiche, citoplasmatiche e nucleari) si ritrovano in varie affezioni morbose.

I più noti sono gli *anticorpi anti-cardiolipina* (anti-CDL, detti anche ACA; v. vol. XIV, 347-348), di classe IgG o IgM, che si repertano in oltre il 90% dei casi di LES (per cui vengono impropriamente definiti «anticoagulanti lupici»: LAC) (v. il POS ERITEMATOSO SISTEMICO*, coll. *4733-4734) e nei quali si può osservare la *sindrome primaria da anticorpi antifosfolipidi* (v. il POS SINDROME PRIMARIA DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI [v.; v.*]), caratterizzata da eventi trombotici, aborti ricorrenti, piastrinopenia, ipertensione polmonare e manifestazioni neurologiche varie. Questi anticorpi riconoscono come antigene la cardiolipina legata ad un co-fattore idrofobico

come un anticoagulante naturale (β_2 -glicoproteina I o apolipoproteina H).

Con minor frequenza ed a titolo meno elevato, anticorpi antifosfolipidi si ritrovano nella miastenia grave, nelle epatiti croniche, nella sindrome di Behçet, in varie malattie neurologiche (sindrome di Guillain-Barré, etc.) ed in alcune malattie infettive (lue, lebbra, leptospirosi, malaria, tubercolosi, etc.) ed autoimmuni (artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, etc.). Questi anti-CDL riconoscono come antigene esclusivamente la cardiolipina, la qual cosa sembra giustificare la minore patogenicità di questi anticorpi.

Come è noto, la cardiolipina è impiegata per la diagnosi sierologica della lue; gli anticorpi anti-CDL erano responsabili delle false positività della reazione di Wassermann, spesso osservabili nel LES ed in altre affezioni (v. SIFILIDE).

TAB. XIII. CORRELAZIONI TRA VARIANTI CLINICHE DEL LES E ANA

Varianti cliniche	Anticorpi
Nefrite lupica	Anti-ds-DNA, anti-RNP, anti-Ma
Encefalopatia lupica	Anti-Sm, anti-istoni
LES con sindrome secca	Anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La
LES con poliosierositi, miositi, sindrome di Raynaud	Anti-RNP, anti-SM
LES neonatale, con blocco atrio-ventricolare	Anti-SS-A/Ro
LES con dermatite da fotosensibilità	Anti-SS-A/Ro
LES con trombosi ricorrenti, aborti ripetuti, sindromi neurologiche	Anti-fosfolipidi
LES da farmaci	Anti-istoni

Altri anticorpi rivolti verso strutture non-organospecifiche

Gli anticorpi anti-mitocondriali (AMA), che si mettono in evidenza con tecniche di IF indiretta e di FC, rappresentano un gruppo eterogeneo, per cui si distinguono almeno 6 tipi diversi di AMA: a) M1, diretti contro la cardiolipina, caratteristici della lue; b) M2, rivolti contro un antigene della membrana mitocondriale interna, ricco in ATPasi, caratteristici della cirrosi biliare primitiva e di altre epatopatie; c) M3, diretti contro antigeni delle membrane mitocondriali privi di ATPasi, che si riscontrano nel LES da farmaci; d) M4, rivolti verso antigeni della membrana mitocondriale interna, spesso riscontrabili nelle epatopatie croniche; e) M5, diretti contro antigeni mitocondriali interni ricchi in cardiolipina, riscontrabili spesso nel LES ed in altre connettiviti, oltre che nelle anemie emolitiche autoimmuni; f) M6, non organo- e non specie-specifici, osservabili in alcuni casi di epatopatie da farmaci.

Gli anticorpi antiribosomali, diretti verso un antigene costituito da RNA e proteine, si possono mettere in evidenza con

tecniche di IF indiretta e si riscontrano frequentemente nel LES ed in altre connettiviti, soprattutto nelle fasi attive di malattia, in particolare quando sia presente un impegno renale.

Gli anticorpi antimuscolo liscio (SMA) reagiscono con differenti antigeni della muscolatura liscia (microfilamenti, microtubuli, filamenti intermedi) che costituiscono il citoscheletro cellulare. Gli SMA, non specie-specifici e quasi esclusivamente IgG, possono essere messi in evidenza con tecniche RIA o EIA ovvero di IF indiretta. Gli anticorpi anti-actina sono specifici per l'epatite cronica attiva; gli anticorpi anti-microtubulina ed anti-filamenti intermedi si riscontrano, invece, in numerose condizioni patologiche (epatiti acute, malattie virali e micoplasmiche acute, etc.).

Gli anticorpi anti-reticolina, anch'essi non organo-specifici, sono diretti contro una struttura complessa, costituita da reticolina, collagene di tipo III ed un componente non collagene. Si tratta generalmente di IgG (più raramente IgM o IgA secrete), che si mettono in evidenza con tecniche RIA o EIA o di IF indiretta su substrati diversi. Si repertano nelle malattie immunologiche dell'apparato digerente (morbo celiaco, enterite regionale, etc.), nella dermatite erpetiforme ed in varie malattie autoimmuni.

Anticorpi anti-tiroidei

Si distinguono vari autoanticorpi.

Anticorpi anti-tireoglobulina (TGA: Thyroglobulin Antigen), rilevabili in gran parte dei casi di tiroidite di Hashimoto e di mixedema primitivo, oltre che in pochi casi di morbo di Basedow.

Anticorpi anti-antigene microsomale (TMA: Thyroid Microsomal Antigen), considerati marker molto sensibili delle tireopatie autoimmuni (l'antigene microsomale è stato recentemente identificato con la perossidasi tiroidea).

Anticorpi anti-secondo antigene della colloide (anti-CA2).

Questi primi tre gruppi di anticorpi attivano l'immunità cellulare, scatenando una citotossicità anticorpo-dipendente (ADDC) (v. ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI*; v. anche XV, 838; *5566; *6674; *7344).

Anticorpi verso il recettore per il TSH (Thyroid Stimulating Hormone), di cui sono attualmente noti vari tipi, rivolti verso differenti epitopi del TSH-R:

TAB. XIV. ANTICORPI ANTINUCLEARI (ANA) NELLE CONNETTIVITI

Malattia	Autoanticorpi	% di frequenza
Lupus eritematoso sistemico (LES)	Anti-ds-DNA Anti-Sm Anti-Ma Anti-PCNA Anti-istoni	60-70% (fasi attive) 30-35% 20% 5-10% 90-100% (LES da farmaci)
Artrite reumatoide	Anti-RANA Anti-antigeni nucl. granulocitari	80-90% 30-50%
Sindrome di Sjögren	Anti-SS-A/Ro Anti-SS-B/La	60-70% 50-60%
Sclerodermia	Anti-nucleolari Anti-Scl Anti-centromero	20-40% 15-40% 20-30% (60% nella sindrome CREST)
Dermatomiosite-Polmiosite	Anti-Jo1 Anti-PM1 Anti-Ku Anti-Mi1, anti-Mi2	25-30% 80-90%* 50-95%* 15-55%*
Connettivite mista (sindrome di Sharp)	Anti-RNP	95-100%

* Nelle sindromi da sovrapposizione

a) *anticorpi tiro-stimolanti* (*Thyroid Stimulating Antibodies*), responsabili dell'ipertiroidismo dei pazienti con morbo di Basedow (v. BASEDOW, MORBO [v.; v.*]);

b) *TSH-Binding Inhibiting Antibodies* (TBIAb), capaci di bloccare il legame del TSH al proprio recettore, ma non di stimolare il recettore stesso, che si riscontrano in alcuni casi di ipotiroidismo, anche neonatale (v. IPERTIROIDISMO E IPOTIROIDISMO, *ipotiroidismo*; TIROIDITI);

c) *Thyroid Growth Immunoglobulins* (TGI), responsabili della crescita delle cellule tiroidee e, quindi, della formazione del gozzo, implicati non soltanto nella patogenesi del gozzo basedowiano ma anche di alcuni casi di gozzo semplice (gozzo autoimmune) (v. GOZZI);

d) *Thyroid Growth Inhibiting Immunoglobulins* (TGI), forse implicati in alcuni casi di ipotiroidismo congenito.

Per quanto concerne le tecniche di rilevazione, vengono usate metodiche di IF indiretta (aspetto di tipo flocculare per gli anticorpi anti-tireoglobulina, di tipo citoplasmatico per quelli anti-microsomale e di tipo omogeneo per gli anti-CA2), RIA o EIA.

Anticorpi anti-cellule parietali gastriche, anti-fattore intrinseco e anti-cellule produttrici gastrina

Questi autoanticorpi, organo-specifici ma non specie-specifici, vengono messi in evidenza essenzialmente con tecniche di IF indiretta, RIA o EIA.

Gli *anticorpi anti-cellule parietali gastriche* (CPA), generalmente di classe IgG e spesso fissanti il complemento, sono diretti verso la H⁺-K⁺-ATPasi gastrica, cioè la pompa protonica. Essi si ritrovano nella quasi totalità dei casi di gastriti atrofiche del fondo.

Gli *anticorpi anti-fattore intrinseco* (FI), generalmente IgG, che si riscontrano quasi nel 100% dei casi di anemia perniziosa, sono distinguibili in due tipi: a) tipo I, bloccante, diretto contro un determinante antigenico posto in corrispondenza del sito di combinazione del fattore intrinseco con la vitamina B₁₂; b) tipo II, precipitante, in grado di legarsi direttamente al fattore intrinseco isolato o al complesso fattore intrinseco-vitamina B₁₂.

Gli *anticorpi anti-cellule produttrici gastrina*, sempre IgG e fissanti il complemento, sono presenti nel 10-20% dei casi di gastrite atrofica dell'antro (v. GASTRITI; STOMACO).

Anticorpi anti-insule pancreatiche

Questi autoanticorpi, sempre di classe IgG, rilevabili con tecniche di IF indiretta o con altre metodiche (immunoprecipitazione, *immunoblotting*, etc.), sono caratteristici del diabete giovanile insulino-dipendente di tipo I; la loro presenza può precedere di mesi o anni l'insorgenza della malattia diabetica, mentre assai di rado si riscontrano a distanza di 5 o più anni dalla diagnosi (v. DIABETE MELLITO**).

Si possono distinguere:

a) *ICA* (*Islet Cell Antibodies*), non fissanti il complemento, che reagiscono contro tutte le cellule insulari, anche se l'esatta natura dell'autoantigene è ancora imprecisata;

b) *CF-ICA* (*Complement-Fixing ICA*), fissanti il complemento e dotati di maggiore specificità.

Questi anticorpi possono fungere da «mediatori» del diabete mellito, in quanto possono attivare l'immunità cellulo-mediata, luogo a reazioni citotossiche anticorpo-mediate (ADCC).

Sono stati inoltre identificati altri autoantigeni associati al diabete mellito di tipo I, tra cui ricordiamo:

a) *insulina*, secreta dalle cellule β . Anticorpi anti-insulina si riscontrano nel 10-20% circa dei casi dei soggetti con diabete mellito di recente insorgenza;

b) *antigene 64 kD/GAD* (decarbossilasi dell'acido glutammico): gli anticorpi specifici sono rilevabili in circa l'80% dei soggetti con diabete preclinico;

c) *frammenti 37 kD/40 kD* dell'antigene di 64 kD (non della GAD), i cui anticorpi specifici rivestono un significato predittivo analogo a quello dei precedenti;

d) *proteina 38 kD*, i cui autoanticorpi specifici si riscontrano nel 30% circa dei soggetti con diabete di recente insorgenza;

e) *proteina 52 kD* (identificata come carbosipeptidasi H): gli autoanticorpi specifici si repertano nel 5-20% dei casi di diabete preclinico.

Anticorpi rivolti contro elementi cellulari del sangue

Gli *autoanticorpi anti-emia*, che si riscontrano nelle anemie emolitiche autoimmuni, si possono distinguere in *agglutinine*, complete od incomplete (queste ultime si possono mettere in evidenza con il test di Coombs), ed in *emolisine* (v. AGGLUTININE; ANEMIE, *anemie emolitiche* [v.; v.*; coll. *357-362]; COOMBS, REAZIONE DI; EMOLISI; SANGUE, *metodiche immunoematologiche*; SANGUE, *immunoematologia*).

Inoltre, a seconda del diverso optimum termico nelle reazioni sierologiche, si distinguono *anticorpi caldi* (agglutinine incomplete, generalmente IgG, con optimum termico a 37 °C) ed *anticorpi freddi* (emolisine e agglutinine complete, sempre di tipo IgM, che presentano un optimum termico a 4-10 °C e, comunque, a temperature inferiori a 30 °C; v. AGGLUTININE FREDDI). Unica per le sue caratteristiche è l'*emolisina bifasica*, in cui l'adsorbimento alle emazie avviene solo a freddo, mentre l'emolisi avviene a caldo, sempre in presenza di complemento (v. EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA [v.; v.**]).

Gli anticorpi caldi sono generalmente diretti verso antigeni del sistema Rh o del sistema Lewis; quelli freddi, invece, sono frequentemente dotati di attività anti-I od anti-Sp; l'emolisina bifasica è dotata di specificità anti-P (v. SANGUIGNI GRUPPI [v.; v.*]).

Gli *anticorpi anti-piastrinici*, in genere IgG, sono diretti verso vari antigeni piastrinici (GP Ib, IIb, IIIa, IX, etc.) e possono essere messi in evidenza con vari metodi immunologici (RIA, EIA, test di Steffen o di consumo dell'antiglobulina, etc.) o biologici (v. TROMBOCITOPENIE; PORPORE).

Gli *anticorpi anti-leucocitari* (*leucoagglutinine*), generalmente IgG, sono diretti verso vari antigeni della membrana leucocitaria (NA1, NA2, NB1, etc.) e possono essere dimostrati con la combinazione di varie metodiche, immunologiche (RIA, EIA, IF, etc.) o biologiche (v. AGRANULOCITOSI [v.; v.*]; LEUCOCITOSI E LEUCOPENIE; IMMUNODEFICIENZE*; SANGUE, *neutropenie autoimmuni*).

Esistono, poi, *anticorpi diretti contro le cellule staminali emopoietiche* ovvero verso fattori di crescita emopoietica, ad es. verso l'eritropoietina (Casadevall et al., 1996).

Altri anticorpi organo- o tessuto-specifici

Per quanto riguarda gli *anticorpi anti-cellule ipofisarie*, gli *anticorpi anti-cellule produttrici di prolattina* (PRL; v. IPOFISI*) si ritrovano, con tecniche di doppia IF, nel 20% circa dei pazienti affetti da ipocalcemia idiopatica e da vari deficit ipofisari, oltre che in casi isolati di altre endocrinopatie autoimmuni. Sono stati anche rilevati *anticorpi anti-cellule produttrici di ormone della crescita* (HGH), in casi isolati di sindrome di Turner (v. TURNER, SINDROME DI) e di altri deficit della crescita.

Anticorpi anti-spermatozoi, rilevabili con tecniche RIA o EIA o con metodiche di agglutinazione e di immobilizzazione, si repertano nei casi di infertilità immunologica (v. SPERMA [XIV, 683-684]; MALATTIE AUTOIMMUNI [IX, 172-173]).

In merito agli anticorpi anti-ovaio, con tecniche di IF indiretta nel siero di donne infertili si possono riscontrare anticorpi anti-zona pellucida, mentre in donne affette da morbo di Addison con disfunzioni ovariche precoci si possono repertare anticorpi anti-cellule produttrici di steroidi (follicoli, teca interna, corpo luteo) (v. ADDISON, MORBO DI [v.; v.*]).

Anticorpi anti-surrene sono documentabili nel 50% circa dei pazienti affetti da ipocorticosurrenalismo idiopatico, mentre anticorpi anti-paratiroidi si riscontrano in numerosi casi di ipoparatiroidismo idiopatico (v. IPERSURRENALISMO E IPOSURRENALISMO; IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO).

Per quanto concerne gli anticorpi anti-cuore, si riscontrano frequentemente anticorpi anti-fibrocellule muscolari nella sindrome di Dressler (v. DRESSLER, SINDROME DI), nella sindrome post-pericardiotomia ed anche nell'infarto miocardico ed anticorpi anti-tessuto di conduzione cardiaco nel 10% circa dei pazienti affetti da blocchi di conduzione.

Anticorpi anti-colon sono presenti in molti casi di enteropatie immunologiche, mentre anticorpi anti-antigeni della membrana epatocitaria (LSP: *Liver Specific Protein*, LMA: *Liver Membrane Antigen*) si ritrovano frequentemente nelle epatiti croniche autoimmuni, nella cirrosi biliare primitiva, nelle epatopatie croniche alcoliche e virali (v. CIRROSI EPATICA* [col. 1591]; EPATITE CRONICA*).

Anticorpi anti-membrana basale glomerulare si osservano nella sindrome di Goodpasture. Essi cross-reagiscono parzialmente con le membrane basali dei tubuli renali (per cui si riscontrano anche in alcune nefropatie tubulo-interstiziali) e degli alveoli polmonari (v. GOODPASTURE, SINDROME DI).

In merito agli anticorpi anti-costituenti cutanei, si distinguono anticorpi del pemfigo (rivolti verso una glicoproteina della sostanza intercellulare dell'epidermide e dell'epitelio squamoso), anticorpi del pemfigoide (diretti contro un antigene della membrana basale) ed anticorpi anti-melanociti (presenti in molti casi di vitiligine associata a varie affezioni autoimmuni) (v. PEMFIGO [v.; v.**]; VITILIGINE).

Infine, anticorpi verso antigeni uveo-retinici e lenticolari sono di frequente riscontro nell'uveite facioanafilattica e nell'oftalmia simpatica (v. UVEITI, XV, 1559-1560), ma possono ritrovarsi anche in altre affezioni dell'uvea e della retina.

Anticorpi anti-mielina, rivolti in particolare contro una glicoproteina associata alla mielina (GAM), si ritrovano nella sclerosi multipla, ma anche in altre malattie neurologiche e, sia pure a basso titolo, in individui apparentemente sani (v. SCLEROSI A PLACCHE DISSEMINATE [v.; v.**]).

V. anche ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI [v.; v.*].

Anticorpi anti-recettori

Gli anticorpi anti-recettori dell'insulina si riscontrano frequentemente in casi di diabete mellito (v.**), insulino-resistente, spesso in associazione ad *acanthosis nigricans* (v.) di tipo B, pur in assenza di una patologia correlata.

Gli anticorpi anti-recettori dell'acetilcolina (anti-AchR) si ritrovano in almeno l'85% dei pazienti con miastenia grave, spesso con una significativa correlazione tra comparsa di tali anticorpi ed esordio delle manifestazioni cliniche (v. MIASTENIA [v.; v.*]).

IMMUNODIAGNOSTICA NELLE REAZIONI ISOIMMUNI

Come è ben noto, la tipizzazione gruppo-ematica è fondamentale, ai fini diagnostici, per le trasfusioni di sangue (v. SANGUIGNI GRUPPI [v.; v.*]; TRASFUSIONI [v.; v.**]), così come in medicina legale, dove può essere eseguita l'identificazione del DNA (v. IDENTIFICAZIONE*, coll. *3580-3585; INGEGNERIA GENETICA*; SONDE MOLECOLARI [v.; v.**]).

Nella malattia emolitica del neonato, dovuta ad incompatibilità materno-fetale nell'ambito del sistema Rh, si ritrovano, in genere, isoanticorpi anti-D, appartenenti alla classe IgG, incompleti e di tipo caldo. Sono, invece, eccezionali i casi di isoimmunizzazione ad altri antigeni del sistema Rh o di altri sistemi antigenici eritrocitari (v. EMOLITICA MALATTIA DEL NEONATO).

Numerose indagini immunologiche (tipizzazione HLA, colture linfocitarie miste, etc.) si richiedono, inoltre, per la selezione dei soggetti compatibili ai trapianti di organo e per il monitoraggio delle fasi post-trapianto (v. ISTOCOMPATIBILITÀ [v.; v.*]; TRAPIANTI [v.; v.*]).

IMMUNODIAGNOSTICA IN ONCOLOGIA

Gli antigeni tumore-associati (TAA: *Tumor-Associated Antigens* o TATA: *Tumor-Associated Transplantation Antigens*; v. TUMORI*), possono essere distinti in tre categorie:

a) TAA di classe I, assenti nei tessuti normali e verosimilmente correlati ai fattori cancerogeni e/o al processo di trasformazione neoplastica. Essi possono essere «privati», cioè presenti esclusivamente in un determinato tipo di neoplasia, ovvero «pubblici», presenti in più neoplasie dello stesso tipo ovvero indotti dallo stesso agente cancerogeno;

b) TAA di classe II, a debole e sporadica attività crociata con antigeni dei tessuti normali;

c) TAA di classe III, riscontrabili anche in tessuti normali. Rientrano in questo gruppo gli antigeni oncofetali (CEA: antigene carcino-embrionale; α -FP: α -fetoproteina, etc.), presenti nelle cellule fetali ed assenti nelle normali cellule differenziate dell'adulto, ma che possono essere nuovamente espressi nei tessuti neoplastici (v. ONCOFETALI ANTIGENI [v.; v.*]).

Il CEA è prodotto dalle cellule dell'epitelio colonnare di vari tessuti fetali (intestino, epitelio bronchiale, etc.) ed ha un'emivita variabile da 6 a 60 giorni. Livelli sierici molto elevati di CEA (> 20 ng/ml, rispetto ai valori normali di 0-5 ng/ml) si osservano nel 70-90% dei casi di carcinoma del pancreas, del colon-retto e del polmone e nel 40-65% dei casi di carcinomi mammari ed urogenitali. Aumenti più modesti (< 10 ng/ml) si riscontrano nei tumori benigni ed anche in affezioni non neoplastiche (cirrosi epatica, retto-colite ulcerosa, broncopneumopatie croniche, etc.).

L' α -FP, prodotta dal sacco vitellino e dagli epatociti fetali, ha un'emivita breve (4-6 giorni). Elevati livelli, superiori a 500 ng/ml (valori normali: 0-10 ng/ml), si riscontrano nel 10-20% di carcinomi epatocellulari, urogenitali, del pancreas, dell'apparato gastro-enterico e dei bronchi; va rilevato, comunque, che lievi aumenti dell' α -FTP si osservano in gravidanza ed in varie epatopatie non neoplastiche.

La citocheratina 19 è una delle 20 citocheratine finora identificate, che possono divenire marker circolanti, in quanto i processi di proliferazione e necrosi che accompagnano le neoplasie maligne liberano frammenti solubili di citocheratina, che possono raggiungere elevate concentrazioni nel siero ed in altri liquidi biologici. Una tecnica EIA (CYFRA 21-1) permette di dosare questi frammenti solubili, espressi particolarmente dall'epitelio respiratorio; valori molto elevati si riscontrano nelle neoplasie polmonari maligne, soprattutto nelle forme squamose, e nelle neoplasie della mammella.

Si tende, comunque, attualmente all'identificazione di antigeni tumore-specifici (TSA: *Tumor Specific Antigens*), rilevabili con tecniche RIA o EIA che usino anticorpi monoclonali.

L'antigene carboidratico CA 19-9 viene riconosciuto da anticorpi monoclonali di topo immunizzato con linee cellulari di carcinoma umano del colon-retto; viene, pertanto, anche denominato antigene del carcinoma gastro-intestinale

(GICA: *Gastro-Intestinal Cancer Antigen*). Valori estremamente elevati di CA 19-9, fino a 50.000 U/ml (valori normali: < 37 U/ml), si riscontrano nel 90% circa di carcinoma pancreatico, della colecisti e delle vie biliari e nel 20% circa dei carcinomi ovarici e bronchiali, mentre lievi aumenti, non superiori a 100 U/ml, si possono riscontrare nella colelitiasi, nella cirrosi epatica e nella pancreatite acuta.

L'antigene carboidratico CA 15-3 viene identificato da anticorpi monoclonali rivolti verso un antigene di membrana di una linea cellulare di carcinoma mammario in fase di metastatizzazione. Un aumento del CA 15-3 (valori normali: < 30 U/ml) si riscontra nel 20% circa dei casi di carcinoma mammario, anche se può essere rilevato in casi di carcinomi ad altra localizzazione; invece, il CA 15-3 è caratterizzato da una buona specificità nei confronti delle affezioni mammarie benigne.

L'antigene carboidratico CA 125 è definito da un monoclonale rivolto contro cellule di tumore epiteliale delle ovaie. Valori elevati di CA 125 (valori normali: < 35 U/ml) si rilevano in presenza di carcinoma ovarico ed in altri carcinomi dell'apparato genitale femminile o ad altra localizzazione.

L'antigene carboidratico CA 72-4 è una glicoproteina mucinosa tumore-associata (TAG 72), i cui valori soglia nel siero sono di 3-4 mg/ml. Il CA 72-4 appare dotato di alta specificità per il carcinoma gastrico e per il carcinoma mucinoso ovarico.

L'antigene del carcinoma cellulare squamoso (SCC) è riconosciuto da anticorpi monoclonali diretti verso una glicoproteina isolata da cellule epiteliali di carcinoma della cervice uterina. Un aumento di SCC si rileva nei carcinomi della cervice, ma anche in altri carcinomi (polmonari, linguali, etc.).

Per un'elencazione completa degli antigeni tumore-associati e tumore-specifici, v. ONCOFETALI ANTIGENI*; v. anche TUMORI*.

Il dosaggio contemporaneo dei vari antigeni tumorali deve essere associato al dosaggio di altri marker tumorali, che comprendono: a) marcatori genetici (oncogeni e loro prodotti: v. ONCOGENI E PROTONCOGENI**); b) marcatori di superficie (glicoproteine, fibronectine, etc.); c) marcatori citoplasmatici (enzimi, quali la fosfatasi acida prostatica; ormoni ectopici, quali quelli prodotti dai tumori endocrini gastro-pancreatici, etc.).

Al momento attuale, nel complesso l'immunodiagnostica delle neoplasie solide riveste un valore piuttosto modesto, per la scarsa specificità e sensibilità dei vari test, che possono fornire, comunque, utili informazioni per una migliore valutazione dell'evoluzione della neoplasia e degli effetti dei vari trattamenti, medici o chirurgici. In particolare, l'immunodiagnostica trova la sua principale indicazione per il monitoraggio del decorso post-operatorio, in quanto i livelli tendono a normalizzarsi entro poche settimane dall'intervento chirurgico di rimozione della neoplasia, mentre un successivo aumento dei livelli indica generalmente una recidiva della malattia neoplastica.

Per quanto riguarda, invece, le malattie neoplastiche del sistema emopoietico (leucemie, linfomi, etc.), che sono nella quasi totalità monoclonali, la loro caratterizzazione immunologica è attualmente fondamentale, anche per la scelta di un adeguato protocollo terapeutico (v. LEUCEMIE [v. v.*; v. v.*]; v. v.*; v. v.*).

Una nuova applicazione degli anticorpi rivolti verso antigeni tumorali specifici consiste nel loro impiego come radio traccianti mediante l'impiego di anticorpi monoclonali radio marcati. La radioimmuno scintigrafia (v. SCINTIGRAFIA [v. v.*]; v. v.*; RADIOIMMUNO SCINTIGRAFIA**), che avrà certamente un notevole sviluppo futuro, può consentire, infatti, di visualizzare *in vivo* le lesioni neoplastiche e le metastasi

ALTRE APPLICAZIONI DELL'IMMUNODIAGNOSTICA

Alcune metodiche immunodiagnostiche, come quelle RIA ed EIA, per la loro estrema sensibilità, vengono comunemente impiegate per la rilevazione o per il dosaggio di analiti diversi (ormoni, enzimi, vitamine, farmaci e loro metaboliti, etc.), utilizzando anticorpi specificamente diretti verso di essi (v. RADIOIMMUNOLOGIA [v. v.*]).

In patologia clinica, ad esempio, metodiche immunodiagnostiche, soprattutto EIA o RIA, sono sempre più impiegate per il dosaggio di enzimi (fosfatasi alcalina e acida, β -galattosidasi, glutation-transferasi, perossidasi, ureasi, etc.), di ormoni (quasi tutti gli ormoni proteici), di vitamine (vitamina B₁₂, acido folico, etc.), di mediatori (istamina, serotonina, prostaglandine, leucotrieni, citochine, etc.).

In farmacologia sperimentale e clinica le tecniche RIA e EIA sono fondamentali per studi di farmacodinamica e di farmacocinetica dei vari medicinali, nonché per il monitoraggio di alcuni trattamenti terapeutici (dosaggi della teofilinemia, della digossinemia, etc.), quando vi siano rischi di sovradosaggio o sospetti di alterazioni della farmacocinetica per variazioni nell'assorbimento o nell'eliminazione ovvero per interazione tra farmaci.

In tossicologia ed in medicina legale le metodiche immunodiagnostiche vengono impiegate per il rilievo, anche *post-mortem*, di sostanze stupefacenti (dosaggi dei livelli sierici della morfina, etc.), di mediatori (ad es., nei casi di morte improvvisa il reperto di alti livelli di triptasi è indicativo di uno shock anafilattico), di veleni e di altre sostanze tossiche (ad es., micotossine).

Per studi di biologia cellulare e molecolare, infine, le tecniche RIA e EIA sono indispensabili. Basti ricordare l'impiego di anticorpi rivolti verso isoforme dell'actina e verso proteine dell'actina, proteine calcio-associate (calmodulina, calcineurina, etc.), citocheratine, proteine associate ai microtubuli, proteine della matrice extracellulare (vari tipi di collagene, fibronectina, laminina, vitronectina, etc.), molecole di adesione, *heat shock proteins*, neurotrasmettitori (VIP, sostanza P ed altre neurochine, etc.), peptidi ed enzimi coinvolti nella trasduzione dei segnali (proteinchinasi C, etc.), endorfine, etc.

Tra le tecniche immunodiagnostiche più recenti, ricordiamo l'ibridazione *in vitro* con fluorescenza (FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*).

Bibliografia

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. eds., *Immunologie*, 1996, Huber, Bern.
- Barnells R. M. R., *Principles and interpretation of laboratory tests for allergy*, in Kay A. B. ed., *Allergy and allergic diseases*, 1997, Blackwell Science, Oxford, p. 997.
- Bonomo L. ed., *Immunologia clinica*, 1992, UTET, Torino.
- Burlina A. ed., *Medicina di laboratorio. Fondamenti di diagnostica*, 1992, C. G. Ediz. Med. Scient., Torino.
- Burlina A. ed., *Medicina di laboratorio. Principi di tecnologia*, 1994, C. G. Ediz. Med. Scient., Torino.
- Casadevall N. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334** (10), 630.
- Charpin J., Vervloet D. eds., *Allergologie*, 3 ed., 1992, Flammarion, Paris.
- Colvin R. B., Bhan A. K., McCluskey R. T. eds., *Diagnostic immunopathology*, 2 ed., 1994, Raven Press, New York.
- Errigo E., *Malattie allergiche. Etiopatogenesi, diagnostica e terapia*, 1994, Lombardo Ed., Roma.
- Errigo E., Bonini S., Adriani E. et al., in *Atti XVII Congr. Naz. Soc. It. Allergol. Immunol. Clin.*, 1985, OIC Med Press, Milano, p. 571.
- Harlow E., Lane D. eds., *Antibodies: A laboratory manual*, 1988, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- Lachmann P. J., Peters D. K., Rosen F. L., Walport M. J. eds., *Clinical aspects of immunology*, 5 ed., 1993, Blackwell, Oxford.
- Leitch A. R. et al. eds., *In situ hybridization*, 1994, Bios, Oxford.
- Masseyeff R. F. ed., *Methods of immunological analysis*, 1993, VCH, Weinheim.
- Muddleton F. Jr., Reed C. E., Ellis E. F. et al. eds., *Allergy. Principles and practice*, 4 ed., 1993, Mosby, St. Louis.

- Pasquinelli F. ed., *Diagnostica e tecniche di laboratorio*, 3. Aggiornamento su argomenti di chimica clinica e di immunologia, 1992, Rosini, Firenze.
- Patterson R. ed., *Allergic diseases: Diagnosis and treatment*, 4 ed., 1993, Lippincott, Philadelphia.
- Price C. P., Newman D. J. eds., *Principles and practice of immunology*, 1991, Stockton Press, New York.
- Ricci M., Rossi O., Matucci A., *Argomenti di allergologia ed immunologia clinica*, 1996, UCB Pharma, Torino.
- Rott I. M., Brostoff J., Male D. K. eds., *Immunology*, 4 ed., 1995, Gower, London.
- Romagnani S., Caligaris Cappio F. eds., *Immunologia clinica e allergologia*, 1991, UTET, Torino.
- Romagnani S., Moretta L. eds., *Immunologia e immunopatologia*, 1989, ISI-S, Firenze.
- Samter M., Talmage D. W., Rose B. et al. eds., *Immunological diseases*, 1989, Little, Brown & Co., New York.
- Serafini U. ed., *Immunologia clinica ed allergologia* (II ed.), 1982, ISI-S, Firenze.
- Società Italiana di Allergologia e Immunologia Clinica, *Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin.*, 1992, 2, 351.
- Staffa C., *L'automazione in allergologia*, Guida pratica Immulite, 1997, 2, 4.
- Stites D. B., Terr A. I. eds., *Basic and clinical immunology*, 7 ed., 1991, Appleton & Lange, East Norwalk.

IMMANUELE FERRIGO

IMMUNOGENETICA [v. Agg. I, coll. *3646-3650]

SOMMARIO

Controllo genetico delle malattie a base immunologica (col. 2713). - **Identificazione di geni di malattia con i metodi della genetica inversa (reverse genetics)** (col. 2714). - **Il sistema HLA: struttura e polimorfismo** (col. 2716). - **Genetica dell'allergia e dell'asma bronchiale** (col. 2717). - **Genetica delle immunodeficienze primarie o primitive** (col. 2718).

Controllo genetico delle malattie a base immunologica

Molte malattie a base immunologica hanno una componente genetica. In alcuni casi, come nelle immunodeficienze primarie, i fattori di rischio genetico hanno un ruolo predominante nella patogenesi, e il fenotipo di malattia è strettamente associato con la presenza di anomalie (ad es. mutazioni, delezioni) in un singolo locus e con l'assenza o la funzionalità ridotta della proteina codificata. In altri casi, come nelle malattie autoimmuni associate con alleli HLA di classe I o II, il rischio genetico consiste in una maggiore suscettibilità alla malattia e non è associato con evidenti anomalie funzionali delle proteine codificate.

L'immunogenetica si propone di identificare i geni che regolano la risposta immunitaria e di definire le anomalie di struttura o di espressione che sono responsabili di determinate patologie.

Le proteine che partecipano ai complessi meccanismi molecolari e cellulari della risposta immunitaria sono numerose. Schematicamente si possono distinguere: a) *proteine responsabili del riconoscimento dell'antigene o di suoi frammenti peptidici* (molecole di classe I e di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità, *Major Histocompatibility Complex*, MHC e, nell'uomo, *Human leukocyte antigen*, HLA) (v. HLA*; HLA**; ISTOCOMPATIBILITÀ*) (per es. i recettori antigene-specifici dei linfociti T [*T Cell Receptors*, TCR]; v. IMMUNITÀ**); e le immunoglobuline [IgG]); b) *proteine che partecipano ai processi di endocitosi, trasporto intracellulare e processamento dell'antigene* da parte delle cellule capaci di presentare l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) (per es. le peptidasi dei proteosomi che degradano gli antigeni proteici e le proteine LMP e TAP che intervengono nel trasporto dei peptidi dai proteosomi al reticolo endoplasmatico); c) *proteine responsabili della trasmissione di segnali per lo sviluppo e l'attivazione dei linfociti* (per es. le linfochine; v. CHEMOCHINE**; CITOCHINE**; INTERLEUCHINE [v.*; v.**]); d) *proteine recettoriali di membrana* che hanno affinità di legame per fattori solubili e/o

mediante interazioni cellulari (ad es. recettori per immunoglobuline [v.*] o per interleuchine [v.**], antigeni di membrana dei linfociti [v.**], molecole di adesione [v. ADESIONE, MOLECOLE DI**]).

Accanto ai geni strutturali che codificano per le proteine elencate, sono importanti i *geni regolatori* che regolano l'espressione dei geni strutturali interagendo con *fattori di trascrizione*, o *coattivatori della trascrizione* (proteine che direttamente o in complessi si legano a brevi sequenze geniche, ad es. i geni della famiglia di proteine RFX coinvolti nella regolazione della trascrizione dei geni HLA di classe II).

Un capitolo dell'immunogenetica è dedicato all'identificazione dei *polimorfismi genetici* di alcune proteine espresse sulla superficie cellulare, come gli antigeni di istocompatibilità e gli antigeni dei gruppi sanguigni. A causa del grande polimorfismo di queste proteine nella popolazione, il sistema immunitario di un singolo individuo non diventa tollerante alle varianti non espresse dal suo patrimonio genetico e le riconosce come antigeni *non self*. Dal punto di vista dell'immunopatologia la discriminazione tra le varianti è molto importante per prevenire fenomeni come il rigetto dei trapianti e l'incompatibilità materno-fetale.

Identificazione di geni di malattia con i metodi della genetica inversa (reverse genetics)

Negli ultimi cinque anni la comprensione più dettagliata dei meccanismi cellulari e molecolari della risposta immunitaria e la disponibilità delle tecnologie ad alta risoluzione del DNA ricombinante hanno rivoluzionato il modo di affrontare il problema del contributo genetico alle patologie umane. Fino a tempi recenti, per identificare i geni associati con una malattia (*geni di malattia*) era necessario partire dalla conoscenza di anomalie di carattere fenotipico (ad es. una proteina espressa in eccesso o in difetto o con anomalie di struttura e/o funzione). Solo disponendo di queste informazioni ci si poteva porre il problema di individuare il cromosoma (mediante la tecnica della ibridizzazione somatica uomo-topo) e in alcuni casi, (ad es. in presenza di alterazioni grossolane come traslocazioni-delezioni) il *gruppo di linkage* (regione a bassa frequenza di ricombinazione) del gene codificante (cioè *mappare* il gene). Oggi la disponibilità delle tecnologie del DNA ricombinante permette l'analisi diretta della sequenza di DNA. Da questa tecnologia deriva il concetto di *genetica inversa* (*reverse genetics*; v. GENETICA MEDICA*). La genetica inversa è caratterizzata da un approccio all'identificazione dei geni di malattie che parte direttamente da una analisi a livello genomico e non necessita di informazioni o ipotesi sulle proteine o sui meccanismi coinvolti (anche se queste informazioni facilitano molto il compito).

Oggi disponiamo di una conoscenza dettagliata del genoma umano (v.**). Un lavoro paziente, basato sull'uso della tecnologia della reazione a catena della polimerasi (*polymerase chain reaction*; PCR [v.*; v.**]), permette di determinare la sequenza di segmenti predeterminati di DNA, e di allineare *marcatori* che definiscono numerosi gruppi di *linkage* lungo il DNA genomico. Questi marcatori identificano brevi sequenze di DNA polimorfe (cioè che frequentemente differiscono tra individui). Un tipo di marcatori molto usato è rappresentato dai microsatelliti, sequenze disperse lungo tutti i cromosomi (se ne conoscono attualmente più di 150), rappresentate da doppiette di basi ripetute un numero variabile di volte (il polimorfismo consiste nella variazione del numero di ripetizioni, intorno a 25). Importante è anche la conoscenza di geni di altre specie che, per omologia di sequenza con i corrispondenti geni umani, possono essere usati per ottenere sonde specifiche.

Schematicamente, la mappatura di un gene di malattia richiede le operazioni seguenti: a) identificazione di marca-

tori cromosomici che definiscano un gruppo di *linkage*; b) analisi di sequenza comparativa tra individui sani e malati che può essere condotta sistematicamente nella regione identificata (se abbastanza corta) o selettivamente in un *locus* che codifichi per un gene noto e presumibilmente coinvolto (*locus candidato*); c) individuato un gene che presenti anomalie nei malati, deduzione della sequenza lineare della proteina codificata che, se ignota, viene paragonata con sequenze di proteine umane e di altre specie contenute in banche dati computerizzate per formulare ipotesi sulla funzione; d) analisi della espressione e/o funzione della proteina naturale (se disponibile) o ricombinante (codificata da cDNA) in individui sani e malati.

In pratica si distinguono due strategie, non mutualmente esclusive. In assenza di informazioni sui meccanismi presumibilmente responsabili della malattia e di ipotesi sui geni coinvolti si usa il *clonaggio posizionale* (*positional cloning*; [v. CLONAGGIO POSIZIONALE**]), che parte da un'analisi sistematica della trasmissione di marcatori cromosomici in famiglie con componenti malati, con lo scopo di identificare marcatori trasmessi ereditariamente con la malattia e di circoscrivere così la regione in cui cercare il gene di malattia. Se si dispone già di una ipotesi e di un gene candidato si usa il *clonaggio di funzione* (*functional cloning*). Alla ricerca sistematica di un marcatore trasmesso con la malattia si sostituisce la ricerca della posizione del gene candidato: a questo scopo si usano sonde specifiche, ad esempio ottenute da cDNA di geni omologhi di altre specie. Avendo identificato con la sonda (eventualmente usando cromosomi artificiali costruiti nel lievito che contengono lunghi segmenti di DNA; YAC, *Yeast Artificial Chromosome*) il segmento di cromosoma che contiene il gene di interesse, si procede alla verifica dell'ipotesi con l'analisi comparativa di sequenza tra sani e malati. È evidente che la possibilità di usare il clonaggio di funzione, complessivamente più conveniente, aumenta con il numero di geni conosciuti. Esempi di clonaggio di funzione e di clonaggio posizionale sono riportati nella voce sulle immunodeficienze (v.**) a proposito della agammaglobulinemia di Bruton.

La mappatura di geni di malattia è relativamente semplice nel caso di malattie controllate da singoli geni e quando l'influenza di fattori ambientali è limitata, ad esempio nel caso di immunodeficienze primarie legate al cromosoma X (lo stato aploide di questo cromosoma nei maschi e la presenza di numerose delezioni e traslocazioni facilita ulteriormente l'analisi). Tuttavia, i fattori causali della maggior parte delle malattie sono sia genetici che ambientali e/o fisiologici. Inoltre il controllo genetico è spesso poligenico. Infine, per molte malattie, la definizione clinica raggruppa categorie geneticamente eterogenee, in cui a sintomatologie apparentemente simili corrispondono alterazioni a livello di meccanismi cellulari e molecolari differenti. Nel loro insieme, questi fattori riducono la *penetranza* dei geni coinvolti (la *penetranza* è rappresentata dalla proporzione di malati tra gli individui con il genotipo di malattia) e sono alla base di controversie e di contrapposizioni tra ipotesi talvolta solo apparentemente contrastanti.

Se l'identificazione di geni di malattia, dal punto di vista delle conoscenze di base, è solo un passo importante per arrivare alla conoscenza delle molecole e dei meccanismi implicati, dal punto di vista applicativo permette di elaborare metodiche finalizzate alla diagnosi e alla terapia (diagnosi prenatale, diagnosi molecolare precoce, identificazione di portatori sani e, in alcuni casi, terapia genica). È importante sottolineare che la possibilità di ottenere informazioni dettagliate sul patrimonio genetico di un individuo ha sollevato importanti problemi etici sul grado del singolo individuo alla conoscenza e non conoscenza e all'uso di tali informazioni.

Il sistema HLA: struttura e polimorfismo

Delle tre famiglie di proteine che partecipano al riconoscimento dell'antigene, quella delle immunoglobuline e quella dei recettori dei linfociti T sono codificate da un repertorio di geni la cui diversità è essenzialmente generata da meccanismi somatici. Il controllo genetico sul riconoscimento immunitario è quindi esercitato principalmente dal sistema MHC. Il sistema MHC controlla essenzialmente la risposta dei linfociti T. Questo controllo viene esercitato in due momenti cruciali della risposta immunitaria: a) nel timo, dove attraverso meccanismi non completamente noti, avviene l'eliminazione dei cloni con TCR che riconoscono molecole *self* (*selezione negativa*) e la selezione dei cloni che migreranno in periferia e saranno disponibili per la risposta immunitaria (*selezione positiva* che ha come conseguenza la *restrizione MHC della risposta dei linfociti T*); b) negli organi linfoidi, nella fase di presentazione dell'antigene ai linfociti T da parte delle APC (*Antigen Presenting Cell*; v. IMMUNOGENETICA*; IMMUNITÀ**). Questa funzione di controllo dipende dalla capacità delle molecole di classe I e di classe II di legare selettivamente peptidi, formando un complesso che viene presentato dalle APC al TCR e dal fatto che, nel loro insieme, i peptidi che sono potenziali ligandi per ciascuna forma allelica formano repertori diversi. Il grande polimorfismo degli alleli MHC nella popolazione è alla base di differenze individuali ereditabili nella specificità della risposta dei linfociti T. Si ritiene che queste differenze siano alla base del ruolo che determinati alleli di classe I e di classe II svolgono nella predisposizione ad alcune malattie a base immunologica.

Nell'uomo, il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) si trova sul braccio corto del cromosoma 6. Viene tradizionalmente suddiviso in tre classi, ciascuna delle quali contiene diversi *loci* genetici ed è ulteriormente suddivisa in regioni. I geni HLA di classe I e II hanno estese omologie strutturali e rappresentano una famiglia poligenica. Tra i diversi *loci* esiste uno stretto *linkage*: la combinazione di alleli su un singolo cromosoma viene di solito ereditata come una unità e si indica come *aplotipo* (ciascun individuo ha due *aplotipi*; gli alleli sono codominanti). Il grado di polimorfismo di gran parte di questi *loci* è molto alto (ad es. per alcuni *loci* della classe I nella popolazione sono state identificate più di 150 varianti alleliche).

Le proteine HLA di classe I e di classe II sono eterodimeri. La molecola di classe I è formata da una catena pesante (43 kDa) e da un polipeptide di 11 kDa (β_2 -microglobulina) che non è codificato nel sistema maggiore di istocompatibilità. La molecola di classe II è formata da una catena alfa e da una catena beta (34 e 28 kDa, rispettivamente). I geni della classe III codificano proteine direttamente o indirettamente implicate nella risposta immunitaria, come il *Tumor Necrosis Factor* (TNF α e β) e le proteine C2 e C4 del complemento.

La nomenclatura del sistema HLA viene periodicamente aggiornata da un comitato internazionale (*HLA Nomenclature Committee*, sotto gli auspici della *World Health Organization*, WHO). Questo è reso necessario dal continuo aumento del numero di alleli identificati nella popolazione e dal progressivo aumento del potere di risoluzione delle metodiche usate per la tipizzazione. La tipizzazione degli alleli HLA di classe I e di classe II è stata a lungo basata sull'identificazione delle proteine, sfruttando le loro proprietà antigeniche o citotossiche. Tuttavia, a causa delle somiglianze strutturali, del *linkage* tra diversi *loci* e del fatto che alcuni *loci* esprimono una proteina solo in certi *aplotipi* e in altri si comportano come *pseudogeni*, non è sempre facile distinguere varianti alleliche (codificate nello stesso *locus*)

da varianti isotipiche (codificate in *loci* diversi di una famiglia genica). La tipizzazione a livello di DNA ha permesso di chiarire molte questioni irrisolte, ma ha complicato ulteriormente la nomenclatura rivelando nuovi pseudogeni e variazioni nel numero o della grandezza dei *loci* in certe regioni.

Attualmente, la regione HLA di classe I viene suddivisa nei *loci* «classici» HLA-A, HLA-B e HLA-C e nei *loci* «non classici», identificati più di recente, HLA-E, HLA-F e HLA-G (indicati anche come HLA 1b). I *loci* classici codificano per la catena pesante della molecola di classe I. Il gene HLA-C è poco espresso (nel 50-70% della popolazione). Le molecole «non classiche» hanno sequenze simili. La proteina HLA-G è espressa durante la gravidanza su un tessuto della placenta, il citotrofoblasto extravillioso all'interfaccia materno-fetale e sembra che conferisca al trofoblasto la proprietà di resistere alla lisi da parte dei linfociti *natural killer* (NK) dell'endometrio uterino.

La regione di classe II viene suddivisa nelle sottoregioni HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM. Se si considerano solo i *loci* che codificano per proteine, escludendo gli pseudogeni, la regione DR contiene un gene per la catena alfa (DRA1*) e sei loci per la catena beta (DRB1*, DRB3*, DR4*, DRB5*, DRB6*, DRB7*) di cui alcuni si comportano come pseudogeni in certi aplo tipi. Le regioni DQ e DP contengono ciascuna un *locus* per la catena alfa (DQA1* e DPA1*) e un *locus* per la catena beta (DQB1* e DPB1*). I loci DM, che sono stati identificati recentemente, hanno omologie strutturali con i geni di classe II e codificano per una catena A e una catena B: la funzione dell'eterodimero sembra essere quella di facilitare la presentazione dell'antigene da parte delle molecole di classe II. Una eccezione è rappresentata dai *loci* della classe II che codificano le proteine TAP (coinvolte nel trasporto intracellulare dei peptidi processati) e le proteine LPM (che fanno parte del proteasoma, una struttura complessa che partecipa al processamento dell'antigene) che non hanno la struttura delle molecole di classe II.

V. anche: HLA [v.; v.*; v.**].

Genetica dell'allergia e dell'asma bronchiale

L'allergia (v.***) si manifesta con una sintomatologia variabile (rinite, asma, congiuntivite) quando individui geneticamente predisposti vengono esposti a certi antigeni ambientali (allergeni). La componente genetica è poligenica e include il contributo dei geni HLA di classe II. L'associazione tra capacità di rispondere a determinati allergeni e certi alleli HLA di classe II è un esempio del controllo del sistema MHC sulla specificità della risposta immunitaria

(Huang e Marsh, 1993). Recentemente gli approcci della genetica inversa sono stati usati per studiare la genetica dell'atopia (risposta positiva ai test cutanei con allergeni) e dell'iperreattività bronchiale legata all'asma bronchiale (v.**), due fenomeni correlati, ma solo in parte sovrapponibili (Panhuysen *et al.*, 1955; Hayward, 1995). Sono stati individuati *loci candidati* nel cromosoma 5 e nel cromosoma 11. Nella regione q31-q33 del cromosoma 5 si trova un gruppo di geni che codificano per citochine coinvolte nella regolazione di IgE e nell'infiammazione bronchiale associata con l'asma (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13). Due studi di *linkage* (rispettivamente su 11 famiglie americane Amish e su 92 famiglie olandesi) hanno identificato marcatori di questa regione trasmessi ereditariamente con l'asma e/o l'allergia, ma il gene o i geni coinvolti non sono stati ancora identificati. Un ovvio candidato è il gene della interleuchina 4 (IL-4). La presenza di T coadiuvanti (*T helper*, Th) che producono IL-4 e non IFN γ caratterizza la risposta agli allergeni e l'espressione di IL-4 da parte di linfociti T coadiuvanti (*T helper*) è essenziale per iniziare i processi di che portano alla commutazione di classe della catena pesante delle immunoglobuline, alla formazione del gene *epsilon* attivo e alla sintesi di IgE da parte dei linfociti B. Un gruppo di Oxford e, più recentemente, un gruppo australiano, hanno riportato che una regione del cromosoma 11 (11q13) contiene un gene associato con l'atopia e/o con l'asma. In questa regione un gene candidato è quello che codifica per la catena beta del recettore ad alta affinità per le IgE (Fc ϵ RI- β). Tuttavia, sia la natura del gene realmente coinvolto, che il modo di trasmissione ereditaria (per via materna secondo il gruppo di Oxford), che il genotipo coinvolto (asma anche in assenza di atopia secondo il gruppo australiano), sono ancora oggetto di discussione. Marcatori associati con l'allergia sono stati identificati anche in prossimità dei *loci* che codificano per la catena alfa del TCR, sul cromosoma 14. Nel loro insieme, questi studi confermano che l'allergia è controllata, cumulativamente o in modo indipendente, da numerosi geni (Ruffilli e Bonini, 1997).

Genetica delle immunodeficienze primarie o primitive

Le immunodeficienze (v.*; v.***) primarie (tab. I) costituiscono un gruppo di malattie molto gravi, caratterizzate clinicamente ma non etiologicamente. Recentemente sono stati mappati i geni di alcune immunodeficienze legate ad anomalie delle popolazioni linfocitarie B o T o di entrambe (immunodeficienze gravi combinate, *severe combined immunodeficiency*, SCID). In generale, le proteine identificate sono coinvolte nella trasduzione dei segnali necessari per l'attivazione dei linfociti.

TAB. I. I GENI DI ALCUNE IMMUNODEFICIENZE PRIMARIE

Immunodeficienza	Difetto principale	Regione	Proteina
Agammaglobulinemia di Bruton	assenza di linfociti B maturi	Xq22	tirosina chinasi (Btk)
Sindrome da iperIgM	assenza di isotipi diversi da IgM	Xq26	CD40L
SCID legata al cromosoma X	blocco della maturazione dei linfociti T	Xq13	IL-2-R γ
Sindrome di Wiskott-Aldrich	deficienza funzionale dei linfociti T e B	Xp11	fattore di trascrizione
Sindrome linfoproliferativa	gravità delle infezioni da EBV	Xq21-27	sconosciuta
Sindrome dei linfociti nudi	deficienza di molecole HLA di classe II	2q12	fattore di trascrizione
SCID con assenza di CD8	assenza di CD8	16p13	tirosina chinasi (ZAP 70)
SCID da difetto di ADA	deficienza di adenosina-deaminasi	20q12	adenosina-deaminasi

SCID: *Severe combined immunodeficiency*, immunodeficienza grave combinata. Btk: Bruton tirosina-chinasi, CD40L: ligando del CD40; IL-2 γ : catena γ del recettore per l'interleuchina 2, ADA: adenosina-deaminasi.

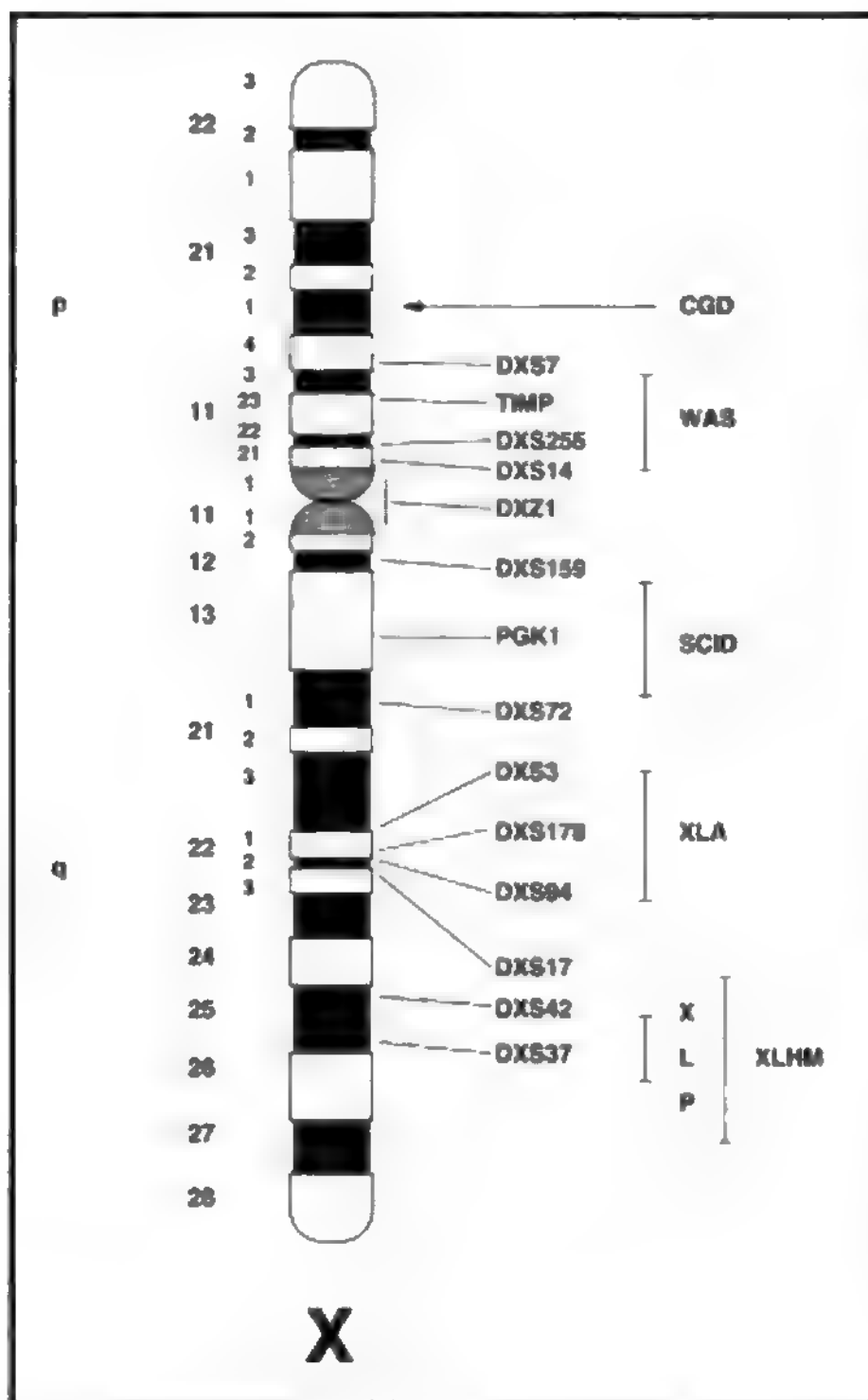


Fig. 1. Localizzazione dei geni delle immunodeficienze legate al cromosoma X. (CGD) malattia granulomatosa cronica; WAS) sindrome di Wiskott-Aldrich; SCID) immunodeficienza grave combinata; XLA) sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X; XLHM) sindrome da iperproduzione di IgM. (Da de Saint Basile e Fischer, 1991, ridisegnata).

Cinque tipi di immunodeficienza si trovano sul cromosoma X (la condizione aploide di questo cromosoma nel maschio facilita l'identificazione del gene coinvolto): l'agammaglobulinemia di Bruton, la sindrome da iperproduzione di IgM (*X-linked hyper IgM syndrome*, HIGM1), l'immunodeficienza grave combinata (*severe combined immunodeficiency*, SCIDX1), la sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X e la sindrome di Wiskott-Aldrich (fig. 1).

Sono autosomiche recessive la sindrome dei linfociti nudi e una forma rara di immunodeficienza grave combinata con difetti a livello della popolazione linfocitaria CD8 e l'immunodeficienza da difetto di adenosina deaminasi (ADA) (Coxley, 1995).

L'agammaglobulinemia congenita di Bruton legata al cromosoma X è caratterizzata dal numero drasticamente ridotto di linfociti B circolanti e dal basso livello o assenza di ogni isotipo di immunoglobuline. Due studi recenti, rispettivamente di un gruppo europeo e di un gruppo americano, hanno portato all'identificazione del gene responsabile di questa malattia in quello che codifica un proteina della famiglia delle tirosina-chinasi, la *tirosina-chinasi* del linfo-

citi B (Btk: *Bruton tyrosine kinase*). Le tirosina-chinasi citoplasmatiche sono proteine coinvolte nella trasduzione del segnale nelle cellule ematopoietiche.

Riportiamo le metodologie usate dai due gruppi di ricerca, per esemplificare la differenza tra la strategia del *clonaggio di posizione* e quella del *clonaggio di funzione*. Il clonaggio posizionale (v.**) è stato utilizzato dal gruppo inglese che, dopo aver analizzato gran parte del cromosoma X, ha identificato un marcatore associato con la malattia nella regione Xq22 (che comprende un segmento di DNA capace di contenere almeno 60 geni). In questa regione, con sonde di cDNA di linfociti B, sono stati selezionati alcuni geni di cui determinare la sequenza. Il paragone di sequenze tra DNA di individui sani e malati ha portato all'identificazione di anomalie nel gene della Btk dei malati. Il clonaggio di funzione è stato utilizzato dal gruppo americano, che è partito immediatamente con l'ipotesi che i geni coinvolti fossero chinasi espresse selettivamente dai linfociti B (*geni candidati*). Questo gruppo ha identificato geni delle chinasi espressi da linfociti B di topo e, usando come sonda cDNA di topo, ha identificato il gene umano omologo nella regione Xq22.

Il meccanismo con cui la deficienza di Btk influenza i processi di maturazione di linfociti B non è chiaro (Kinnon et al., 1993).

L'immunodeficienza da iperproduzione di IgM legata al cromosoma X è una sindrome rara, caratterizzata da aumentata suscettibilità ad infezioni ricorrenti, elevato o normale livello di IgM e basso livello o assenza di immunoglobuline di altri isotipi. Il gene responsabile è stato mappato nella regione Xq26 e successivamente identificato nel gene che codifica l'antigene di membrana CD40-L, una glicoproteina espressa da linfociti T attivati. Il CD40-L interagisce con il CD40 espresso dai linfociti B, trasmettendo un segnale di natura ancora ignota che è essenziale per attivare la commutazione di classe delle immunoglobuline e per salvare i linfociti B da morte programmata (*apoptosi*) dopo i processi di mutazione somatica (Callard et al., 1993).

L'immunodeficienza grave combinata legata al cromosoma X (XSCID) è una malattia congenita rara (1/100.000 nascite), caratterizzata dal blocco precoce della differenziazione dei linfociti T e dei *natural killer* (NK) e da un aumento del numero di linfociti B immaturi. Si tratta di una malattia fatale, la cui unica terapia consiste nel trapianto di midollo. Il gene responsabile si trova nella regione Xq13 e codifica per la catena gamma del recettore dell'interleuchina 2 (IL2-R γ) (che è anche parte del recettore per IL-4, IL-7, IL-9, e IL-15). Per quello che riguarda i meccanismi causali, lavori recenti avanzano l'ipotesi che il difetto di IL-2-R impedisca il corretto processo di ricombinazione somatica che porta alla formazione dei geni della catena beta del TCR.

La sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS) legata al cromosoma X è caratterizzata da anomalie a carico dell'immunità cellulare. Include una serie di fenotipi che vanno dalla presenza di trombocitemia, alla accentuata tendenza a contrarre infezioni, allo sviluppo di sintomatologie autoimmuni, alla presenza di linfomi. Una caratteristica chiave di questa malattia è la mancanza di microvilli formati da filamenti di actina dei linfociti, che appaiono «calvi». Il gene difettoso è stato identificato recentemente mediante clonaggio posizionale nella regione Xp11. Codifica una proteina di 502 aminoacidi (WASP: *Wiskott Aldrich Syndrome Protein*) che non ha omologie con altre proteine ma ha alcune caratteristiche di un fattore di trascrizione. Le anomalie più rilevanti sembrano correlate con le forme più gravi della malattia.

La sindrome linfoproliferativa legata al cromosoma X è una forma di immunodeficienza combinata che si manifesta

in presenza di mononucleosi infettiva, e in generale di infezione primaria da virus di Epstein-Barr (EBV) che, negli individui predisposti, prende una forma gravissima, caratterizzata da una risposta immunitaria autodistruttiva che causa difetti permanenti di immunità umorale e cellulare. La mutazione è stata mappata nella regione Xq21-27 (Share *et al.*, 1989).

La sindrome dei linfociti nudi (BLS, *Bare Lymphocyte Syndrome*) è una rara forma di immunodeficienza combinata, recessiva e autosomica, caratterizzata da deficienza di molecole HLA di classe II. Il gene coinvolto mappa nella regione q12 del cromosoma 2. La malattia sembra dipendere da anomalia del gene che codifica per il fattore di trascrizione CIITA (Reith *et al.*, 1995).

Una forma autosomica recessiva di immunodeficienza grave combinata è caratterizzata da assenza della popolazione linfocitaria CD8. Il gene coinvolto è stato mappato nel cromosoma 16 (p13) e codifica una tirosina-chinasi citoplasmatica, ZAP-70.

L'immunodeficienza grave combinata da difetto di ADA rappresenta il 50% circa delle SCID autosomiche recessive. Tre diversi fenotipi genetici, corrispondenti a tre proteine mutanti, sono stati identificati dal 1968. Il gene è stato mappato sul cromosoma 20 nel 1974 (con la tecnica dell'ibridazione somatica uomo-topo e mappato esattamente nella regione q12 nel 1989).

Per ciascuno dei geni descritti, le anomalie associate con la patogenesi sono diverse nei diversi individui, come è logico attendersi, in quanto i geni di malattie letali possono essere mantenuti nella popolazione solo da nuove mutazioni. In generale, inoltre, una determinata anomalia non è associata con uno specifico fenotipo di malattia (ad es. maggiore o minore gravità), osservazione che suggerisce che il «destino genetico» possa essere modificato da fattori ambientali o fisiologici.

Le conoscenze acquisite sulla natura dei geni di malattia possono essere alla base di metodiche per la diagnosi, la predizione prenatale e l'identificazione di portatori. Nel caso delle immunodeficienze descritte, l'utilizzazione di sonde di DNA per la diagnosi precoce nella popolazione è ostacolata dalla diversità tra individui delle anomalie osservate (ad es. per l'agammaglobulinemia di Bruton sono state identificate almeno 150 tipi di mutazioni). Per la predizione prenatale si possono usare sonde individualizzate. La diagnosi può essere basata in alcuni casi sull'analisi del prodotto genico (ad es.: analisi di attività enzimatica Btk per l'agammaglobulinemia di Bruton; saggio di CD40L con anticorpi monoclonali di topo per l'immunodeficienza da iperproduzione di IgM).

Nel caso di malattie legate al cromosoma X, è possibile identificare le femmine portatrici di mutazioni sfruttando il fatto che nelle cellule femminili uno dei due cromosomi X viene regolarmente, e a caso, inattivato. Nelle popolazioni linfocitarie T e B delle femmine sane il quadro di inattivazione sarà quindi uguale per i due cromosomi X, mentre nelle femmine portatrici di immunodeficienze sarà alterato a favore di uno dei due cromosomi, per la perdita selettiva delle cellule portatrici del cromosoma di malattia attivo durante l'ontogenesi del sistema ematopoietico.

Infine, in alcuni casi, la terapia genica può offrire un'alternativa reale alle cure disponibili. Le prime applicazioni umane della terapia genica (v.*; v.***) sono state effettuate nel 1989 su neonati affetti da immunodeficienza grave combinata dovuta a deficienza di adenosina-deaminasi (ADA) (la deficienza di questo enzima causa l'accumulo di metaboliti tossici della purina d'ATP). Il trattamento con infusioni periodiche dei propri linfociti T corretti per trasfe-

zione con il gene ADA normale inserito in un vettore retrovirale sembra poter ripristinare le risposte anticorpali e di immunità cellulare.

V. anche IMMUNODEFICIENZE (v.; v.*; v.**).

Bibliografia

- Callard R. E., Armitage R. A., Fanslow W. C., Spriggs M. K., *Immunology Today*, 1993, **14**, 559-564.
 Conley M. E., *Immunology Today*, 1995, **16**, 313-315.
 de Saint Basile G., Fischer A., *Immunology Today*, 1991, **12**, 456-460.
 Hayward A., *Lancet*, 1995, **346**, 1243-1245.
 Huang S., Marsh D. G., *Annals Allergy*, 1993, **70**, 347-359.
 Kinnon C., Hinshelwood S., Levinsky R. J., Lovering R. C., *Immunology Today*, 1993, **14**, 554-558.
 McKusick V. A., *Mendelian Inheritance in man*, 1992, The John Hopkins Press, Baltimore.
 Panhuysen C. L., Meyers D. A., Postma D. S., Bleeker E. R., *Allergy*, 1995, **50**, 863-869.
 Reith W., Steimle V., Mach B., *Immunology Today*, 1995, **16**, 539-557.
 Rott L., *Essential Immunology*, 1994, Blackwell Scientific Publications, London.
 Ruffilli A., Bonini S., *Allergy*, 1997, **52**, 256-273.
 Share J. C., Sullivan J. L., Milunsky A., *Hum. Gen.*, 1989, **82**, 349-353.

ANNA RUFFILLI

IMPETIGINE [v. vol. VII, coll. 1683-1686]

Terapia

Nelle forme di impetigine con poche lesioni può essere sufficiente la terapia antibiotica locale (tetraciclina, acido fusidico, bacitracina) applicando la crema più volte al giorno e cercando di facilitare il distacco degli elementi crostosi. Un progresso nella terapia locale si è avuto con la mupirocina (v.*; Bactroban®), che agisce inibendo la isoleucil-transfer-RNA-sintetasi batterica ed è attiva nei confronti sia degli streptococchi che degli stafilococchi senza modificare la flora locale.

Nelle forme con molti elementi o con linfadenopatia o quando si sospetti una etiologia da streptococco nefritogeno (anche se la incidenza di glomerulonefrite post-streptococcica è sensibilmente diminuita negli ultimi decenni) è consigliabile prescrivere anche una terapia con antibiotici per via generale. Nella scelta dell'antibiotico bisogna tenere presente che l'infezione può essere sostenuta da stafilococchi, streptococchi od entrambi e che in questi ultimi anni sarebbero divenute prevalenti le forme stafilococciche, in passato meno frequenti di quelle streptococciche. Sono indicati i macrolidi (eritromicina, josamicina, roxitromicina), le penicilline resistenti alla betalattamasi (dicloxacillina) e le penicilline ad ampio spettro d'azione (amoxicillina associata ad ac. clavulanico, bacampicillina) od eventualmente le cefalosporine orali di seconda generazione.

Anche quando si ritiene opportuno l'uso di un antibiotico per via generale è necessario associare la terapia locale poiché ci si può trovare di fronte a stafilococchi resistenti.

Tenere infine presente che i bambini devono essere allontanati dalla scuola e che è opportuno raccomandare una attenta pulizia delle mani e delle unghie e cambi frequenti della biancheria.

Bibliografia

- Barton L. L., Friedman A. D., *Pediatr. Dermatol.*, 1987, **4**, 185.
 Dubertret L., *Thérapeutique dermatologique*, 1991, Flammarion, Paris.
 Goeffray C., Chosidow O., Revuz J., *Ann. Dermatol. Venercol.*, 1990, **117**, 753.
 Mertz P. M., Marshall D. A., Faglestein W. H. *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 1989, **125**, 1069.

FRANCESCO BASSETTI

SOMMARIO

Introduzione. Concetto di «osteointegrazione» (col. 2723). - **Materiali** (col. 2724). - **Indicazioni** (col. 2725). - **Selezione dei casi e controindicazioni** (col. 2725). - **Esami clinici preliminari** (col. 2726). - **Procedimenti chirurgici per l'impianto** (col. 2727): *Fasi dell'intervento. - Tecnica operatoria ordinaria. - Tecniche chirurgiche speciali.* - **Applicazione della protesi sugli impianti** (col. 2730): *Perni transmucosi («Abu»). - Protesi.* - **Criteri di valutazione dei risultati a distanza** (col. 2733).

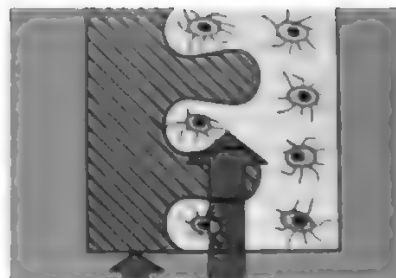
Introduzione. Concetto di «osteointegrazione»

L'implantologia odontoiatrica «osteointegrata», con gli impianti radicolari endosse, rappresenta oggi la tecnica d'elezione per il ripristino estetico e funzionale nell'edentulismo totale o parziale: basti pensare alla sua elevata percentuale di successo, superiore al 95%, per comprenderne il vantaggio rispetto alla protesi tradizionale (Branemark *et al.*, 1977; Adel *et al.*, 1981).

Nel 1969 lo svedese Branemark (dell'Università di Göteborg) postulò su base scientifica quanto andava osservando da oltre dieci anni di studi microvascolari: aveva infatti rilevato che la struttura in titanio della camera ottica, da lui utilizzata in microscopia vitale, veniva spesso incorporata dal tessuto vivente. Questa osservazione incoraggiò il Branemark a trasporre e utilizzare in campo odontoiatrico questa prerogativa del titanio, sviluppandone il «sistema» degli impianti dentali a vite (*fixture*) (fig. 1). I risultati di una lunga sperimentazione, presentati dal Branemark con la sua *équipe* in una «storica» conferenza di Toronto (1982), raccolsero subito ampi consensi.

In seguito si affermò, in questo campo, il concetto di «osteointegrazione», termine introdotto da Albrektsson *et al.* nell'81 per indicare, a livello di microscopia ottica, una «connessione diretta, strutturale e funzionale, fra l'osso vitale e la superficie di impianti sottoposti a carico». L'intimo contatto fra osso e impianto (Albrektsson e Sennerby, 1990) rappresenta un netto progresso rispetto all'incapsulamento fibro-osseo (la cosiddetta «integrazione fibro-ossea»; Weiss, 1986). È ormai diffusamente riconosciuto che l'osteointegrazione costituisce una condizione ben più favorevole, non solo per gli impianti dentali bensì anche per quelli impiegati in altre parti dell'organismo (ad es., per la protesi d'anca). L'approfondimento scientifico su questi aspetti si è protratto fino ai nostri giorni, come risulta fra l'altro da recenti studi ultrastrutturali (Jansen *et al.*, 1990; Brunette *et al.*, 1990), giunti alla conclusione che la «tenuta» della struttura nel tempo è sicuramente condizionata dall'ancoraggio diretto all'osso, senza interposizione di connettivo (figg. 2 e 3). Oggi è accettato che l'interfaccia impianto-ospite, studiata in particolare da Albrektsson *et al.* (1982) e da Albrektsson e Branemark (1983), rappresenti l'equivalente elettronmicroscopico dell'«osteointegrazione», quale contatto diretto fra osso e impianto (fig. 4), con l'unica interposizione di un minimo strato amorfo (circa 100 Å) di proteoglicani e di componenti del collagene (Albrektsson e Jacobsson, 1987).

Fig. 2. Interfaccia titanio-osso.



ne», quale contatto diretto fra osso e impianto (fig. 4), con l'unica interposizione di un minimo strato amorfo (circa 100 Å) di proteoglicani e di componenti del collagene (Albrektsson e Jacobsson, 1987).

Materiali

A fini implantologici sono stati sperimentati i materiali più vari. Tra questi, i più usati sono stati i metalli nobili, le leghe, gli acciai, i materiali al carbonio, le sostanze sintetiche, le ceramiche e le vetro-ceramiche (Albrektsson *et al.*, 1985; Babbush, 1986).

I dati sperimentali hanno chiaramente evidenziato come il titanio, commercialmente puro, per i suoi requisiti sia il materiale da preferire nell'implantologia clinica: infatti sia gli studi istologici che i risultati clinici a lungo termine (Albrektsson *et al.*, 1988) lo accreditano come il materiale ad oggi più affidabile. In questo impiego il titanio si comporta come una ceramica per il suo strato esterno stabile di ossido, che evita il contatto fra gli ioni metallici e l'osso, con cui invece crea un forte legame chimico, non tossico e resistente all'usura. Le caratteristiche peculiari del titanio in implantologia sono, perciò, l'ottima biocompatibilità (Lundström *et al.*, 1983), la non corrosività, una buona resistenza alle sollecitazioni meccaniche e un basso peso specifico.

Gli impianti in porcellana si sono rivelati troppo fragili rispetto alle sollecitazioni masticatorie, mentre altri dispositivi in fosfato di calcio e carbonio hanno offerto risultati promettenti per ora soltanto sul piano clinico-sperimentale (De Groot *et al.*, 1987; Denissen *et al.*, 1990; Gottlander e Albrektsson, 1992).

Gli impianti sono stati utilizzati nelle forme più varie, ma la letteratura fornisce i dati più favorevoli per quelli di tipo cilindrico a vite filettata o su cilindro liscio; altri modelli, a cilindro cavo o conici, hanno dimostrato anch'essi una buona osteointegrazione. Gli impianti cilindrici rispondono per la loro forma a dei requisiti ottimali, che ne spiegano i buoni risultati nel tempo: semplicità d'impiego, inserimento nell'osso poco traumatico e buona distribuzione delle forze trasmesse dal manufatto protesico (Branemark *et al.*, 1977).

Le *fixtures* sono fornite dalle case produttrici in confezioni sigillate e sterili, pronte all'uso. La loro superficie può essere in titanio puro o con rivestimento in plasma di tita-

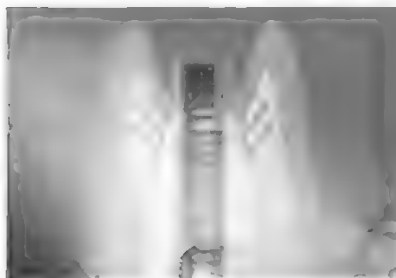


Fig. 1. Schema di *fixture* integrata nell'osso e dei suoi rapporti con i tessuti molli implantari.

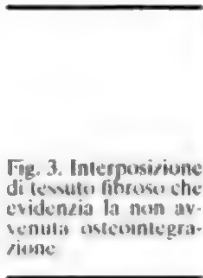
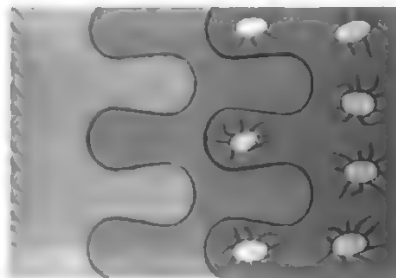


Fig. 3. Interposizione di tessuto fibroso che evidenzia la non avvenuta osteointegrazione.



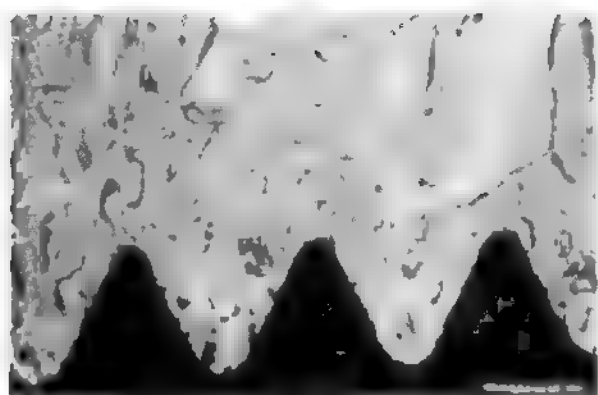


Fig. 4. Osteointegrazione dell'impianto.

nio. (ma in entrambi i casi con strato esterno di ossido di titanio, anticorrosivo) o in idrossiapatite, ma comunque sempre a topografia ruvida in quanto la porzione d'ancoraggio all'osso presenta così una migliore connessione meccanica (Winneberg *et al.*, 1994).

V. anche: MATERIALI DENTARI*; MATERIALI IMPIANTABILI (v.; v.*).

Indicazioni

Gli impianti radicolari osteointegrati, in funzione di pilastri per protesi fisse, sono indicati sia nell'edentulia totale, che in quella parziale (Adell *et al.*, 1992) con mancanza di uno (dente singolo) o più elementi, anche in diversi quadranti orali.

La soluzione protesica tradizionale (ponte fisso) per l'edentulia parziale richiede la riduzione dei denti contigui a monconi-pilastro, per l'ancoraggio del ponte, con evidente danno del patrimonio dentale ancora disponibile (v. PROTESI DENTALE). Sotto questo aspetto le procedure implantari risultano conservative, non richiedendo alcun sacrificio dentario, e anche più funzionali, perché forniscono il ripristino masticatorio ed estetico senza dover sovraccaricare i denti residui, con una più corretta redistribuzione dei carichi occlusali (Langer e Sullivan, 1989).

Nell'edentulia parziale, il sistema implantologico esclude, tra l'altro, gli inevitabili progressivi riassorbimenti ossei causati dalla compressione delle selle edentule durante l'attività orale (masticazione e serramento).

Nell'edentulia totale, l'implantologia osteointegrata rappresenta l'unico modo in cui il paziente può superare gli svantaggi, anche psico-sociali, della protesi totale mobile, spesso gravata da instabilità e funzione insoddisfacente.

Infine, l'implantologia moderna è applicabile anche nei casi estremi di gravi atrofie ossee, frequenti nella mandibola, con problemi anatomici della cresta residua.

Selezione dei casi e controindicazioni

Una scrupolosa selezione dei soggetti da trattare eviterà insuccessi a breve e medio termine. Controindicazioni di carattere odontoiatrico o medico sono individuabili già all'anamnesi e all'esame obiettivo, e vanno dallo stato scheletrico endo-orale alle malattie sistemiche o d'organo di una certa importanza, disturbi della coagulazione risultanti da esami preliminari, malattie debilitanti, problemi psichiatrici o psicologici di rilievo. L'osteoporosi, il diabete e le neoplasie non costituiscono controindicazioni certe, ma sono da valutare caso per caso. La decisione definitiva, tuttavia, sarà rinviata a indagini radiologiche e di laboratorio espletate in via preliminare.

In complesso, possono distinguersi:

a) *controindicazioni locali*: 1) assenza di osso di supporto valido per l'impianto (per eccessiva atrofia o riassorbimento oppure per qualità dell'osso non soddisfacente); 2) scarsa igiene orale del paziente;

b) *controindicazioni generali*: 1) *assolute*: epatite (HBV o HCV) in fase attiva; cirrosi; cardiopatia grave; AIDS; ar-

trite reumatoide attiva; neoplasia o terapia antineoplastica in corso; terapia radiante nei tre anni precedenti; LES in atto; 2) *relative*: HBV senza danno epatico rilevante; cardiopatia lieve; artrite reumatoide o LES in fase quiescente; terapia radiante cessata da più di tre anni senza recidive della malattia; osteoporosi; allergie; diabete compensato (Leghissa *et al.*, 1993).

Esami clinici preliminari

L'anamnesi odontoiatrica valuterà le cause dell'edentulia e i danni provocati da: perdita di denti per carie, con riassorbimenti ossei di solito modesti; malattia parodontale, che può provocare un severo riassorbimento osseo; trauma, che può indurre una notevole riduzione del volume osseo per la perdita della corticale vestibolare.

L'esame obiettivo dovrà valutare: la mancanza di denti e la causa della loro perdita; la posizione di eventuali denti inclusi; la presenza di carie o di otturazioni e il loro stato; la situazione endodontica; eventuali protesi e la loro congruità; eventuali agenesie; lo stato parodontale con la possibile presenza di infiammazione e difetti ossei; eventuali patologie dell'articolazione temporomandibolare (si noti che proprio in questi ultimi pazienti la correzione di eventuali edentulie rappresenta una misura essenziale per il riallineamento del condilo mandibolare [Molina, 1988]).

Nei candidati alla riabilitazione con impianti osteointegrati è di rigore curare le carie, rifare otturazioni e protesi inadeguate, trattare le lesioni endodontiche. Una particolare attenzione va posta nel trattare e risolvere eventuali danni parodontali. Tutta questa terapia profilattica è necessaria anche per ridurre la quantità di flora patogena presente nel cavo orale.

Per la selezione ai fini di un'impianto-protesi occorre eseguire le seguenti *indagini radiologiche* (Pierazzini, 1994):

— per l'edentulia totale, un'ortopantomografia (OPT) e un telecranio;

— per l'edentulia parziale, un'OPT e una serie completa di radiografie endorali, eseguite con tecnica parallela, per valutare la situazione endodontica e parodontale generale.

Inoltre, con l'ausilio delle radiografie è valutabile un dato fondamentale: la *densità ossea*, spia dello stato di mineralizzazione cui è in gran parte legato il successo dell'impianto. Attualmente è in uso una classificazione in quattro gradi di densità ossea (Branemark *et al.*, 1985): classe D1, corticale spessa e densa e piccoli spazi midollari che separano trabecole poco mineralizzate; classe D2, corticale abbastanza spessa, cavità midollari ben evidenti; classe D3, cavità midollari molto ampie, circondate da trabecole sottili e poco mineralizzate, con spongiosa fragile; classe D4, trabecolatura decalcificata, quasi o del tutto scomparsa.

Per un approfondimento preoperatorio, e in particolare per l'edentulia parziale, si è rivelata utile e di facile impiego una mascherina-guida in acrilico (*dima*) ricavata dalla preliminare ricostruzione in cera del caso da trattare (Espinosa Marino *et al.*, 1996). La dima fungerà da guida, prima radiografica e poi chirurgica, per i riferimenti in titanio inseriti in corrispondenza dei siti prescelti d'impianto. Nel posizionare i riferimenti si è ovviamente condizionati dalla topografia delle strutture ossee: per il mascellare superiore, dalle cavità nasali, dai seni mascellari e dal nervo naso-palatin; per l'inferiore, dal decorso del canale mandibolare e dalla posizione del forame mentoniero. Nella fase operatoria, la dima in acrilico, con i suoi riferimenti, permetterà al chirurgo di verificare, durante la fase operativa, la corretta sede e inclinazione delle *fixtures*.

Un attuale strumento di migliore valutazione dello stato locale è lo *scanning dentale* (CTS) (Quyrinen, 1990), particolarmente utile nei casi complessi: ad es., per determinare con sufficiente precisione altezza e larghezza del sito osseo ricevente, o per svelare un'eventuale deiscenza, o per localizzare strutture anatomiche da

non ledere quali il fascio vascolo-nervoso mandibolare, le fosse nasali o il seno mascellare.

Il CTS consente dunque di evidenziare i siti ossei inadeguati agli impianti, dando l'opportunità di conoscere già in fase diagnostica se sarà necessario intervenire con tecniche complementari di ricostruzione, in altezza e larghezza, dell'osso ricevente. Un CTS con software appropriato può offrire le seguenti possibilità: provare lunghezze e tipi diversi d'impianto, per selezionarne il più adatto; studiare l'impianto prescelto ruotandolo e inchinandolo su qualsiasi asse; visualizzare ciascun impianto selezionato e controllarne l'inclinazione in rapporto al carico protesico; prevedere un aumento o un'espansione di cresta già in fase diagnostica e quantizzarne altezza e spessore in rapporto all'impianto selezionato.

Infine, per concludere la fase decisionale e pre-operatoria, vanno eseguiti gli *esami clinici preliminari di routine* (ECG, emocromo completo, quadro emocoagulativo, etc.), per accertare che non esistano pregiudiziali all'intervento.

Procedimenti chirurgici per l'impianto

Fasi dell'intervento

La Scuola svedese, nel suo protocollo operativo, prescrive due fasi chirurgiche:

a) un primo tempo (I fase *chirurgica*), che prevede l'infibulazione della *fixture* nell'osso e la sua copertura con un lembo muco-gengivale, cui si fanno seguire 3-6 mesi in stato di quiete prima che le *fixtures* vengano esposte e sottoposte al carico masticatorio;

b) un secondo tempo (II fase *chirurgico-protesica*), in cui si attua la scoperta dell'impianto e il collegamento con un pilastro transmucoso («abutment»: *Abu*) per ancorarvi la struttura protesica.

Negli anni '70 due Scuole, anche queste europee, quella tedesca di Tübingen e quella svizzera di Berna, introdussero la tecnica degli impianti *non-sommersi*, la quale prevede che la parte transmucosa dell'impianto resti esposta in cavità orale per tutto il tempo dell'osteointegrazione. Questa procedura può essere adottata, dopo un'accurata diagnosi e selezione del caso, in alternativa o a completamento dell'altra (Buser *et al.*, 1990).

Più recentemente sono stati presentati sistemi implantari che, dopo una accurata programmazione chirurgica, possono essere utilizzati seguendo i due diversi protocolli (Buser, 1991a).

Tecnica operatoria ordinaria

La Scuola svedese prevede per la chirurgia implantare un'incisione *vestibolare* a livello della giunzione muco-gengivale e il sollevamento di un lembo a tutto spessore che, denudando l'osso, consenta un'ampia visione del sito ricevente. Altre Scuole considerano più adatta, per la preparazione del campo operatorio, un'incisione sulla gengiva ade-

rente *palatale* ad alcuni millimetri dalla cresta edentula. Altre infine prevedono l'incisione di un lembo a spessore parziale (rispettando il periostio).

Una volta esposto l'osso si possono meglio raffrontare le informazioni diagnostiche e radiografiche e, con la guida di una dima radiografica-chirurgica ricavata dalla ceratura preliminare, preparare la sede implantare, utilizzando una serie di frese di calibro progressivo (fig. 5), fino a ottenere un sito ricevente di diametro lievemente inferiore a quello della *fixture*. Si otterrà così un intimo contatto tra impianto ed osso, con buona stabilità primaria, ed un coagulo in cavità chiusa che consenta una rapida osteointegrazione.

Durante la preparazione della cavità implantare, si eseguono lavaggi di soluzione fisiologica per raffreddare le frese, onde evitare surriscaldamento da attrito, causa di rallentamento dei processi riparativi (Eriksson e Albrektsson, 1983); negli insulti più gravi non si avrà osteointegrazione ma un incapsulamento fibroso dell'impianto. L'incapsulamento fibroso dell'impianto denuncia la mancata guarigione della struttura ossea (Nyman *et al.*, 1990).

L'uso della dima guiderà il chirurgo nel suo lavoro e faciliterà l'inserimento dell'impianto nella posizione e con l'inclinazione stabilite dal protesista (v. sotto: *applicazione della protesi sugli impianti*).

Tecniche chirurgiche speciali

Il successo clinico dell'implantologia ha incoraggiato, nel tempo, l'introduzione di tecniche sempre più avanzate per superare gravi limiti anatomici.

In caso di *riassorbimento estremo delle creste edentule* (Quyrinen *et al.*, 1992) hanno buona percentuale di successo le tecniche d'innesto osseo prelevato dalla cresta iliaca. Un primo metodo contempla l'infibulazione di *fixtures* nel sito donatore (cioè nella cresta iliaca) e, una volta avvenuta l'osteointegrazione, con un altro intervento il prelievo del frammento e l'inserimento nel sito ricevente. Un secondo metodo consiste nel contemporaneo inserimento della *fixture* ad ancorare alla cresta edentula l'osso prelevato (Isaksson, 1996). Un'altra soluzione è quella di praticare una finestra esternamente al seno mascellare, spostare la membrana sinusale ed inserire le *fixtures* alla cresta edentula superiore (che deve avere almeno 4 mm di spessore per assicurare stabilità primaria alle *fixtures*), riempire la cavità delimitata dall'osso e dalla



Fig. 5. Preparazione del sito di impianto con le apposite frese calibrate.



Fig. 6. Espansione di cresta sottile. L'incisione crestale viene approfondita nello spessore osseo in direzione apicale.

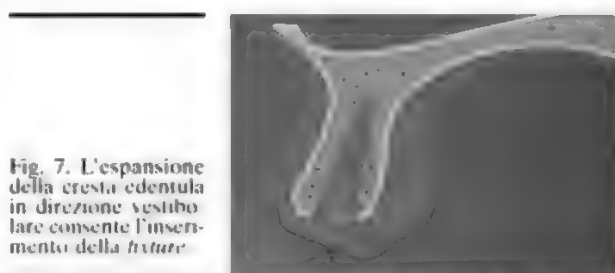
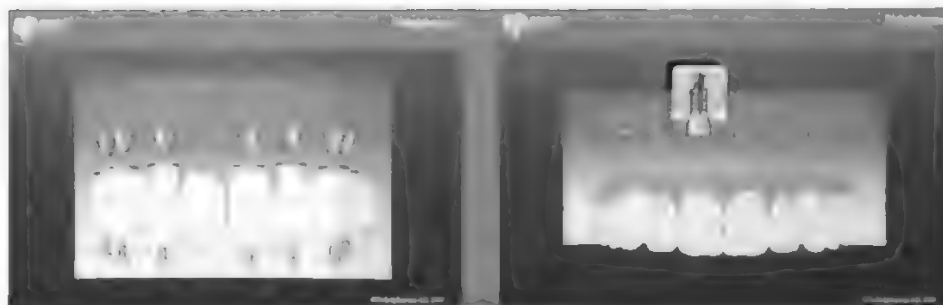


Fig. 7. L'espansione della cresta edentula in direzione vestibolare consente l'inserimento della *fixture*.

Fig. 8. Schema della connessione, con viti, del manufatto protesico con gli *Abu*.



membrana antrale con materiale a effetto osteogenetico (idrossiapatite, corallo, osso), in grado di stimolare il formarsi di nuovo osso attorno alle *fixtures* (Wheeler *et al.*, 1996; Blomqvist e Isaksson, 1996).

La trasposizione del nervo mandibolare è una tecnica poco usata, per il rischio di parestesia: è indicata quando l'altezza della mandibola a partire dal foro mentoniero è inadeguata. Si solleva un lembo mucoso, si espone l'emergenza del nervo dal forame mentoniero e si praticano tanti piccoli fori attorno ad essa per ricongiungerli a cerchio a formare un anello d'osso; si praticano allo stesso modo due linee di fori parallele al decorso del nervo, si distacca in pratica tutta la striscia d'osso che lo ricopre, si sposta il nervo, s'inseriscono nella mandibola le *fixtures* prestabilite e infine si riposiziona il nervo al di sopra delle *fixtures*. L'intervento termina con la sutura del lembo mucoso (Friberg *et al.*, 1992).

In caso di *creste sottili*, si impiega la tecnica dell'*espansione della cresta* (*edentulous ridge expansion*, E.R.E.) quando il suo spessore vestibolo-orale non è sufficiente all'inserzione di impianti. La tecnica consiste nelle seguenti fasi (Bruschi e Scipioni, 1990): sollevare due lembi, uno vestibolare e uno palatale, a spessore parziale per esporre la cresta edentula; *scoprire* due incisioni parallele, transperiostali, nella compagine ossea per ottenere due solchi verticali nel piatto corticale vestibolare, utilizzando un bisturi particolare con funzioni di scalpello; *incidere* la cresta nella sua compagine a formare un solco infraosseo, che si approfondisca 8-10 mm apicalmente (fig. 6); *dislocare* buccalmente, nella sua porzione vestibolare, l'osso con una porzione di spongiosa. Per garantire una buona irrorazione all'osso è fondamentale la salvaguardia del periostio.

Gli impianti vengono inseriti nello spazio osseo ed ancorati apicalmente per creare una adeguata stabilità primaria (fig. 7).

Nei casi di *deiscenze*, o di perdita di parete ossea per trauma o periodontite, è indicata la tecnica di *rigenerazione guidata dei tessuti* (G.T.R.) (Nyman *et al.*, 1990; Aughtun *et al.*, 1996).

Inserito l'impianto, la sua porzione esposta viene coperta da una membrana semipermeabile, allo scopo di ostacolare l'epitelizzazione del difetto osseo e favorire invece la crescita (più lenta) del

nuovo osso; *effetto tenda*. Rispettando i tempi di maturazione ossea si avrà una valida rigenerazione attorno all'impianto. Sono disponibili membrane riassorbibili e non: queste ultime richiedono un rientro chirurgico per la loro asportazione.

Applicazione della protesi sugli impianti

Perni transmucosi (« Abu »)

Connettono le *fixtures* alla protesi. Generalmente vengono anch'essi costruiti in titanio, per l'ottima biocompatibilità. Possono essere «avvitati» o «cementati» e la scelta dipende dal tipo di *fixture* e di protesi.

1. *Perni avvitati*. - Si avvitano alla «femmina» dell'impianto. Possono essere cilindrici, conici o angolati: i cilindrici erano i più usati in passato; i conici consentono protesi più estetiche, per la forma geometrica che meno interferisce con l'anatomia del dente e per la possibilità di collocare il bordo delle capsule sotto la gengiva; gli angolati sono utili per le correzioni assiali delle *fixtures*.

Tutte queste sistematiche prevedono che le viti di ancoraggio del manufatto protesico *all'Abu* emergano occlusalmente. Realizzare una mesostruttura su cui ancorare il ponte consente di escludere le viti passanti occlusalmente come anche di «parallelizzare» *Abu* divergenti; una alternativa importante se gli antagonisti sono denti naturali.

2. *Perni cementati*. - Viene utilizzato il cemento per fissare il pilastro sull'impianto. Sono prefabbricati oppure realizzati in laboratorio, di facile impiego e «parallelizzati» dando loro l'inclinazione voluta. I loro limiti sono nelle difficoltà di cementazione e di controllo dell'adattamento alle *fixtures*.

3. *Tecnica protesica*. - Per trasferire la posizione *Abu* a un modello di laboratorio vengono avvitati i *transfer* agli

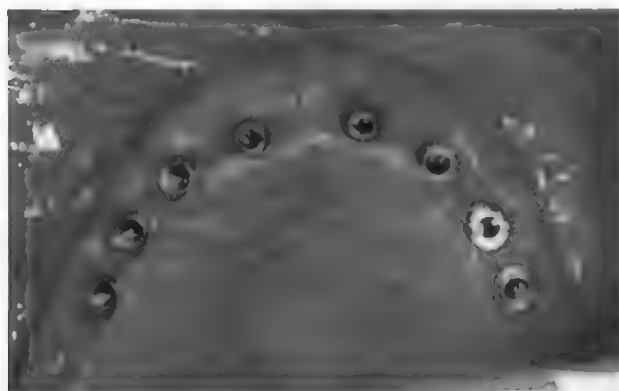


Fig. 9. Edentulo totale, dopo la seconda fase chirurgica e l'avvenuta connessione degli *Abu* alle *fixtures*.

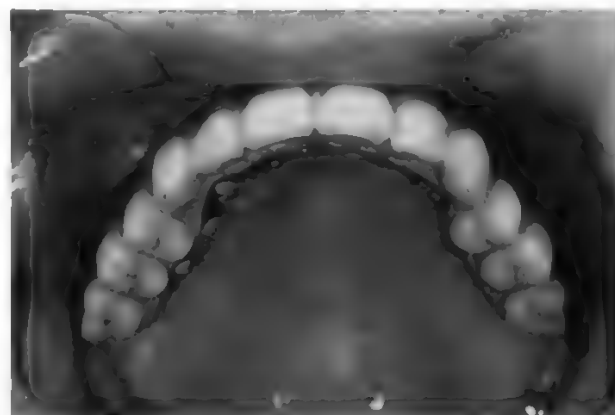


Fig. 10. Visione occlusale della soluzione protesica.



Fig. 11. Risultato estetico funzionale.

Abu, si rileva un'impronta di precisione, si applicano le repliche degli *Abu* ai transfer e si ricava un modello di lavoro in gesso utile a: confezionare una placca con vallo per rilevare la dimensione verticale da trasferire in laboratorio; allestire una prova di estetica sul paziente; realizzare la struttura metallica per controllarne in bocca la precisione e l'adattamento passivo.

Una volta applicata in bocca la ricostruzione definitiva, vanno eseguiti i controlli fondamentali quali l'accesso alle manovre igieniche e la perfetta occlusione, a garanzia di una lunga durata.

Protesi

1. *Nell'edentulia totale* (figg. 8-11). - Nei pazienti con edentulia totale si utilizzerà come guida per il piano di trattamento la protesi che il paziente usa, purché ad una verifica clinica ed alle prove fonetico-funzionali si possano rilevare una corretta dimensione verticale ed una giusta posizione dei denti. Se priva di questi requisiti, la protesi mobile dovrà essere rifatta onde evitare che possa scatenare delle parafunzioni, come serramento o bruxismo che, in particolare nella prima fase seguente l'inserzione delle *fixtures*, potrebbero trasmettere, attraverso le mucose, delle pressioni o dei micromovimenti ed interferire con l'osteointegrazione delle *fixtures*.

Nei pazienti con modesta atrofia ossea è possibile ripri-

stinare una funzione e un'estetica valide con un ponte in metallo-ceramica ancorato alle *fixtures*, con un comfort simile a quello di una ricostruzione fissa su monconi naturali.

Protesi fissa «ibrida». Nei pazienti con marcata perdita di tessuto osteo-mucoso, con ponte fisso su impianti, è possibile ripristinare la funzione e migliorare l'estetica ricostruendo con resina o porcellana rosa la gengiva persa, apportando così anche più sostegno alle labbra.

«Overdenture». Con tale termine (in pratica: «sopradentiera») s'intende una *protesi rimovibile*, quale soluzione intermedia (obbligata) fra una dentiera mobile e un impianto (Jemt *et al.*, 1996). È un'ottima soluzione per pazienti con gravi riassorbimenti crestali, che necessitano di un supporto labiale protesico: in questi casi, l'*overdenture*, con il suo bordo vestibolare, può ripristinare il sostegno e dare tono al viso. Questa *overdenture* può essere facilmente rimossa ed essere quindi particolarmente idonea per quei pazienti che abbiano difficoltà a mantenere una corretta igiene orale. Le possibilità di ancoraggio sono molteplici; le soluzioni più usate consistono in barre o attacchi a pallina fissati agli *Abu* su cui andrà ad ancorarsi la protesi.

Quando un estremo riassorbimento crestale non consente l'infilazione di poche *fixtures*, è possibile ancorare e stabilizzare validamente una protesi con due sole *fixtures* (Versteegh *et al.*, 1996) grazie all'impiego di attacchi resilienti, che consentono di realizzare in questi casi un supporto tessutale più o meno ampio.

2. *Nell'edentulia parziale*. - Gli *Abu* di cui disponiamo consentono di collegare i ponti alle *fixtures* con ottimi risultati estetico-funzionali (Jemt e Lekholm, 1994). In caso di realizzazione di protesi avvitata, è possibile scegliere tra *Abu* conici, con diverse emergenze dal profilo gengivale, come tra quelli con minima dimensione verticale. Se si opta per la protesi parziale fissa, cementata agli *Abu*, una delle procedure è la seguente: si connettono alle *fixtures* gli *Abu* del diametro idoneo, si rileva una impronta con gli *Abu* in sito, in laboratorio si ricava dall'impronta un modello di lavoro. Gli *Abu* andranno «parallelizzati» a seconda delle esigenze protesiche, una volta realizzati il provvisorio e la struttura. Durante la stessa seduta potranno essere posizionati al paziente gli *Abu*, verrà provato il corretto adattamento della struttura e rilevata un'impronta di posizione da inviare in laboratorio, verrà posizionato il ponte provvisorio, che il paziente userà per il periodo necessario perché si perfezioni l'osteointegrazione, mentre il tecnico completerà la struttura con il rivestimento di porcellana.

La sostituzione del dente singolo (figg. 12 e 13), suppor-



Fig. 12. Denti singoli. I perni transmucosi (*Abu*) avvitati alle *fixtures* sono ridotti in laboratorio.



Fig. 13. Le singole capsule sono cementate agli *Abu*.

tato da impianti osteointegrati, è sempre più diffusa, incoraggiata anche dai risultati a medio e lungo termine attestati dalla letteratura (Avivi-Arber e Zarb, 1996). Le case produttrici forniscono *fixtures* di forme adeguate ed *Abu* specifici per queste indicazioni, ed anche *fixtures* con dimensioni idonee a distribuire i maggiori carichi molari alla base ossea.

In associazione a tecniche chirurgiche di G.T.R. (v. sopra) ed in particolare in associazione all'E.R.E., nella moderna implantologia, si eliminano o riducono i limiti anatomici, specialmente anteriori, eliminando concavità vestibolari, armonizzando il profilo dei tessuti e l'anatomia emergente della capsula con i denti contigui, esaltando l'estetica ed il risultato funzionale (figg. 11 e 13), rispetto alle soluzioni tradizionali, che non consentono di superare questi limiti.

Criteri di valutazione dei risultati a distanza

Al fine di valutare obiettivamente i risultati dell'osteointegrazione nel tempo, i primi parametri di valutazione — di successo o insuccesso — degli impianti osteointegrati sono stati codificati da Albrektsson *et al.* (1986). In seguito, per superare le diversità di giudizio dipendenti anche dal tipo d'impianto e di tecnica, i criteri sono stati ridefiniti e accettati diffusamente (cfr. Mombelli, 1994). In pratica, i parametri sono i seguenti.

Successo. Per essere giudicati di successo, gli impianti devono presentare questi requisiti: a) assenza di mobilità valutata singolarmente: si considera fallimento primario di una *fixture* la mobilità rilevabile all'atto della seconda fase chirurgica, e fallimento secondario la mobilità ai successivi controlli; b) perdita di osso marginale inferiore a 1,5 mm nel primo anno e inferiore a 0,2 mm negli anni seguenti (Weber *et al.*, 1992); c) assenza di parestesia o dolore.

Sopravvivenza. Sono classificati in questa categoria gli impianti ancora in funzione ma che non corrispondono ai parametri di successo.

Non-valutabile. Si includono in questa classe sia i pazienti che non si siano presentati ai controlli routinari, sia quelli che siano deceduti.

Fallimento. Si applica a quegli impianti che incontrano tutti o alcuni dei criteri specifici di fallimento. Le cause che determinano il fallimento primario di un impianto non sono completamente note, anche se si presume che siano legate al trauma indotto in occasione della preparazione del sito implantare in modo tale da inibire i fattori che favoriscono l'osteointegrazione.

Il fallimento secondario è ascrivibile al sovraccarico occlusale sulle implantoprotesi (Roberts *et al.*, 1984) e/o alle lesioni infiammatorie prodotte dall'attività microbica (Mombelli *et al.*, 1987; Sanz *et al.*, 1990). Queste cause da sole o concomitanti non permettono il completamento dei processi di osteointegrazione.

Bibliografia

- Adell R. *et al.*, *Int. J. Oral Surgery*, 1981, **10**, 387-416.
 Adell R. *et al.*, *Quintessence Int.*, 1992, **3**, 235-247.
 Albrektsson T., *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1981, **52**, 155-170.
 Albrektsson T., Branemark P.-I., *Annals Biomedical Engineering*, 1983, **11**, 1-27.
 Albrektsson T. *et al.*, *Biomaterials*, 1985, **6**, 97-101.
 Albrektsson T. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1986, **1**, 11-25.
 Albrektsson T., Jacobsson J., *J. Prosthetic Dentistry*, 1987, **57**, 597-607.
 Albrektsson T. *et al.*, *J. Periodontology*, 1988, **59**, 287-296.
 Albrektsson T., Sennerby L., *Int. J. Prosthodontics*, 1990, **3**, 30-41.
 Augthun M. *et al.*, *Quintessence Int.*, 1996, **2**, 103-112.
 Avivi-Arber L., Zarb G. A., *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **11**, 1-27.
 Babbush C. A., *Dental Clinics of North America*, 1986, **30**, 117-131.

- Blomqvist J. E., Isaksson S., *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **11**, 512-521.
 Branemark P.-I. *et al.*, *Scandinavian J. Plastic Reconstructive Surgery*, 1969, **3**, 81-100.
 Branemark P.-I. *et al.*, *Scandinavian J. Plastic Reconstructive Surgery*, 1977, **11** (Suppl. 16), 1-132.
 Brunette D. M. *et al.*, *Tissue integration in oral, orthopedic maxillofacial reconstruction*, 1990, Quintessence Books, Chicago, pp. 21-31.
 Bruschi G. B., Scipioni A., *Osteointegrated Implants*, 1: Boca Raton, Press, 1990, 35-61.
 Buser D. *et al.*, *Clinical Oral Implants Research*, 1990, **1**, 33-40.
 Buser D. *et al.*, *J. Oral Maxillofacial Implants*, 1991a, **6**, 405-412.
 Buser D. *et al.*, *J. Biomedical Materials Research*, 1993, **25**, 889-902.
 De Groot K. *et al.*, *J. Biomedical Material Research*, 1987, **21**, 1375-1381.
 Denissen H. W. *et al.*, *Int. J. Prosthodontics*, 1990, **3**, 53-58.
 Eriksson A. R., Albrektsson T., *J. Prosthetic Dentistry*, 1983, **50**, 101-107.
 Espinosa Marino J. *et al.*, *Quintessence Int.*, 1996, **2**, 119-122.
 Friberg B. *et al.*, *Periodontics Restorative Dentistry*, 1992, **12**, 441-450.
 Gottlander M., Albrektsson T., *Clinical Oral Implants Research*, 1992, **3**, 71-76.
 Isaksson S., *J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **5**, 317-326.
 Jansen J. A. *et al.*, *J. Biomedical Materials Research*, 1990, **24**, 295-307.
 Jemt T. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **11**, 291-298.
 Jemt T., Lekholm U., *Quintessence Int.*, 1994, **4**, 301-306.
 Langer B., Sullivan D. Y., *Periodontics Restorative Dentistry*, 1989, **9**, 241-261.
 Leghissa G. C. *et al.*, *Protocolli Operativi di chirurgia e protesi implantare*, 1993, USES-UTET, Torino, 2, 11-59.
 Molina M., *Concetti Fondamentali di Gnatologia Moderna*, 1988, ILIC, Milano.
 Mombelli A., *Criteria for success. Monitoring. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*, 1994, 317-325.
 Mombelli A. *et al.*, *Oral Microbiology Immunology*, 1987, **2**, 145-151.
 Nyman S. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1990, **5**, 9-14.
 Pierazzini A. *et al.*, *Radiologia implantologica*, 1994, UTET-USES, Torino.
 Quyrinen M. *et al.*, *J. Oral Maxillofacial Implants*, 1990, **5**, 384-389.
 Quyrinen M. *et al.*, *J. Clinical Periodontology*, 1992, **19**, 118-126.
 Roberts R. W. *et al.*, *American Journal Orthodontology*, 1984, **86**, 95-111.
 Sanz M. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1990, **5**, 247-253.
 Versteegh P. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **10**, 595-603.
 Weber H. P. *et al.*, *Clinical Oral Implants Research*, 1992, **3**, 181-188.
 Weiss C. M., *Oral Implanology*, 1986, **12**, 2.
 Wheeler S. L. *et al.*, *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, 1996, **11**, 26-34.
 Winnemberg A. *et al.*, *Quintessence Int.*, 1994, **3**, 175-186.

PRIMO MURA

IMPOTENZA [v. vol. II, coll. 1692-1694; Agg. I, coll. *3701-3706]

Introduzione ed etiopatogenesi

L'impotenza *erigendi* rappresenta un capitolo della medicina in rapido divenire, sia per le sempre maggiori conoscenze di fisiopatologia, sia per l'affinarsi delle metodiche diagnostiche volte ad una sempre minore invasività ed a un approccio più razionale. Se gli anni '80 sono stati caratterizzati, con l'avvento della FIC (Farmacoerezione Intracavernosa), da un cambiamento delle conoscenze sulla etiopatogenesi del disturbo, caratterizzandone la valenza organica soprattutto in senso vasculogenetico, gli anni '90 chiariscono il ruolo di «motore» dell'erezione svolto dal tessuto muscolare liscio delle trabecole cavernose. Infatti, in passato, l'erezione veniva vista come un fenomeno meccanico risultante da un aumento dell'afflusso arterioso nei corpi cavernosi e dalla contemporanea diminuzione del deflusso venoso dai corpi stessi. Attualmente si è arrivati alla conclusione che tali modificazioni dell'emodinamica arterovenosa sono solo un fenomeno secondario rispetto alle modificazioni del tono della muscolatura liscia cavernosa. Pertanto durante la flaccidità, la muscolatura liscia cavernosa è in uno stato intermedio tra il pieno rilassamento e la totale contrazione. In erezione assistiamo ad un rilasciamento che si traduce in un allargamento dei sinusoidi, con

un abbassamento delle resistenze periferiche ed una conseguente aumento dell'afflusso.

La riduzione del deflusso venoso è invece ottenuta attraverso la compressione passiva delle vene circonflasse che stanno tra la tonaca albuginea ed il tessuto cavernoso dilatato. Quando si verificano situazioni che innalzano il tono alfa-adrenergico (freddo, ansia, stress) la muscolatura liscia cavernosa si contrae completamente; un elevato tono alfa-adrenergico può inibire completamente l'erezione anche in un soggetto sano (impotenza psicogena derivante dall'«ansia da prestazione»).

Vari studi, inoltre, eseguiti in microscopia elettronica (Wespes *et al.*, 1990) sulla ultrastruttura e sulla morfologia istologica hanno evidenziato la degenerazione della muscolatura liscia cavernosa (inversione rapporto cellule muscolari-quota fibre collagene) come causa primaria di disfunzione erettile. Il tono della muscolatura liscia è regolato da un sistema autonomo, con derivazioni del sistema simpatico e parasimpatico. Sono stati identificati numerosi neurotrasmettitori (oltre i classici acetilcolina e noradrenalina) non adrenergici e non colinergici quali il VIP (peptide vaso-intestinale) e soprattutto l'ossido nitrico (NO) che sembra svolgere un ruolo attivo nel rilasciamento trabecolare dei corpi cavernosi.

La reazione chimica prevede come precursore la L-arginina che sotto l'azione della NO-sintetasi si trasforma in ossido nitrico (NO) il quale stimolando il sistema guanilciclasico favorisce la conversione del guanosinmonofosfato in 3,5-guanosinmonofosfato ciclico; questo induce rilasciamento delle miocellule, promovendo il decremento del calcio libero citosolico (Rajfer, 1992; Zorogniotti e Lizza, 1994). Anche l'endotelio dei sinusoidi sembra avere un ruolo nei meccanismi neurotrasmettitoriali e nella produzione di NO, attraverso l'EDRF (fattore rilassante endoteliale) e l'endotelina, che causa invece contrazione (v. ENDOTELIO**). Questo concetto è oggi estremamente importante, dal momento che molte malattie comuni come il diabete, l'ipertensione, l'ipercolesterolemia e l'aterosclerosi danneggiano la funzione dell'endotelio già nelle fasi precoci.

Diagnosi

Le nuove acquisizioni fisiopatologiche su esposte hanno modificato l'iter diagnostico in senso più strettamente «funzionale», cercando di proporre un algoritmo diagnostico il più possibile semplificato e soprattutto meno invasivo per il paziente, focalizzando l'attenzione sul tono muscolare endocavernoso durante gli esami diagnostici.

È di grande attualità la ricerca di una standardizzazione delle metodiche diagnostiche e in particolare la giusta «lettura» di un test farmacologico senza risposta erettile.

Quanto influisce pertanto il tono adrenergico sulla risposta ad un esame diagnostico? Proprio in risposta a questo interrogativo sembra assumere un ruolo importante lo studio dell'attività elettrica dei corpi cavernosi (CC-EMG). Per primi Wagner e Gestenberg nel 1989 descrivevano la presenza di una periodica attività elettrica presente in stato di flaccidità che scompariva o si riduceva in erezione, postulando così che l'assenza di decremento dell'attività elettrica potesse essere suggestiva di disfunzione del Sistema Nervoso Autonomo cavernoso. Dopo queste prime esperienze si è passati, nel 1993, ad una standardizzazione di questa metodica, e successivamente a studi su pazienti patologicamente selezionati (Nasso *et al.*, 1994; Stief *et al.*, 1994), quindi, per le lesioni post-chirurgia pelvica o chirurgia venogenica. L'atteggiamento della muscolatura dei corpi cavernosi sembrerebbe pertanto l'unica indagine in grado di evidenziare direttamente i danni funzionali del tessuto muscolare liscio cavernoso, superando le possibilità degli esami isomorfometrici

che forniscono solo dei dati morfologici e quantitativi sui tessuti erettili.

Questa «potenzialità», se confermata da studi clinici multicentrici su grandi gruppi di pazienti, potrebbe permettere la distinzione tra disfunzioni caverno-occlusive organiche, legate ad alterazioni anatomico-patologiche dei tessuti cavernosi (fibrosi, malattia di La Peyronie, atrofia senile, etc.) da quelle funzionali quali le miopatie cavernose, le alterazioni neurotrasmettitoriali, danni della conduzione nervosa autonoma, gli stimoli psicogeni centrali.

Si tratta di condizioni in cui si ha un tracciato anomalo. Naturalmente l'esame ha anche delle limitazioni, quali ad es. la scarsa conoscenza sulle modalità di propagazione del segnale elettrico e le difficoltà legate ad una lettura visiva del tracciato. Alla luce di queste novità fisiopatologiche e diagnostiche è comunque opportuno ricordare come la valutazione di questa patologia debba ricondursi all'insieme, laddove un parametro alterato non è strettamente indicativo ma orientativo nell'ambito della multifattorialità della etiopatogenesi dell'i.

Terapia

Nell'ambito della terapia delle disfunzioni erettili, pur non registrandosi novità assolute va sottolineato come la prostaglandina E₁ (PGE₁) per infusione endocavernosa sia passata da una fase sperimentale ad una certezza terapeutica (Linnet e Ogrinc, 1996).

Infatti, attualmente è commercializzata una forma liofilizzata di PGE₁ (alprostadi: Caverjet®) che può essere ricostituita in dosi terapeutiche al momento opportuno. Naturalmente è necessario un periodo di *training* in ambulatorio del paziente in cui si esegue la personalizzazione della dose efficace e l'istruzione «tecnica».

È da notare che i dosaggi efficaci (variabili da paziente a paziente anche in relazione all'etiologia dell'i.) risultano notevolmente inferiori rispetto a quelli della papaverina. La PGE₁ infatti è da considerarsi molto più fisiologica rispetto a quest'ultima in quanto sintetizzata naturalmente dai corpi cavernosi, i quali producono anche gli enzimi per la sua degradazione. Pertanto, il 97% circa della PGE₁ esogena iniettata nei corpi cavernosi è metabolizzata localmente in circa 5 min. Di contro va sottolineata la possibilità di erezioni prolungate con necessità di evacuazione del sangue intrappolato nei corpi cavernosi e di possibili processi fibrotici a carico del tessuto cavernoso, non sempre correlati all'entità della dose utilizzata.

Del tutto recentemente è stata sperimentata con successo una nuova modalità di somministrazione delle PGE₁ (Padma-Nathan *et al.*, 1997). Facendo precedere una minzione, una *pellet* contenente la dose di PGE₁ (alprostadi) viene introdotta direttamente attraverso il meato uretrale esterno nell'uretra distale mediante una sorta di sondino di polipropilene (3,2 cm di lunghezza × 3,5 mm di diametro), che grazie ad un appropriato dispositivo permette il rilascio *in situ* del farmaco. In tal modo questo viene assorbito attraverso la mucosa uretrale e va a raggiungere le strutture erettili. Questo nuovo metodo di somministrazione trans-uretrale è senza dubbio di grande praticità e assai poco invasivo. Può aversi solo un lieve dolore penieno (10% dei trattamenti) e segni di ipotensione (3%). Non è stato mai osservato priapismo né fibrosi peniena.

I recenti studi sui neurotrasmettitori hanno portato alla sperimentazione di nuove molecole ad assunzione orale quali ad esempio il sildenafil (Viagra®). La sua azione si esplica nel rilascio di ossido nitrico mediato dal cGMP (ac. 3,5 guanosinmonofosfato ciclico) con una inibizione selettiva per le 5-fosfodiesterasi (Goldstein I. *et al.*, 1998). All'azione biochimica segue un rilassamento della muscola-

tura liscia intracavernosa con conseguente effetto «a cascata» sull'emodinamica peniena (Buvat e Gingell, 1997). Va comunque sottolineato come queste prime esperienze con il sildenafil vadano confermate con trattamenti a lungo termine. Per più ampie informazioni v. SILDENAFIL**.

In tema di terapia chirurgica bisogna registrare un sempre minor interesse verso le metodiche di rivascolarizzazione arteriosa, mentre in casi selezionati continua ad avere un ruolo la chirurgia venosa, soprattutto se seguita da un trattamento farmaco infusionale con PGE₁.

Nel settore della bioingegneristica va invece evidenziata la presenza di protesi sempre più sofisticate, ma soprattutto l'avvento degli «impianti soffici» (Subrini, 1993). Tramonta in questo caso il concetto di protesi in senso stretto, per giungere a quello di «impianto riduttore volumetrico», nel senso che non si provoca una rigidità artificiale, ma si tende a restaurare l'erezione utilizzando la percentuale residua di riempimento del corpo cavernoso tramite una sua riduzione volumetrica indotta dall'impianto stesso. Si viene quindi a realizzare un recupero emodinamico più vicino ai nuovi concetti di fisiopatologia dell'erezione.

Bibliografia

- Alprostadil nell'impotenza, *Drug and Therapeutic Bulletin* (DTB), 1995, 4 (8), 61-63.
 Broderick G. A., Harkaway R., *Int. J. Impotence Res.*, 1994, 6, 9-16.
 Buvat J., Gingell J., *Sildenafil (Viagra)*, Esir Madrid Book, 1997, 81.
 Goldstein I. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, 1397-1404.
 Linet O. I., Ogrinc F. C., *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334, 873-877.
Medical Letter, 1995, XXIV (21), 87-88.
 Padma-Nathan H. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1997, 335 (1), 1-7.
 Rajfer J., *J. Urol.*, 1992, 326, 90.
 Sasso F., *Int. J. Impotence Res.*, 1994, 6 (Suppl. 1), D 211.
 Stief C. G. et al., *Int. J. Impotence Res.*, 1994, 6 (3), 177-182.
 Subrini L., *Ann. Urol.*, 1993, 27 (3), 183-191.
 Wagner G., Gestenberg T., *J. Urol.*, 1989, 142, 723.
 Wespes E., Shiffmann S., Depierreux M. et al., *Int. J. Impotence Res.*, 1990, 2, Suppl. 2, 30.
 Zorngiotti A. W., Lizza E. F., *Int. J. Impotence Res.*, 1994, 6, 33-36.

FRANCESCO SASSO

INALATORIA TERAPIA

1. *inhaler therapy.*

APPARECCHIATURE E TECNICHE

SOMMARIO

Introduzione (col. 2737). - **Spray dosati** (col. 2738): *Caratteristiche. - Tecnica di inalazione. - Distanziatori o camere di espansione* (col. 2741). - **Inalatori di polveri secche** (col. 2743). - **Apparecchi per aerosol o nebulizzatori** (col. 2746): *Nebulizzatori pneumatici. - Nebulizzatori a ultrasuoni. - Manutenzione degli apparecchi per aerosol.*

Introduzione

La somministrazione dei farmaci per via inalatoria è ormai divenuta un cardine nel trattamento dell'asma bronchiale (v.; v.**). I vantaggi sono numerosi: una rapida e prevedibile comparsa dell'effetto farmacologico, la possibilità di impiegare dosaggi ridotti rispetto ad altre vie di somministrazione e di conseguenza una minore incidenza di effetti indesiderati sistemici, infine la facilità di accesso all'apparato respiratorio. L'aerosolterapia (v.) costituisce al tempo stesso un'area critica nella quale si registra uno dei più bassi livelli di affidabilità del paziente nella corretta esecuzione della terapia. Il fallimento nel trattamento dei sintomi cronici e degli attacchi acuti di asma va in parte addebitato anche al fatto che i farmaci inalati non raggiungono l'organo bersaglio in concentrazioni adeguate, in primo luogo per la scorretta modalità di utilizzo degli inalatori.

Tre fattori condizionano principalmente la penetrazione

dell'aerosol nelle vie aeree: il diametro delle particelle, i parametri ventilatori del paziente e la via di inalazione.

La penetrazione nell'albero bronchiale è tanto più profonda quanto minore è il diametro delle particelle: solo le unità inferiori ai 5 micron raggiungono le strutture bronchiali e alveolari, quelle superiori ai 10 micron si depositano totalmente a livello orofaringeo.

Il grado di profondità dipende anche dalla velocità di inalazione. Una inalazione rapida aumenta infatti le probabilità di deposito nelle vie aeree prossimali, mentre una inalazione lenta (pari a 0,5 litri al secondo) e costante aumenta invece la diffusione periferica delle particelle liquide. Aumentando il volume dell'aerosol inalato se ne incrementa la penetrazione bronchiale. A parità di volume corrente, invece, l'aumento della frequenza respiratoria comporta un maggior accumulo di particelle a livello dell'orofaringe, mentre una bassa frequenza respiratoria fa sì che il deposito avvenga più profondamente. Pertanto una modalità di inalazione ottimale dovrebbe prevedere un ampio volume corrente con bassa frequenza respiratoria.

La conformazione della cavità nasale comporta una elevata resistenza al flusso d'aria inspirata a cui consegue una marcata deposizione locale delle particelle dell'aerosol. Il flusso aereo dalla bocca, più diretto e meno turbolento, favorisce invece una deposizione più profonda.

Per rilasciare i farmaci a livello polmonare si ricorre a tre sistemi di erogazione: gli spray dosati, gli inalatori di polveri e gli apparecchi per aerosol.

Per gli apparecchi impiegati in anestesia chirurgica e in ossigenoterapia nonché per le indicazioni terapeutiche della t. i., cfr. i rimandi riportati in fondo a questa voce.

Spray dosati

Caratteristiche

Gli spray pressurizzati predosati (generalmente con salbutamolo: Ventolin®) rappresentano i sistemi di erogazione più pratici e più utilizzati. Sono apparecchi multidosi che contengono circa 200 dosi per confezione e che rispondono alle esigenze della maggior parte dei pazienti adulti e dei bambini con più di 3 anni. Il farmaco, contenuto in una bomboletta di alluminio sigillata e pressurizzata, è sospeso in un gas propellente e viene rilasciato a dose costante per ogni erogazione. I possibili inconvenienti legati agli attuali propellenti (clorofluorocarburi o CFC [ad es. freon]) quali la tosse e gli effetti dannosi sulla fascia di ozono, potranno essere superati dai nuovi composti come l'idrofluoroalkane HFA-134a, da poco commercializzato in Inghilterra.

Il contenitore di alluminio è montato su un erogatore di plastica col quale è collegato attraverso una piccola camera dosatrice. La pressione esercitata sulla valvola comporta il rilascio nell'atmosfera, attraverso una stretta apertura, di una soluzione sotto pressione che assume l'aspetto di un nebulizzato. La grandezza media delle particelle all'uscita, intorno ai 40 micron, si riduce molto rapidamente con l'evaporazione del propellente sino a raggiungere un valore finale compreso tra i 2,8 e i 4,3 micron. Se la tecnica di inalazione è corretta, il 12-15% della dose inalata raggiunge la sede d'azione. Lo spruzzo (*puff*) all'uscita dalla bomboletta raggiunge i 33 metri al secondo e con ogni probabilità molte delle difficoltà incontrate dai pazienti nell'eseguire una corretta inalazione dipendono da questa velocità.

Gli errori, ampiamente dimostrati da numerosi studi, risiedono principalmente nella mancata coordinazione tra la pressione manuale esercitata sulla bomboletta e l'inizio dell'atto inspiratorio (anticipato o ritardato). Per superare questo problema, negli U.S.A. e in alcuni paesi europei è stato messo in commercio un nuovo apparecchio (Autohaler® della ditta Master Pharma; fig. 1) che viene attivato da

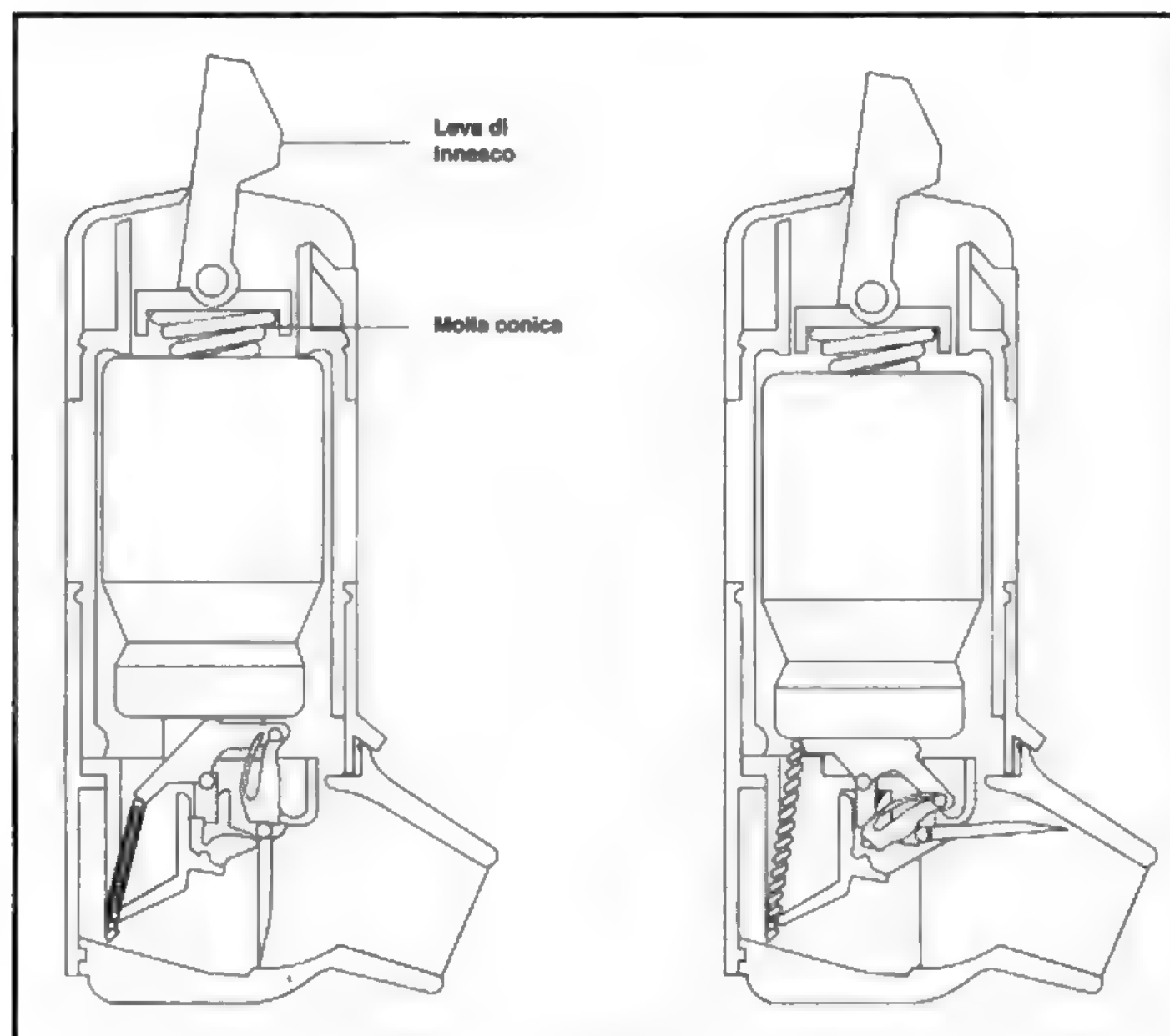


Fig. 1. Schema dell'Autohaler[®]. Si tratta di un inalatore automatico nel quale il farmaco viene innescato sollevando una levetta, posta alla sommità del dispositivo (a sinistra). L'aletta di bloccaggio, si solleva in avanti attraverso l'inspirazione del paziente, consentendo l'erogazione del farmaco. (Per gentile concessione della Ditta Master Pharma).

un meccanismo a molla regolato dalla portata di flusso inspiratorio di 22-36 l/min. Questo valore viene facilmente raggiunto dagli asmatici, compresi i bambini, e risulta ideale per una efficace broncodilatazione.

Altre difficoltà risiedono nel fatto che il paziente si difende istintivamente dall'arrivo del gas freddo sul palato molle interrompendo l'inalazione o proseguendola attraverso la via nasale. Questo errore è molto frequente nel bambino piccolo e rischia di rimanere misconosciuto se il boccaglio viene serrato tra le labbra e impedisce ai genitori di veder scomparire la nuvoletta all'interno della bocca. L'uso non corretto degli *spray* dosati va anche addebitato al fatto che il paziente si dimentica di agitare il flacone prima dell'uso o esegue l'inalazione troppo rapidamente oppure, dopo aver inspirato, non trattiene il respiro per il tempo necessario.

Oltreché insegnare al paziente la corretta modalità di esecuzione, è importante raccomandargli di portare con sé la bomboletta sempre munita del dispositivo di protezione, per evitare che corpi estranei di piccole dimensioni penetrino all'interno del boccaglio e vengano poi espulsi al momento dell'utilizzo dello *spray*. Alcune recenti segnalazioni di incidenti dovuti all'inalazione di corpi estranei (valvola di un pneumatico, piccole monete, insetti) ribadiscono la necessità di far rispettare questa elementare norma di cautela.

Tecnica di inalazione

Per migliorare la tecnica di utilizzo e di conseguenza gli esiti terapeutici, è essenziale istruire il paziente sulle corrette modalità di estrazione e accertarsi periodicamente della sua aderenza operativa. Un sistema molto efficace è quello di eseguire personalmente, a scopo dimostrativo, una

corretta inalazione utilizzando bombolette placebo (contenenti il solo propellente, senza principio attivo) fornite, a richiesta da almeno due ditte produttrici (Glaxo e Valeas).

Per sottolineare quanto sia importante che il paziente impari ad eseguire correttamente la manovra basta sottolineare il fatto che con una lenta inspirazione, seguita da un'apnea di 7-10 secondi, nel polmone si deposita il 14-15% della dose erogata; è sufficiente che il paziente trattienga il respiro per meno di 4 secondi e che raddoppi la velocità di flusso perché la percentuale di farmaco che raggiunge l'albero respiratorio si dimezzi. L'apnea prolungata al termine dell'inspirazione è molto importante dal momento che il farmaco si deposita sulle pareti bronchiali per gravità e non per impatto.

Per un efficace utilizzo dello *spray* è indispensabile:

1. Rimuovere la chiusura di protezione del boccaglio e agitare la bomboletta per miscelare il farmaco col propellente, tenendola tra pollice e indice in posizione verticale, col boccaglio dalla parte inferiore (fig. 2, *in alto*).
2. Espirare profondamente (fig. 2, *al centro*).
3. Inspirare lentamente e profondamente attraverso la bocca aperta, mantenendo l'erogatore a 4-5 centimetri dalle labbra. A inspirazione appena iniziata premere con l'indice il fondo della bomboletta senza interrompere l'inspirazione (fig. 2, *in basso*).
4. Trattenere il respiro quanto più a lungo possibile, idealmente 10 secondi, ed espirare lentamente.
5. Attendere qualche secondo prima di procedere ad una successiva inalazione.

Non esiste unanimità di consensi sul fatto che per una inalazione ottimale si debba tenere il boccaglio alla distanza di 4-5 centimetri dalla bocca. Gli stessi foglietti illustrativi dei vari farmaci in commercio indicano di collocare il boccaglio tra le labbra ben chiuse. Mantenendo però il

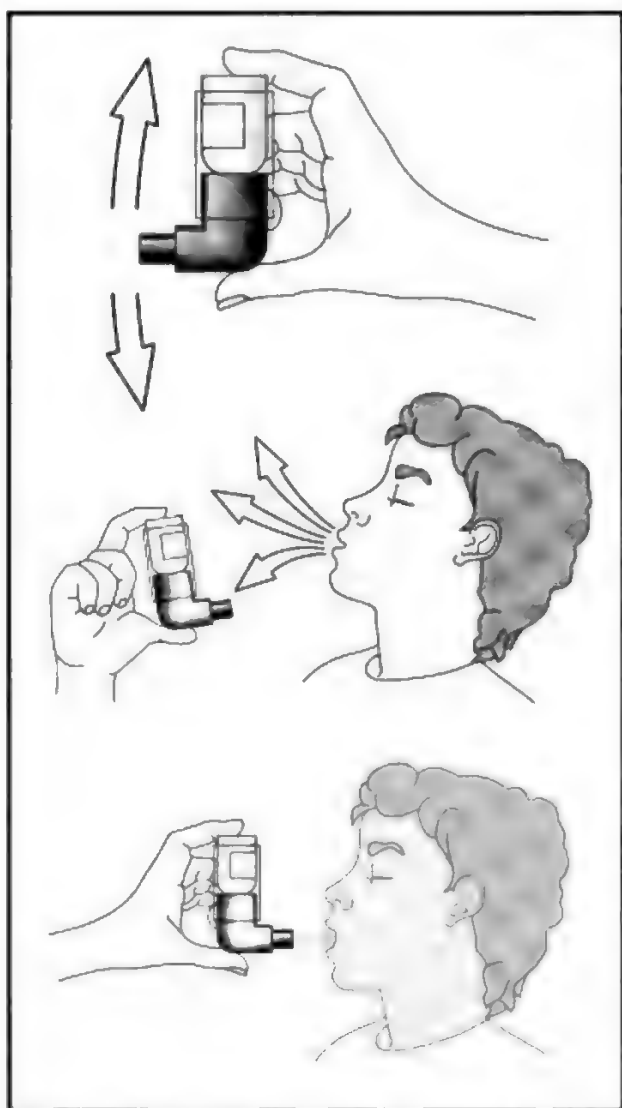


Fig. 2. Corretta manovra d'esecuzione della tecnica di inalazione mediante bombole pressurizzate predosate.

boccaglio leggermente discosto dalla bocca, da un lato si riesce a ridurre, anche se parzialmente, la velocità dello spruzzo e quindi l'impatto oro-faringeo grazie alla maggiore evaporazione del propellente, dall'altro a verificare la correttezza dell'inalazione da parte di pazienti in età pediatrica (come già detto, se non inalata la nuvola fuoriesce dalla bocca).

Distanziatori o camere di espansione

Nei bambini in età prescolare e nei pazienti, soprattutto anziani, che trovano difficoltà di coordinamento «mano-polmone» e sono incapaci di usare correttamente uno *spray* dosato possono essere adottati i distanziatori (o camere di espansione). Questi dispositivi consistono essenzialmente in un contenitore nel quale viene raccolto il farmaco spruzzato dalla bomboletta per essere successivamente inalato. Dal momento che l'inalazione viene effettuata dopo che lo spruzzo è stato erogato non diventa più indispensabile coordinare l'azionamento della bomboletta con l'inspirazione, né inalare in modo lento e profondo. Inoltre l'inala-

zione può essere eseguita a più riprese, dal momento che la maggior parte delle goccioline più fini rimane sospesa all'interno del distanziatore per più di 30 secondi dopo lo spruzzo.

Oltre a facilitare l'assunzione del farmaco, le camere di espansione presentano due importanti vantaggi. In primo luogo il breve lasso di tempo durante il quale il farmaco resta all'interno dello spaziatore è comunque sufficiente per far evaporare il propellente. Questo non solo evita la penetrazione a livello bronchiale di una sostanza potenzialmente tossica, ma riduce anche le dimensioni delle particelle di aerosol che riescono così a raggiungere i bronchi in quantità largamente superiore (17-21%) a quella ottenibile con l'uso della bomboletta. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che l'adozione degli spaziatori aumenta l'efficacia degli *spray* dosati. La minore deposizione oro-faringea (9-16% contro 80%) del farmaco nebulizzato si traduce inoltre in una minore incidenza di effetti indesiderati, sia locali (come la candidosi orale e la disfonìa da cortisonici) che sistemici (soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene da cortisonici ad alte dosi).

L'adozione dello spaziatore diventa perciò molto importante quando si utilizzano cortisonici topici ad alte dosi e/o per lunghi periodi di tempo nell'obiettivo di migliorarne l'efficacia e ridurre gli effetti indesiderati.

La superiore capacità degli spaziatori di raggiungere le zone più profonde dell'albero respiratorio assume proporzioni maggiori in caso di accesso grave di asma, quando l'inspiro «cortissimo» del paziente impedisce una sufficiente inalazione dello *spray* come tale.

Nel nostro paese esistono attualmente due diversi tipi di spaziatori: quelli cilindrici Aerochamber[®] Markos 250 ml [fig. 3] e Babyhaler[®] Glaxo per uso pediatrico, 350 ml [fig. 4] e quelli a forma conica per adulto (Volumatic[®] Glaxo, 750 ml [fig. 5]). Il modello più semplice di spaziatore è rappresentato dal Jet[®] che corredo alcune preparazioni di Clenil[®] aerosol. Si tratta di un piccolo dispositivo di plastica, a forma di D, del volume di circa 120 ml. La bomboletta viene inserita verticalmente in una cavità ricavata all'interno dell'asse verticale e l'inspirazione avviene attraverso un boccaglio situato sulla parte convessa dello spaziatore. Gli altri spaziatori sono formati da una camera di espansione di diverso volume, da un orifizio sul quale va adattata la bomboletta, da un boccaglio ed eventualmente da una valvola unidirezionale che si chiude ad ogni espirazione. Aerochamber[®] è dotato inoltre di un sistema acustico che entra in funzione quando le inspirazioni vengono eseguite troppo rapidamente ed è l'unico che si adatta a tutti i tipi di boccagli. Di quest'ultimo spaziatore esiste anche un modello con mascherina in silicone per uso pediatrico.

L'utilità della presenza di una valvola non è certa, mentre numerosi studi hanno dimostrato la superiorità delle camere di espansione di grande volume su quelle più piccole. Lo svantaggio degli spaziatori rigidi è quello delle loro dimensioni che li rendono ingombranti e poco proponibili per un impiego fuori dalle mura domestiche. Il modello a «soffietto» (Inspirease[®]) risolveva in parte questo problema, ma non risulta più disponibile. Il tipo Aerochamber[®] sembra un buon compromesso tra efficacia e dimensioni.

Per un loro corretto impiego è consigliabile: agitare energicamente la bomboletta *spray* e introdurre il boccaglio della bomboletta nell'apposito orifizio della camera di espansione; serrare le labbra intorno al boccaglio posto all'estremità opposta dello spaziatore (o applicare la mascherina sul volto del bambino); premere la bomboletta dell'inalatore; inspirare lentamente e profondamente at-



Fig. 3. Spaziatori cilindrici (Aerochamber®, Markos) per la somministrazione di farmaci mediante spray predosati. a) Spaziatore con maschera per adulti; b) spaziatore con maschera pediatrica per bambini oltre i tre mesi di età; c) spaziatore con maschera per bambini di sei mesi di età fino ai 3 anni; d) spaziatore standard. (Per gentile concessione della Ditta Markos).

traverso la bocca, trattenendo il respiro per alcuni secondi.

Prima di effettuare una seconda inalazione è consigliabile attendere 1-2 minuti.

Dopo l'uso il distanziatore, dopo essere stato smontato, va lavato con acqua calda e detergente liquido, indi risciacquato con acqua calda, lasciato asciugare all'aria e ricomposto.

Inalatori di polveri secche

Gli inalatori di polveri consentono l'inalazione nei polmoni di farmaci finemente polverizzati come tali o contenuti in capsule di gelatina dura, in genere con l'aggiunta di lattoso come eccipiente veicolante. La somministrazione di farmaci



Fig. 4. Spaziatore a forma di cono Volumatic® Glaxo per la somministrazione di farmaci mediante spray predosati. (Per gentile concessione della Ditta Glaxo).

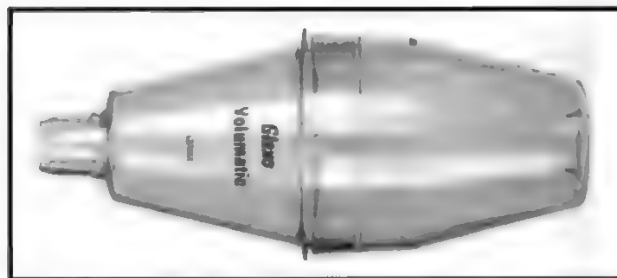


Fig. 5. Spaziatore a forma conica Volumatic® Glaxo. (Per gentile concessione della Ditta Glaxo).

antiasmatici sottoforma di polvere presenta due vantaggi sostanziali: non richiede una perfetta coordinazione tra erogazione ed inspirazione, essendo il flusso inspiratorio quello che mette in funzione il dispositivo e non contiene propellenti a volte mal tollerati da parte del paziente. Se usati correttamente, gli inalatori di polveri riescono ad avere la stessa efficienza degli aerosol dosati (stessa percentuale di farmaco inalato a livello bronchiale e con minima deposizione a livello orofaringeo). Un aspetto negativo risiede nel fatto che per poter inalare la polvere, con la maggior parte dei dispositivi bisogna raggiungere un flusso inspiratorio di almeno 60 litri al minuto, vale a dire circa doppio di quello richiesto per l'utilizzazione di uno spray dosato, di fatto irraggiungibile da un bambino con meno di 5 anni di età e da un paziente gravemente dispnoico.

Nel nostro paese gli unici farmaci in commercio sottoforma di polveri da inalare sono il disodiocromoglicato (Lomudal®), il salmeterolo (es. Serevent®) e la budesonide (Pulmaxan®).

Per consentire l'impiego del disodiocromoglicato viene utilizzato il progenitore di questi erogatori, lo *Spinhaler*® (fig. 6), un dispositivo composto da un manicotto scorrevole e da un'elica interna che ruota su un perno metallico fissato al centro di un boccaglio. La capsula, introdotta nell'alloggiamento dell'elica, viene perforata dallo scorrimento verso il basso del manicotto. Questa via di somministrazione, nel caso specifico, lascia ancora a desiderare, tanto che la stessa ditta produttrice consiglia di raddoppiare la dose rispetto a quella indicata per lo spray dosato. I confronti effettuati tra *spinhaler* e gli aerosol dosati dimostrano che anche con questi sistemi gli errori commessi dai pazienti sono numerosi. Le difficoltà incontrate risiedono principalmente nel caricamento e nell'apertura delle capsule, nella perdita di polvere prima dell'inalazione e in atti inspiratori subottimali. In condizioni di umidità ambientale in questi inalatori può accumularsi facilmente della polvere. Per garantirne un corretto funzionamento è necessario lavarli e asciugarli con regolarità (almeno due volte la settimana).

Il più recente *Diskhaler*® (fig. 7) multidose è stato progettato per superare alcuni dei problemi tipici dello *Spinhaler*, vale a dire la somministrazione monodose, le difficoltà nel caricamento e la tendenza della polvere ad assorbire umidità nei climi caldo-umidi. Il *Diskhaler* è attualmente disponibile per la somministrazione di salmeterolo prelevato da un blister inglobato in un sottile disco di alluminio (*rotadisk*). Ogni disco contiene solo 4 dosi e risulta anch'esso piuttosto complicato nelle operazioni di caricamento. L'attivazione del sistema richiede lo stesso sforzo inspiratorio che si deve produrre con lo *Spinhaler*. Una spazzola, situata in un compartimento del corpo posteriore del *Diskhaler*, consente di effettuare la pulizia dell'apparecchio, eliminando eventuali residui di polvere.

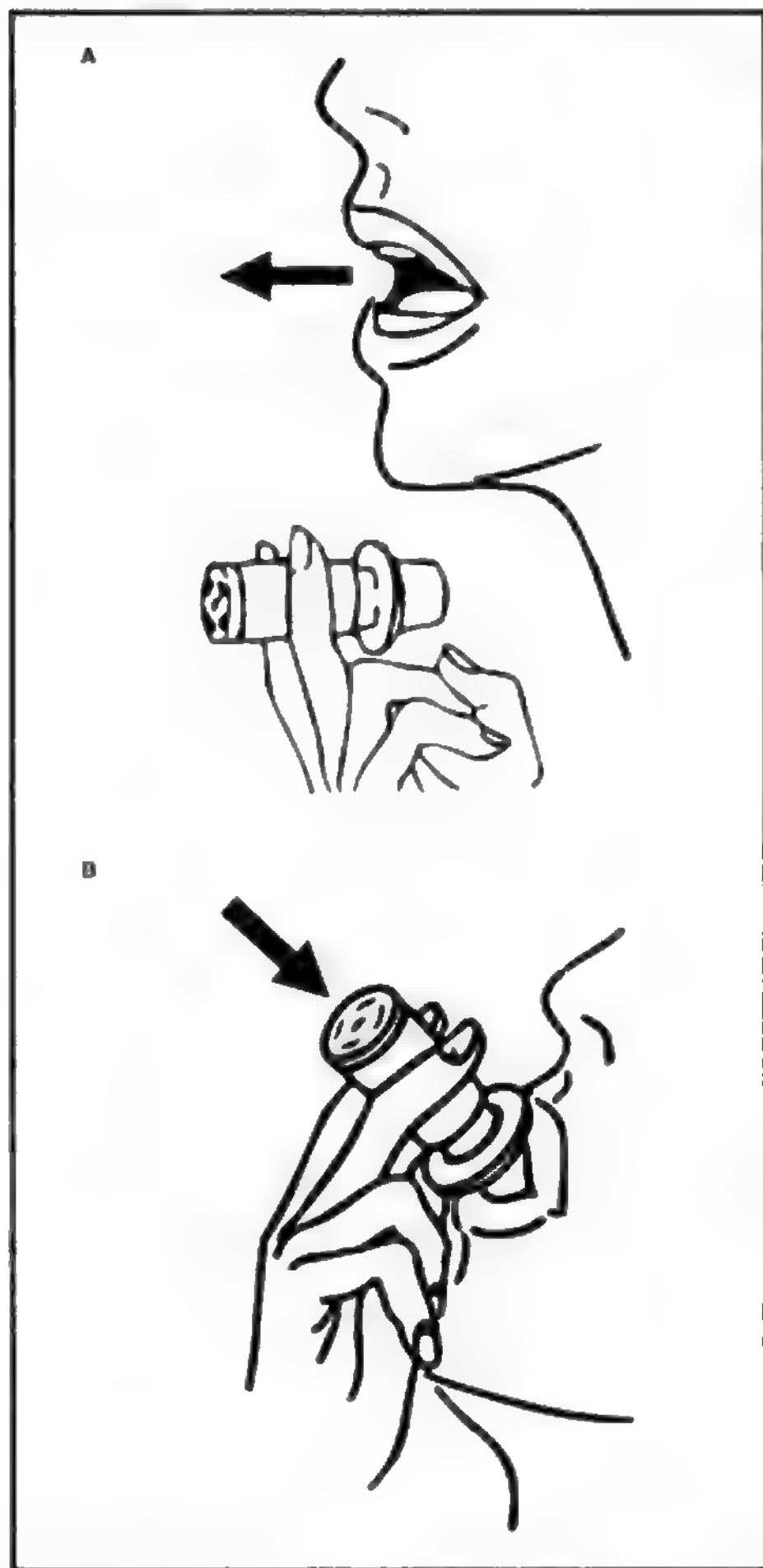


Fig. 6. Impiego dell'inalatore di polveri modello *Spinhaler*®. A) Tenendo l'inalatore lontano dalla bocca, espirare il più a lungo possibile per svuotare i polmoni; B) porre il boccallo tra le labbra fino alla flangia, stringere il boccallo tra i denti e inspirare con decisione e profondamente. In questo modo la polvere contenuta nella capsula raggiunge i polmoni. Trattenere il respiro per alcuni secondi, allontanando l'apparecchio dalla bocca ed espirare lentamente. Evitare assolutamente di espirare attraverso l'inalatore.

Uno dei più moderni inalatori di polveri, il *Turbohaler*® (per la budesonide), produce il doppio di particelle respirabili (inferiori a 5 micron) rispetto a quelle che si ottengono con una bomboletta pressurizzata. Il nebulizzatore, multidose (200 dosi di polvere), è regolato sulla portata degli atti respiratori e non utilizza propellenti, eccipienti/veicolo e lubrificanti. Risulta molto più semplice da usare di un convenzionale aerosol dosato, di uno *Spinhaler* o di un

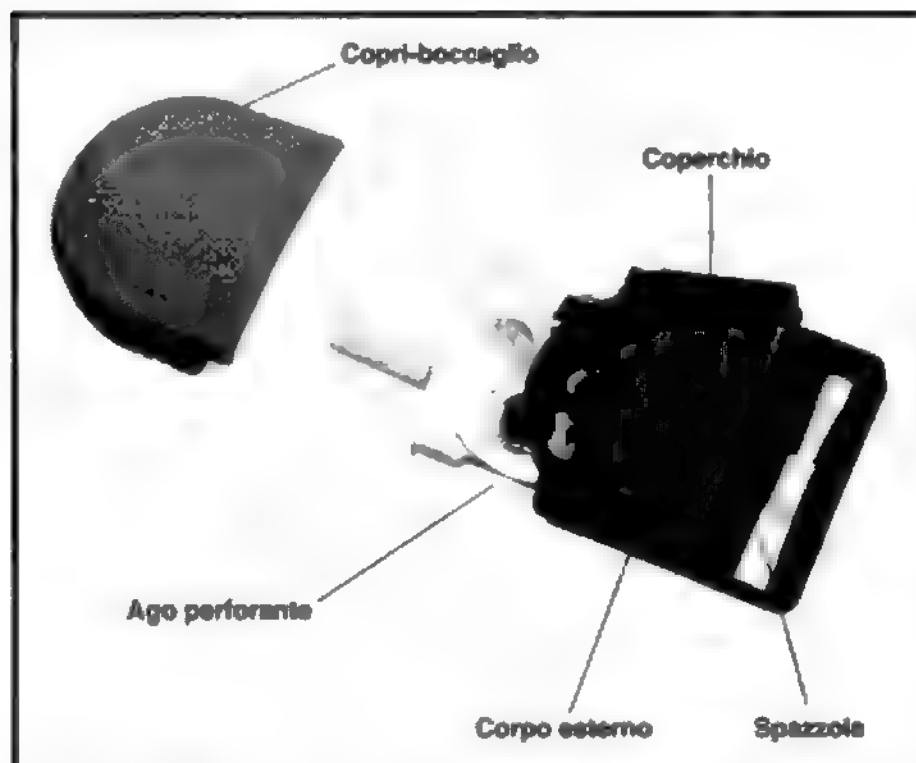


Fig. 7. Inalatore di polveri *Diskhaler*®, per la somministrazione di salmeterolo. (Per gentile concessione della Ditta Glaxo).

Diskhaler e permette l'erogazione del farmaco anche con un flusso di aria di soli 20 litri al minuto.

Apparecchi per aerosol o nebulizzatori

I nebulizzatori sono apparecchi che trasformano una soluzione di farmaci in una pioggia finissima che può essere inalata nei polmoni (v. AEROSOLTERAPIA). Non richiedono una eccessiva collaborazione da parte del paziente e consentono di erogare dosi elevate di farmaci (beta₂-agonisti) negli accessi più gravi di asma (anche se uno *spray* dosato, utilizzato con uno spaziatore, risulta più semplice da usare, più economico e altrettanto efficace). I principali inconvenienti risiedono nel fatto di dipendere da una fonte di elettricità per poter funzionare, nella lunga durata della somministrazione e nel rischio di contaminazione batterica. Altri aspetti negativi sono la rumorosità (nebulizzatori pneumatici), l'ingombro che ne rende poco agevole il trasporto e il costo elevato.

Nebulizzatori pneumatici

L'uso dei nebulizzatori pneumatici nella terapia respiratoria è divenuto molto popolare negli ultimi anni, soprattutto per l'erogazione dei cosiddetti farmaci mucolitici (nonostante la dubbia efficacia di questa categoria), tanto che si può verosimilmente ritenere che quasi in ogni famiglia sia rinvenibile un apparecchio di questo tipo.

I nebulizzatori pneumatici sono formati da un compressore e da un'ampolla. Nell'ampolla il flusso d'aria, forzato attraverso un piccolo orifizio, crea una caduta di pressione con risucchio di piccole quantità di farmaco che, investite dal getto d'aria, si frantumano in minutissime goccioline. Il diametro delle particelle, che costituisce il punto cruciale di ogni apparecchio per aerosol, dipende dalle caratteristiche dell'ampolla, dalla pressione dell'aria e dall'entità del flusso. È sufficiente, ad es. che il flusso si dimezzi da 12 a 6 litri al minuto perché il diametro delle particelle aumenti a tal punto (da 3,7 a 5-6 micron) da essere considerato al limite del terapeutico. La maggior parte degli apparecchi in commercio raramente risulta adatta per il trattamento delle gravi pneumopatie e dell'asma bronchiale. La scarsa potenza e le grossolane caratteristiche tecniche delle ampole non permettono infatti di produrre particelle sufficientemente piccole da raggiungere le vie aeree inferiori, ren-



Fig. 8. Nebulizzatore pneumatico Nebula®. (Per gentile concessione della Ditta Markos).

dendo inefficaci molte terapie (cortisonici e disodiocromoglicato). I beta₂-stimolanti possono risultare comunque efficaci in virtù della ridotta dose necessaria per svolgere una sensibile azione broncodilatatrice e del rapido assorbimento da parte della mucosa orale. A questi limiti si aggiungono quelli propri del principio di funzionamento, vale a dire la lentezza della nebulizzazione e l'irregolarità della erogazione per unità di tempo (per possibili variazioni della tensione elettrica). A scopo indicativo un apparecchio generatore di aerosol che risponda alle caratteristiche ideali deve avere una potenza compresa tra 1 e 2 atmosfere, deve nebulizzare una soluzione di 3 ml in un tempo inferiore ai 10 minuti (il che corrisponde ad un flusso superiore a 10 litri al minuto), essere corredato di un'ampolla in materiale sintetico non alterabile (le ampolle in plastica, essendo stampate e tarate, risultano più affidabili di quelle in vetro, più disomogenee e non tarabili). Un apparecchio che possiede queste caratteristiche è il Nebula® della ditta Markos (fig. 8).

Nebulizzatori a ultrasuoni

Questi apparecchi funzionano sul principio di una vibrazione che disgrega un liquido in minutissime goccioline. La vibrazione viene generata dal passaggio di una corrente elettrica ad alta frequenza (1-2 megaHertz) attraverso un disco di ceramica (trasduttore piezoelettrico). I nebulizzatori ad ultrasuoni sono più silenziosi dei nebulizzatori pneumatici e possiedono una maggiore rapidità di nebulizzazione che riduce la durata delle sedute. Per contro questi apparecchi si rompono con maggiore facilità rispetto a quelli pneumatici e possono alterare alcuni principi attivi (ad es. dornase alfa, Pulmozyme®, l'enzima utilizzato per migliorare la funzione polmonare dei pazienti con fibrosi cistica). Non esistono d'altronde ragioni per ritenere che tutti i nebulizzatori ad ultrasuoni, in virtù del loro costo elevato, possiedano una maggiore efficienza tecnica nel produrre particelle di diametro compatibile col raggiungimento delle parti più profonde dell'albero respiratorio. Un apparecchio clinicamente testato è il FISONeb® della Fisons (fig. 9), impiegato per la somministrazione della pentamida nella profilassi della polmonite da *Pneumocystis carinii* nei pazienti con infezione da HIV.

A tutt'oggi non esistono studi clinici comparativi che consentano di scegliere tra un nebulizzatore pneumatico e uno ad ultrasuoni in funzione del farmaco da somministrare e della patologia da trattare. Il ruolo di questi apparecchi appare in ogni caso complessivamente limitato (attacco acuto di asma nel bambino in età prescolare) e richiede un costante monitoraggio medico. È necessario istruire i genitori sulle caratteristiche tecniche dell'apparecchio che devono acquistare (ad es. flusso di almeno 10 l/min), rilasciando loro informazioni scritte molto dettagliate e precise norme di comportamento per evitare il rischio che venga sottovalutata la gravità dell'asma e venga posta eccessiva fiducia nella utilità di dosi elevate dei broncodilatatori.

Quando, come accade nelle comuni affezioni respiratorie, l'obiettivo principale della terapia aerosolica è quello di aumentare la componente acquosa delle secrezioni e quindi la loro fluidificazione, si possono anche utilizzare apparecchi che nebulizzino particelle di dimensioni superiori ai 10 micron.

Manutenzione degli apparecchi per aerosol

Il compressore dei nebulizzatori pneumatici va revisionato secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice. Per mantenere efficiente l'apparecchio e, soprattutto, per evitare il rischio di contaminazioni batteriche, è necessario lavare l'ampolla e gli altri accessori sotto l'acqua del rubinetto al termine di ogni seduta, lasciandoli asciugare all'aria o accelerando l'operazione con un getto d'aria calda. Dopodiché l'ampolla va avvolta in un panno pulito e asciutto e conservata in un recipiente chiuso. I microrganismi infet-



Fig. 9. Nebulizzatore ad ultrasuoni FISONeb®. (Per gentile concessione della Ditta Fisons).

tanti sono in genere dotati di bassa patogenicità, ma potrebbero rendersi responsabili di infezioni polmonari anche gravi in pazienti immunocompromessi. I filtri d'aria posti sul nebulizzatore o sul compressore devono essere cambiati regolarmente per ridurre il rischio di contaminazioni batteriche. La pulizia dei nebulizzatori a ultrasuoni risulta di difficile esecuzione.

Per le indicazioni terapeutiche della terapia inalatoria si rinvia alle voci seguenti: AEROSOLTERAPIA (I, 837-843); ANESTESIA CHIRURGICA, *anestesia per inalazione* (I, 2104-2131; Agg. I, *392-398; Agg. II, **280-282); ASMA BRONCHIALE (II, 1373-1397; Agg. II, **631-651); BRONCODILATATORI (II, 329-341; Agg. I, *1123-1135); CORTISONE E CORTISONICI (IV, 1145-1168; Agg. I, *1878-1883); OSSIGENOTERAPIA (X, 2208-2215; Agg. I, *5585-5595).

Bibliografia

- Arosio M., Castelli A., Miselli M., *Informazioni sui farmaci*, 1993, 17 (4), 237.
 Arosio M., Castelli A., Miselli M., *Informazioni sui farmaci*, 1994, 18 (1), 27.
 American Association for Respiratory Care, *Respiratory Care*, 1991, 36, 916.
 Anonimo, *Drug and Ther. Bull.*, 1993, 2, 25.
 Anonimo, *Drug and Ther. Bull.*, 1989, 2, 61.
 Battistini A., *Medico e Bambino*, 1990, 9, 46.
 British Thoracic Society, *Thorax*, 1993, 48 (suppl.), S21.
 Canciani M., *Medico e Bambino*, 1993, 12, 246.
 Hindle M. et al., *Chest*, 1995, 107, 629.
 Keeley D., *Br. Med. J.*, 1992, 305, 598.
 Juillard J., Mignot G., Pecquet C., *Rev. Presc.*, 1994, 14, 481.
 Pajno G. B. et al., *Medico e Bambino*, 1991, 10, 20.
 Sears M. R. et al., *Br. Med. J.*, 1987, 294, 477.
 Taskar V. S. et al., *Br. Med. J.*, 1993, 306, 575.
 Valori A. M., *Br. Med. J.*, 1993, 306, 797.

MAURO MISELLI

INCIDENTALOMA: V. SURRENALI GHIANDOLE* (coll. *6900-6902).

INDOMETACINA [v. vol. VII, coll. 1741-1744; v. anche: vol. XIV, col. 2385]

Proprietà comune a tutti gli antinfiammatori non steroidei è la capacità di inibire la ciclossigenasi e quindi la sintesi di prostanoidei alcuni dei quali sono dotati di intensa attività utero stimolante (TXA₂, PGF). Su questa proprietà si è basato l'impiego dell'indometacina nel trattamento del parto prematuro: alla dose di 50 mg iniziali (generalmente per via rettale) seguiti da 25 mg ogni 6 ore per 2-3-giorni, il farmaco ha dimostrato la sua efficacia che tuttavia non può ritenersi scevra dal rischio di severi effetti collaterali sul feto. Fra questi la prematura chiusura del dotto arterioso, con conseguente ipertensione polmonare e insufficienza cardiaca fetale, è riconducibile alla stessa inibizione della ciclossigenasi con caduta della produzione placentare e vascolare fetale di PGE₂ che assicura il mantenimento della pervietà del dotto arterioso. Questo effetto, indesiderato sul feto e utile viceversa per il trattamento medico della persistenza del dotto arterioso nel neonato [v. NEONATO**, *emergenze cardiologiche neonatali*], sconsiglia l'impiego del farmaco come agente tocolitico.

Bibliografia

- American Hospital Formulary Service, *AHFS Drug Information*, 1992, American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda, p. 1089.
 Hardman J. C., Limbird L. E., eds., *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9 ed., 1996, McGraw-Hill, New York, pp. 633 e 947.
 Van den Veyver I. B., Moiso K. J. jr., Ou C. N., Carpenter R. J. jr., *Obstet. Gynecol.*, 1993, 82, 540.

RED.

INDUZIONE EMBRIONALE

1. embryonic induction.

SOMMARIO

DEFINIZIONE E PREMESSA	col. 2750
L'INDUZIONE NELLO SVILUPPO EMBRIONALE	col. 2750
L'INDUZIONE NELLA FORMAZIONE DEI TRE FOGLIETTI EMBRIONALI	col. 2754
Induzione del mesoderma (col. 2754). - Induzione neurale: eventi precoci (col. 2757). - Induzione neurale: eventi successivi (col. 2762). - Induzione dell'endoderma (col. 2764). - L'induzione dei tre foglietti embrionali comprende un meccanismo unico (col. 2764).	
INTERAZIONI INDUTTIVE RECIPROCHE	col. 2765
Eventi induttivi nello sviluppo dell'occhio (col. 2765) - Interazioni induttive nello sviluppo dell'arto dei Vertebrati (col. 2767).	

DEFINIZIONE E PREMESSA

L'idea che molti processi di sviluppo avvengano in quanto «accesi» da eventi di induzione è comparsa esplicitamente, sia nella storia del pensiero sullo sviluppo che nella corrispondente sperimentazione, alla fine dell'ottocento (Hamburger, 1988). Oggi l'induzione embrionale [i.e.] può essere definita come il processo attraverso il quale un gruppo di cellule determina, mediante l'emissione di particolari segnali biochimici, il destino differenziativo di un secondo gruppo di cellule. La sostanza di questa definizione è già presente nel problema posto da Wilhelm Roux — il fondatore della embriologia sperimentale — intorno al 1880, ossia se il differenziamento di una cellula fosse «autonomo», oppure «dipendente» da altre cellule. Sebbene Roux, personalmente, preferisse concepire il differenziamento cellulare come autonomo, il lavoro di altri embriologi, tra cui al primo posto Hans Driesch e Curt Herbst, spostò l'attenzione sull'importanza delle interazioni tra cellule. Il problema cruciale affrontato sia da Driesch che da Herbst intorno al cambio di secolo è lucidamente definito da Herbst: «stabilire il verificarsi di stimoli formativi esercitati da una parte dell'embrione sull'altra, ed eventualmente dimostrare la possibilità di una completa risoluzione dell'intera ontogenesi in una sequenza di tali induzioni» (traduzione propria). L'espressione, già allora antiquata, di «stimolo formativo» non deve trarre in inganno, in quanto viene usata dai due AA. come sinonimo di «induttore».

Rigorese evidenze sperimentali sulla esistenza della i.e. sono tuttavia fornite, per la prima volta, da un altro grande embriologo, straordinario sia per capacità sperimentali che per acume analitico, Hans Spemann, poi insignito (insieme a Hilde Mangold) del premio Nobel nel 1935. Osservando come lo sviluppo dell'occhio fosse un processo coordinato nel tempo e nello spazio, Spemann si chiese se tale coordinazione fosse garantita da un'interazione causale tra cellule, e quindi scelse tale sviluppo — ed in particolare la formazione del cristallino — per saggiare la possibile esistenza di interazioni induttive. Con lo studio sulla formazione del cristallino Spemann (1901) e, indipendentemente, l'americano Warren Lewis (1904) hanno documentato sperimentalmente il primo caso di induzione, e da allora l'induzione del cristallino (v. sotto) rappresenta un paradigma per il fenomeno di i. e.

L'INDUZIONE NELLO SVILUPPO EMBRIONALE

Attraverso un processo altamente regolato, la cellula uovo fecondata si trasforma nell'embrione in sviluppo, in cui si formano tessuti diversi che progressivamente danno origine ai diversi organi ed apparati (fig. 1). Questa complessa trasformazione è sostenuta da una serie di induzioni succes-

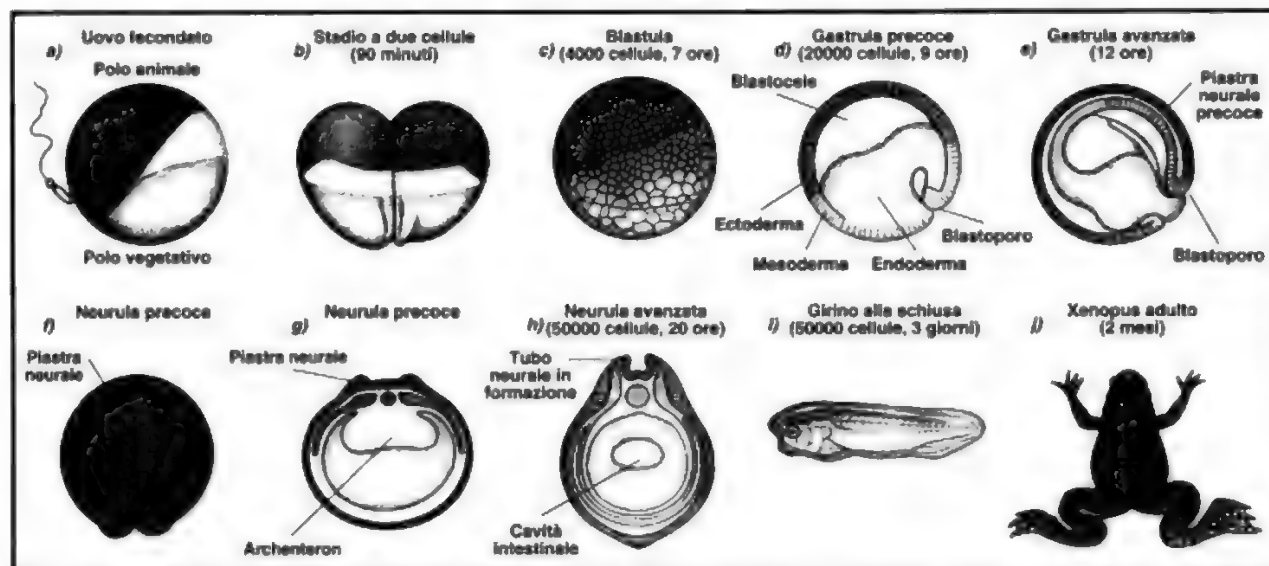


Fig. 1. Schema dello sviluppo degli anfibri (*Xenopus*). a-c) L'uovo fecondato si trasforma, attraverso rapide divisioni cellulari, in una sfera cava tappezzata da cellule (blastula). d-e) In una fase successiva (gastrulazione) movimenti cellulari complessi portano ad una nuova disposizione delle cellule dell'embrione (adesso chiamato gastrula), e conducono alla formazione dei tre foglietti embrionali fondamentali (ectoderma, mesoderma, endoderma). f-h) Con la neurulazione parte del foglietto ectodermico viene indotto a diventare piastra neurale; questa successivamente si ripiega nel tubo neurale, da cui trae origine il sistema nervoso, mentre internamente si formano un canale intestinale e gli abbozzi primari degli altri organi. i-j) Dalla larva natante si origina, dopo la metamorfosi, l'animale maturo. (Da De Robertis et al., 1990).

sive, basate su interazioni multiple tra diversi tipi cellulari, che attraversano tutto il corso dell'embriogenesi.

L'induzione può avvenire per apposizione di due strati o gruppi distinti di cellule oppure all'interno di uno stesso strato o gruppo di cellule. In entrambi i casi essa è mediata da una o più sostanze induttrici, eventualmente diffusibili secondo un gradiente di concentrazione, rilasciate da alcune cellule specializzate. Lo stabilirsi di un gradiente può evocare risposte diverse nelle cellule bersaglio, a seconda della concentrazione di induttore cui tali cellule vengono esposte: ne risulta un aumento della complessità dei tipi cellulari prodotti e/o una regionalizzazione dell'organo in sviluppo. Oggi sappiamo che l'azione di molecole secrete induttrici si esplica, a valle, attraverso la regolazione di specifici circuiti genici: tali circuiti comprendono, in posizione chiave, geni che codificano per fattori di trascrizione (ad es., geni con «homeobox» o altri domini per il legame al DNA [v. OMEOTICI GENI**]), perciò in grado di regolare l'attività di altri geni. D'altra parte, la stessa produzione di molecole secrete può essere controllata, a monte, da specifiche reti geniche (come esempi, v. sotto: sviluppo dell'occhio e dell'arto, rispettivamente col. **2765 e col. **2767).

In genere si distinguono due tipi di induzione: permissiva ed istruttiva. Nel caso dell'induzione permissiva il segnale induttore fa procedere le cellule bersaglio verso la loro normale via differenziativa; in assenza di tale segnale le cellule non sono in grado di differenziare ed il loro sviluppo viene arrestato. Al contrario, nel caso dell'induzione istruttiva le cellule sono in grado di seguire, in maniera autonoma, una propria via di sviluppo anche in assenza del segnale induttore: tale via è però diversa da quella che sarebbe stata intrapresa in presenza dell'induttore. Una restrizione al comportamento di una cellula, istruttiva, deriva dal fatto che ogni cellula può seguire un numero limitato di potenziali destini differenziativi: ciò dipende dalla sua competenza, definita come la capacità cellulare di rispondere in maniera specifica ad un determinato stimolo. Occorre comunque tenere

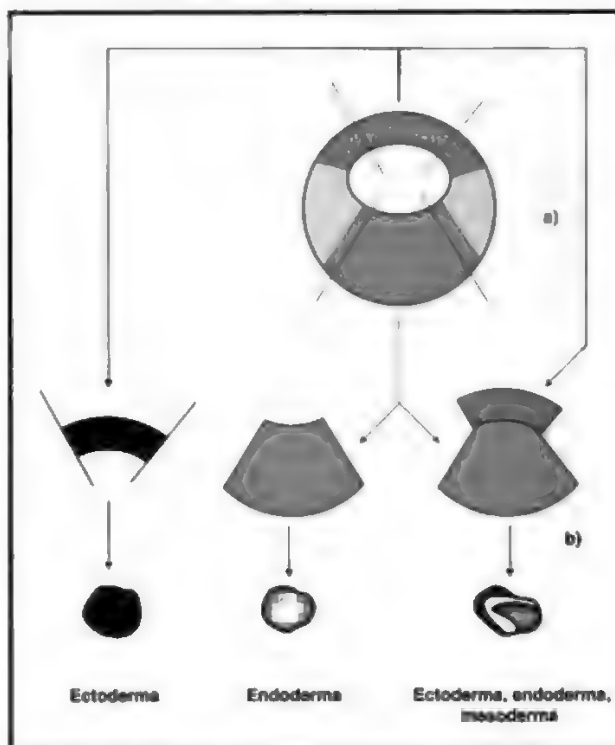


Fig. 2. Schema degli esperimenti di ricombinazione effettuati da Nieuwkoop. a) Le diverse aree colorate nell'embrione a stadio di blastula rappresentano i territori che daranno origine a ectoderma (in rosso), mesoderma (in giallo) ed endoderma (in blu). b) Combinando, allo stadio di blastula, espianti ectodermici con espianti endodermici si ottiene la formazione di tessuti di carattere mesodermico (in giallo), derivati dalla componente animale degli espianti. (Modificato da Green e Smith, 1991).

presente che non tutti i fenomeni dello sviluppo possono essere spiegati con eventi di tipo induttivo. In certi casi il destino differenziativo viene deciso da una distribuzione asimmetrica, fra cellule figlie, di particolari sostanze, chiamate *determinanti citoplasmatici*, presenti nella cellula progenitrice. Le due modalità di sviluppo — per induzione o per determinanti citoplasmatici — possono corrispondere rispettivamente ai concetti di «differenziamento dipendente» e di «differenziamento autonomo», enunciati da Roux: anche se i due concetti sono logicamente distinti, nella realtà le due modalità non sono alternative, bensì complementari, anche all'interno di uno stesso processo di sviluppo.

Molti degli studi classici, che a partire dalla fine del 1800 hanno dimostrato l'esistenza della i. e. e gettato le basi per la sua comprensione, sono stati eseguiti negli Anfibi, a causa della relativa facilità di manipolazione degli embrioni di questi Vertebrati. Ancora oggi gli Anfibi rappresentano un sistema di elezione per studi sull'induzione precoce. Lo sviluppo degli Anfibi segue, anche se con alcune specificità che lo contraddistinguono, lo schema generale di sviluppo di tutti i Vertebrati (fig. 1). La segmentazione, una prima fase di attive divisioni cellulari, termina con la formazione della *blastula*, una sfera contenente al suo interno una cavità chiamata *blastocoele*. Con i complessi movimenti della gastrulazione l'embrione introflette parte dei suoi territori cellulari entro il blastocoele, venendo così ad essere costituito da tre strati fondamentali, detti foglietti, disposti in modo concentrico: l'*ectoderma*, il più esterno, darà origine

ai tessuti epidermico e nervoso; il *mesoderma*, intermedio, formerà notocorda, tessuto muscolare e connettivo, sistema circolatorio, sistema escretore; l'*endoderma*, il più interno, formerà gli apparati digerente e respiratorio. La stessa formazione dei tre foglietti, o almeno di parte di essi, richiede l'intervento di fenomeni induttivi. Ad oggi, è avanzata la comprensione dei meccanismi di induzione del mesoderma e, nell'*ectoderma*, del tessuto neurale, mentre è ridotta la conoscenza sulla formazione della parte epidermica dell'*ectoderma*, e appena agli inizi quella sulla formazione dell'*endoderma*.

L'INDUZIONE NELLA FORMAZIONE DEI TRE FOGLIETTI EMBRIONALI

Induzione del mesoderma

Ricerche iniziate da Nieuwkoop negli anni '70 hanno dimostrato che il mesoderma si forma per induzione, mettendo così in luce quello che oggi si ritiene essere il primo evento induttivo dello sviluppo. Queste ricerche si basano sull'analisi di espianti provenienti dall'emisfero animale o da quello vegetativo della blastula, coltivati *in vitro* separatamente oppure a contatto (fig. 2). Nell'embrione, il mesoderma si forma nella *zona marginale*, ossia entro quell'anello di cellule della blastula che congiunge l'emisfero animale con quello vegetativo (figg. 1 e 2). La zona marginale, quando isolata, mostra la capacità di formare mesoderma solo se prelevata da una blastula a stadio tardivo, ma non da una blastula precoce, suggerendo che il destino mesodermico

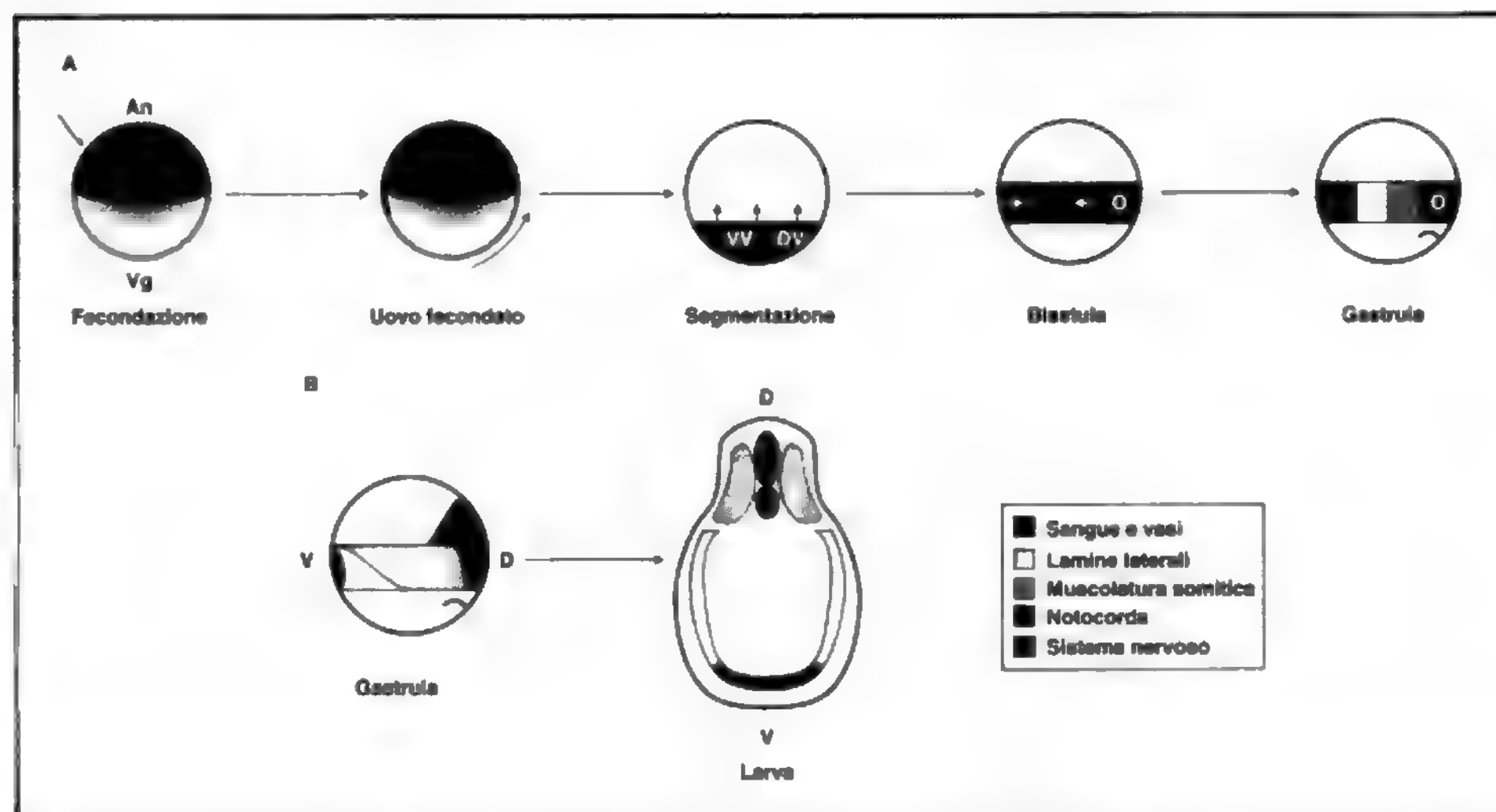


Fig. 3. Schema dell'induzione e regionalizzazione del mesoderma in *Xenopus*. A) Durante l'ovogenesi l'accumulo differenziale di organuli cellulari e componenti biochimici porta alla distinzione di una regione animale (An) ed una vegetativa (Vg) nell'uovo maturo. Movimenti citoplasmatici conseguenti alla fecondazione (rotazione corticale) individuano nella porzione vegetativa un quadrante dorso-vegetativo (DV) ed uno ventro-vegetativo (VV) che inviano segnali verso il polo animale. Durante la segmentazione, fino allo stadio di blastula, segnali dal quadrante ventro-vegetativo (FGF, BMP-4) inducono nella zona marginale un mesoderma di tipo ventrale, mentre segnali dal quadrante dorso-vegetativo (Xwnt-11, attivina, Vgl e forse anche noggin) inducono l'organizzatore di Spemann (O). Allo stadio di blastula tardiva e durante la gastrulazione, segnali antagonisti prodotti dall'organizzatore (noggin, chordin, follistatin) e dal mesoderma ventrale (BMP-4, Xwnt 8) producono la definitiva regionalizzazione dorso-ventrale del mesoderma. B) Mappa dei territori presuntivi dell'embrione durante la gastrulazione, nel corso della quale i foglietti embrionali assumono la disposizione spaziale definitiva, necessaria per le successive interazioni induttive. L'organizzazione dei tessuti mesodermici e neurali è mostrata in una sezione trasversale della larva. D) lato dorsale; V) lato ventrale. (Da Kessler e Melton, 1994).

INDUZIONE EMBRIONALE

venga stabilito nel corso della segmentazione. Inoltre, quando espianti provenienti dal polo animale (*animal caps*) e dal polo vegetativo della blastula vengono coltivati *in vitro* separatamente, danno origine rispettivamente a ectoderma e ad endoderma; al contrario, se vengono coltivati in contatto l'uno con l'altro, nell'espianto ectodermico compare tessuto mesodermico (fig. 2). L'insieme di questi risultati può essere correttamente interpretato ammettendo che l'emisfero vegetativo (a destino endodermico) produca un segnale che, agendo progressivamente durante la segmentazione, induce l'ectoderma a formare mesoderma. Il fatto che risultati simili siano stati ottenuti anche in altri Vertebrati fa pensare che l'induzione del mesoderma sia un fenomeno conservato durante l'evoluzione.

Il mesoderma embrionale non è omogeneo, ma regionalizzato, e le sue diverse regioni daranno origine a strutture diverse: il mesoderma dorsale formerà la notocorda e, in posizione parassiale, scheletro, muscoli e derma; l'intermedio formerà il sistema escretore e la componente somatica delle gonadi; il mesoderma latero-ventrale originerà il cuore, le cellule del sangue, la muscolatura liscia, mesenchima ed i rivestimenti delle cavità interne del corpo (fig. 3). Una questione non completamente risolta riguarda la relazione tra induzione e regionalizzazione del mesoderma. L'idea più soddisfacente è che induzione e regionalizzazione siano eventi congiunti, e oggi si ritiene che la regionalizzazione del mesoderma venga perfezionata in seguito a induzioni successive (figg. 3 e 4). Esperimenti di ricombinazione di espianti hanno suggerito che l'endoderma presuntivo di blastula precoce invii, verticalmente, due tipi di segnali verso la sovrastante zona marginale: uno — vegetativo dorsale — vi induce il mesoderma dorsale, e l'altro — vegetativo ventrale — il mesoderma ventrale. In questo modello, il mesoderma intermedio sarebbe prodotto dall'integrazione di segnali orizzontali di senso opposto, provenienti sia dal mesoderma dorsale che da quello ventrale, viaggianti entro la zona marginale.

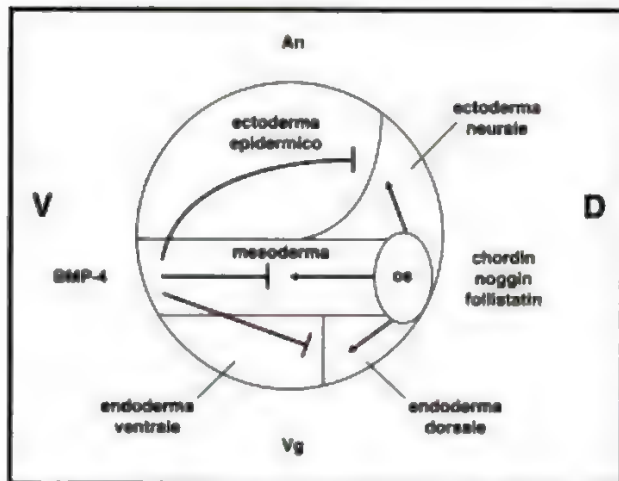


Fig. 4. Schema dei segnali molecolari antagonisti che inducono la differenziazione dorso-ventrale dei tre foglietti embrionali. Fattori dorsali (chordin, noggin, follistatin) prodotti dall'organizzatore di Spemann (ost) promuovono sia la neuralizzazione dell'ectoderma che la formazione del mesoderma (freccia), rimuovendo l'effetto inibitorio svolto da fattori ventrali (BMP-4). Dati recenti suggeriscono che lo stesso antagonismo possa svolgere un ruolo analogo nel regolare la differenziazione dorso-ventrale dell'endoderma. An) polo animale, Vg) polo vegetativo; D) lato dorsale; V) lato ventrale. (Modificato da Sasai et al., 1996)

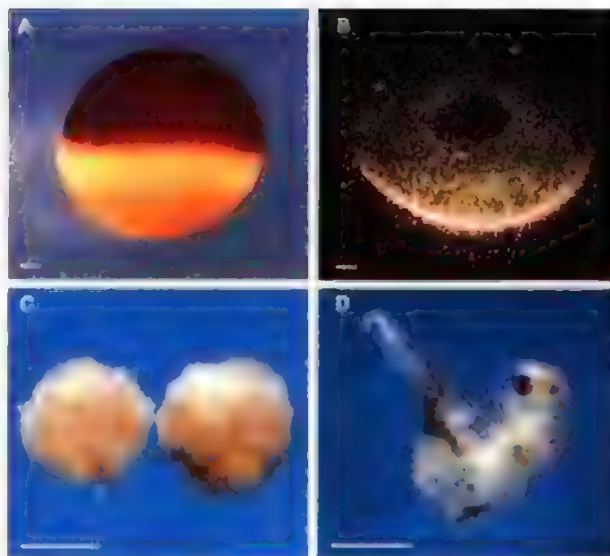


Fig. 5. Localizzazione ed attività biologica di Vg1. A) L'ovocita di *Xenopus* ha un singolo asse di simmetria, reso evidente da un polo animale pigmentato ed una regione vegetativa priva di pigmento. B) L'mRNA di Vg1, la cui distribuzione è qui mostrata in autoradiografia sotto forma di granuli luminosi, è localizzato al polo vegetativo dell'ovocita. La vescicola al centro è il nucleo. C) Espianti ottenuti dal polo animale di embrioni a stadio di blastula e coltivati in mezzo adeguato fino allo stadio di larva natante si differenziano in una semplice sfera ciliata di natura epidermica. D) La presenza di Vg1 nel mezzo di coltura induce, in questi espianti, la formazione di «embrioidi» contenenti mesoderma dorsale e tessuto neurale con una rudimentale organizzazione assiale e strutture anteriori, dotate di occhi. (Da Kessler e Melton, 1994).

Negli ultimi anni, un intenso campo di ricerca ha riguardato l'identificazione dei segnali di induzione del mesoderma. Recentemente sono state isolate proteine secrete in grado di mimare, in saggi biologici *in vitro* ed *in vivo*, l'attività di induzione mesodermica (fig. 3). I migliori candidati per il ruolo di induttori del mesoderma dorsale sono due membri della superfamiglia dei «Transforming Growth Factors- β » (TGF- β), Vg1 (fig. 5) e attivina, ed un'altra proteina secreta, Xwnt-11, appartenente alla famiglia genica *Wnt* (una famiglia correlata al fattore trasformante int di mammifero ed al gene *wingless* di *Drosophila*). I segnali che inducono il mesoderma ventrale risultano essere rappresentati da BMP-4 («Bone Morphogenetic Protein 4»), un altro fattore TGF- β , e dagli FGF («Fibroblast Growth Factors»). Infine, i segnali antagonisti rilasciati rispettivamente dalla porzione ventrale e dorsale del mesoderma, indotte nella zona marginale, sono rappresentati rispettivamente da BMP-4, ventralizzante, e da noggin, chordin e follistatin, proteine secrete di tipo diverso, ma tutte dotate di attività dorsalizzante. È importante notare che le tre proteine dorsalizzanti sono prodotte precisamente dall'«organizzatore di Spemann» (fig. 4; v. anche oltre), cioè da quella regione del mesoderma dorsale dell'embrione ove iniziano i movimenti di gastrulazione e che, all'inizio di tale processo, forma il «labbro dorsale del blastoporo» (fig. 1). Noggin, chordin e follistatin non sono «solo» dorsalizzanti del mesoderma. Con il procedere dello sviluppo queste tre importanti proteine continuano ad essere espresse nel mesoderma assiale, a partire dal quale svolgono un ruolo essenziale anche come induttori neurali.

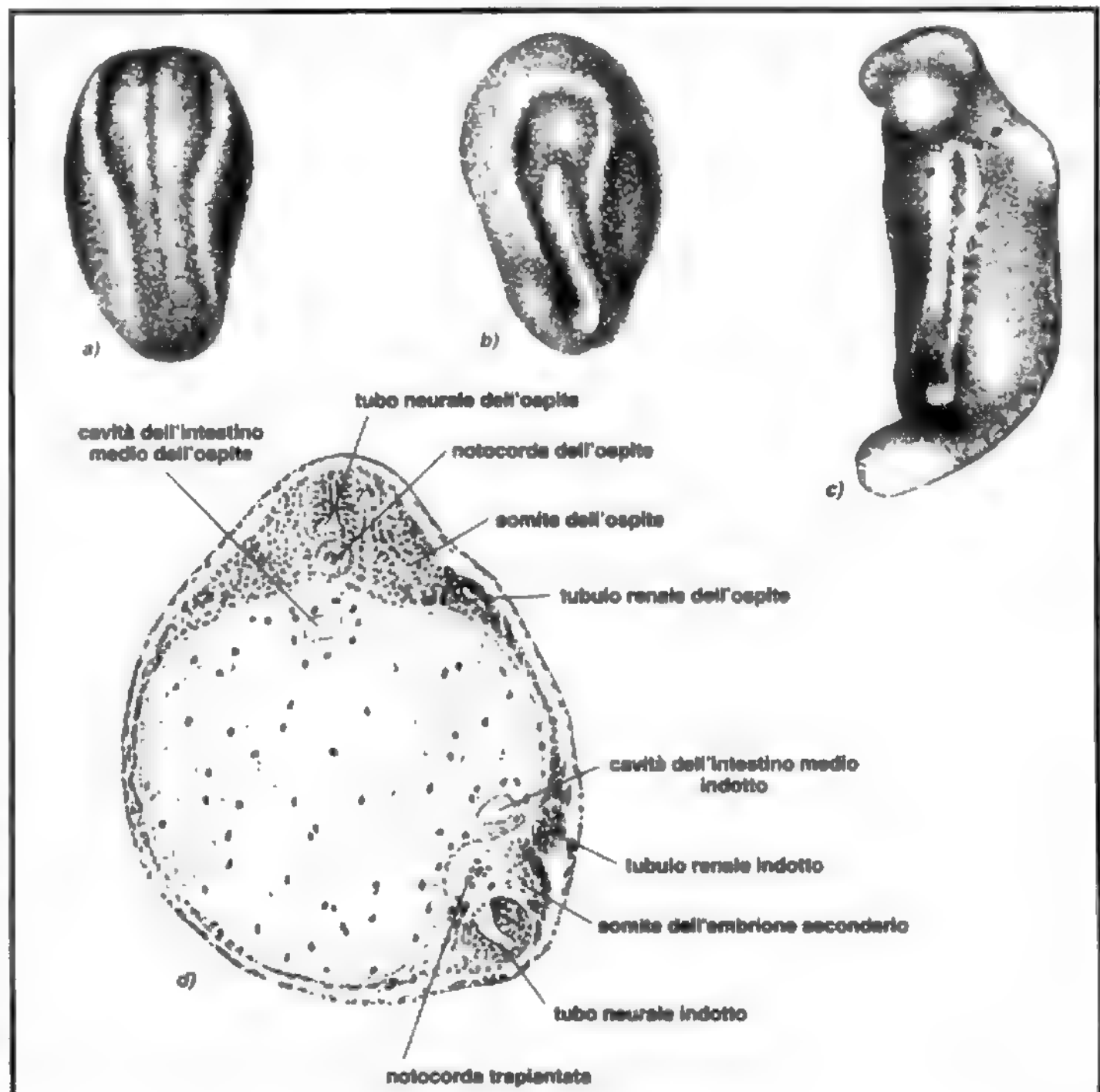
Induzione neurale: eventi precoci

Durante la gastrulazione ha luogo il successivo grande evento di i. e., l'induzione del tessuto nervoso, o induzione neurale, scoperta da Spemann e Mangold (1924). L'esperimento cruciale di Spemann e Mangold consisteva nel trapianto del labbro dorsale del blastoporo nella regione ventrale di un embrione ricevente. In queste condizioni, il labbro dorsale trapiantato è in grado di continuare la gastrulazione, modificando il destino differenziativo delle cellule dell'embrione ospite adiacenti al trapianto e reclutando nell'organizzazione di un secondo asse corporeo indipendente da quello primario (fig. 6, a-c). L'esito finale del trapianto è la formazione di un embrione secondario, unito per il ventre all'embrione ospite. In riconoscimento della straordinaria capacità di formare un embrione, il labbro dorsale del blastoporo fu chiamato *organizzatore primario*, oggi detto anche *organizzatore di Spemann*. All'interno dell'asse secondario, le cellule del trapianto vanno a costituire essenzialmente la notocorda, mentre gli altri tessuti si formano principalmente a spese dell'embrione ospite (fig. 6, d). In particolare, il tubo neurale viene formato dalle cellule dell'ectoderma ventrale, che, se non «disturbate» dal trapianto, avrebbero dato origine a epidermide. L'interpretazione di questo storico esperimento fu che la formazione del tubo neurale era dovuta ad un fenomeno di induzione che gli AA. chiamarono «primaria», in quanto ritenuta, all'epoca, il primo evento induttivo dello sviluppo.

Anche nell'anfiosso e nei Ciclostomi il labbro dorsale del blastoporo funziona come organizzatore e come induttore primario, mentre in Uccelli e Mammiferi, in relazione alle diverse modalità di gastrulazione, l'organizzatore corrisponde alla regione più anteriore della stria primitiva, conosciuta rispettivamente come «nodo di Hensen», o semplicemente «nodo». Quando trapiantato in regioni ectopiche, il nodo induce la formazione di strutture neurali sia nella stessa specie, che — perfino — nell'embrione dell'anfibio *Xenopus*. In ogni caso, le strutture indotte mostrano corrette polarità antero-posteriori e dorso-ventrali, il che significa che l'induzione comporta l'attribuzione di una corretta organizzazione spaziale. Le evidenze molecolari attualmente disponibili (v. sotto) indicano che induzione neurale precoce e acquisizione di identità regionale lungo l'asse antero-posteriore da parte delle cellule neurali siano processi interconnessi, e non indipendenti.

Lo stesso Spemann suggerì due modalità attraverso le quali poteva avvenire l'induzione neurale. Il mesoderma dell'organizzatore può inviare all'ectoderma segnali che si propagano lungo il piano che unisce mesoderma ed ectoderma e che vengono perciò chiamati *planari*. Oltre a questi, il mesoderma, che si è già involuto con la gastrulazione, è in grado di inviare *segnali verticali* all'ectoderma sovrastante (fig. 7). Un problema non completamente risolto è quanto i due tipi di segnale funzionino nell'embrione. Evidenze sia di embriologia sperimentale che molecolari (v. sotto) sono a favore di una funzione induttiva dei segnali

Fig. 6. Esperimento di Spemann e Mangold. Il labbro dorsale del blastoporo di una giovane gastrula di *Triturus* veniva trapiantato sul lato ventrale di una gastrula ospite. a) e b) Embrione, precedentemente sottoposto a trapianto, allo stadio di neurula: a) piastra neurale (vista dall'alto) dell'embrione ospite; b) piastra neurale secondaria, posta lateralmente. c) Lo stesso embrione allo stadio di bottone caudale, con l'embrione secondario indotto su un lato. d) Lo stesso embrione in sezione trasversale. In basso è visibile l'asse secondario: le cellule più chiare derivano dal trapianto, quelle più scure dall'ospite. Il labbro dorsale trapiantato forma la notocorda, parte dei somiti ed il pavimento del tubo neurale, mentre i tessuti dell'ospite vanno a costituire il tubo neurale, i somiti e l'intestino dell'asse secondario. (Da Balinsky, 1980, secondo Spemann, 1938).



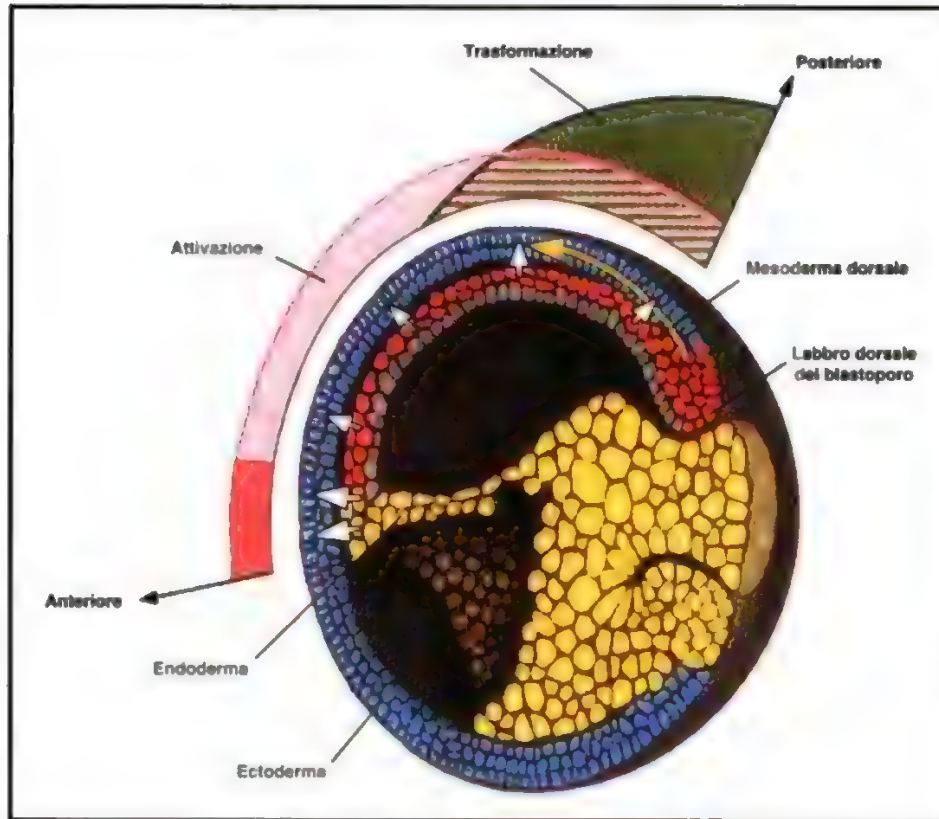


Fig. 7. Induzione neurale in *Xenopus*. Allo stadio di gastrula tardiva, mostrato in sezione, le cellule involute hanno raggiunto il limite anteriore del sistema nervoso presuntivo. Segnali verticali (freccie bianche) dall'endoderma (giallo) e mesoderma (arancione) anteriori inducono un destino neurale nel sovrastante ectoderma (blu). Tessuto neurale anteriore (rosa scuro) viene indotto dall'endoderma e mesoderma più anteriori. Livelli più posteriori di ectoderma (rosa chiaro) vengono prima «attivati» (I^a fase del modello di Nieuwkoop dell'induzione neurale: «attivazione») e successivamente «trasformati» da un gradiente di attività trasformante (II^a fase del modello di Nieuwkoop: «trasformazione»). La freccia gialla mostra la direzione in cui si propagano segnali planari (Da Lumsden e Krumlauf, 1996).

verticali. D'altro canto, il ruolo dei segnali planari è in genere studiato in espianti di Keller (fig. 8) o in esogastrule (fig. 9), cioè in porzioni di embrioni, o interi embrioni, coltivati in condizioni che prevengono l'involuzione del mesoderma, impedendo quindi l'attuarsi di ogni segnale verticale. Nonostante ciò, in entrambi i casi si rileva, nell'ectoderma, l'espressione di geni tipici del tessuto nervoso (figg. 8 e 9). È veramente rimarchevole il fatto che i geni neurospecifici siano espressi, lungo l'asse antero-posteriore sia di esogastrule che di espianti di Keller, nello stesso ordine con cui sono espressi nell'embrione normale (fig. 8). Tuttavia, nel caso di entrambe le manipolazioni non si ottiene una

normale morfogenesi del sistema nervoso, come dimostrato dall'assenza di un tubo neurale e degli occhi, né un completo differenziamento lungo l'asse dorso-ventrale: ciò indica che morfogenesi e differenziamento dorso-ventrale richiedono l'ausilio dei segnali verticali.

Tra le diverse teorie proposte per l'induzione neurale quella formulata da Nieuwkoop nel 1952 ha recentemente ottenuto il maggior sostegno dalle evidenze sperimentali (fig. 7). Secondo questo modello, chiamato «Attivazione-Trasformazione», l'ectoderma verrebbe prima indotto a diventare neuroectoderma anteriore («Attivazione») e, successivamente, in seguito ad un secondo segnale, parte di

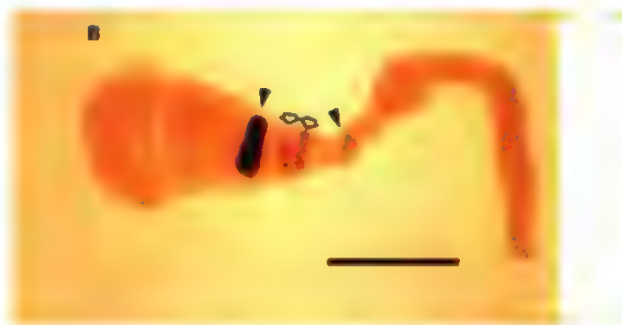
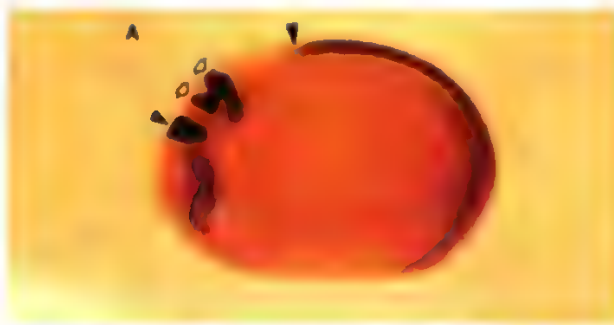


Fig. 8. Induzione neurale in espianti di Keller. La localizzazione di geni espressi nel sistema nervoso viene confrontata in un embrione normale (A) e in un esplanter di Keller (B). Nell'esplanter di Keller, un frammento dorsale di gastrula precoce, contenente territori presumibilmente di neuroectoderma ed ectoderma, viene coltivato sotto un vetrino in modo da impedire l'involuzione del mesoderma e prevenire così l'insorgere di segnali neuralizzanti verticali, ma non di quelli planari. In queste condizioni l'esplanter si auto-induce producendo i marcatori neurali che presenta normalmente nell'embrione intero, ed esprime i marcatori neurali *en-2*, *Antennapedia* (*B*) con la stessa disposizione antero-posteriore che si osserva, per gli stessi geni, nell'embrione intatto (A). Ciò dimostra che segnali planari sono sufficienti per l'induzione neurale e per il «patterning» antero-posteriore. (Da Domach, 1993).

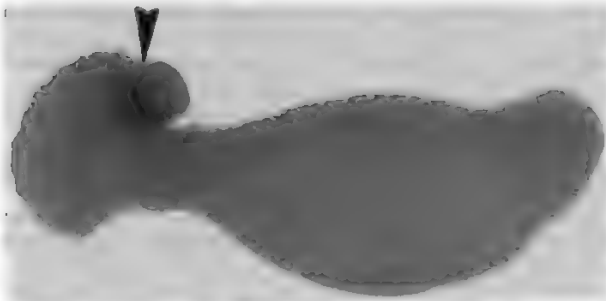


Fig. 9. Espressione del gene *Xotx1* (marcatore neurale anteriore) nella esogastrula dell'anfibio anuro *Xenopus laevis*, analizzata per ibridazione *in situ*. L'esogastrula è stata ottenuta coltivando l'embrione in una soluzione ipertonica a partire dallo stadio di blastula. Il segnale dovuto all'ibridazione è visibile nella regione neuroectodermica (a sinistra; punta di freccia), mentre la vescicola mesoendodermica (a destra) non è marcata. In queste condizioni di sviluppo l'ectoderma si differenzia senza essere in diretta sovrapposizione con il mesoendoderma e quindi senza ricevere segnali verticali da questo. Gli unici segnali che possono giungere all'ectoderma dal mesoendoderma sono quindi di tipo planare. (Da Kablar et al., 1996).

esso verrebbe riconvertito in neuroectoderma posteriore («Trasformazione»).

Negli ultimi anni sono state identificate alcune molecole, quali buoni candidati per il ruolo di induttore («attivatore») neurale. Si tratta ancora di noggin, chordin e follistatin, proteine secrete dall'organizzatore di Spemann e, con la gastrulazione, dal cordomesoderma internalizzato: oltre ad esercitare un ruolo nella induzione del mesoderma, esse hanno in comune anche la capacità di indurre l'ectoderma a diventare neuroectoderma anteriore, riproducendo così il fenomeno di «attivazione» del modello di Nieuwkoop. Possibili agenti «trasformanti» sono invece l'ac. retinoico e FGF: queste molecole esercitano infatti un'azione posteriorizzante su un tessuto neurale già indotto. In particolare è stato dimostrato che l'ac. retinoico viene liberato in quantità crescenti dal labbro dorsale del blastoporo durante la gastrulazione, potendo così esercitare un ruolo «trasformatore» in senso posteriore.

Come agiscono i putativi induttori neurali? Il modello attuale propone che il differenziamento neurale, in *Xenopus* e presumibilmente in altri Vertebrati, sia dovuto ad un sistema di segnali antagonisti, costituiti da BMP-4 e da molecole secrete dall'organizzatore di Spemann (fig. 4). È stato recentemente dimostrato che noggin, chordin e follistatin possono legare direttamente BMP-4: questo legame potrebbe impedire l'interazione tra BMP-4 ed il proprio recettore, e quindi la conseguente trasduzione del segnale di BMP-4 ed i suoi effetti sul destino cellulare. BMP-4 è ampiamente espresso nell'emisfero animale degli embrioni di anfibio, tranne che nell'organizzatore di Spemann, e la sua espressione scompare dalla piastra neurale, una volta indotta. L'insieme di questi dati fa ritenere che BMP-4 funzioni come agente antineurogenico, e che la sua presenza impedisca alle cellule ectodermiche di attuare un destino neurale: l'induzione neurale consisterebbe quindi nella rimozione di un'inibizione, rimozione operata dal legame di noggin, chordin e follistatin con BMP-4.

Quanto questo modello sia applicabile ad altri Vertebrati, e in particolare ai Mammiferi, rimane ad oggi un problema aperto. Per il momento, studi di inattivazione genica mirata, condotti in topo, non confortano i risultati degli studi per guadagno di funzione, svolti in *Xenopus*; tuttavia, ciò potrebbe essere spiegato se l'attività del gene inattivato fosse compensata da altri geni della stessa famiglia.

Sorprendentemente, e nonostante il grande salto evolutivo, il modello di induzione neurale desunto dagli studi in *Xenopus* (fig. 4) riceve supporto da studi sulla formazione dell'ectoderma neurogenico nell'Insetto Dittero *Drosophila*. In *Drosophila*, il prodotto del gene *decapentaplegic* (*dpp*) è l'omologo di BMP-4, ed anche in *Drosophila* la proteina decapentaplegic agisce come soppressore della neurogenesi. Inoltre, il gene di *Drosophila* omologo a *chordin*, *short-gastrulation* (*sog*), antagonizza *dpp* e promuove la formazione del sistema nervoso della mosca. Intellettualmente, è di grande soddisfazione l'aver trovato che l'induzione neurale funziona, sia in Insetti che in Vertebrati, con un sistema di fattori secreti antagonisti, evolutivamente conservato (De Robertis e Sasai, 1996).

Induzione neurale: eventi successivi

In molti casi, durante lo sviluppo un tessuto indotto diviene, a sua volta, in grado di indurne un altro. Un esempio di induzioni successive è fornito proprio dagli eventi che de-

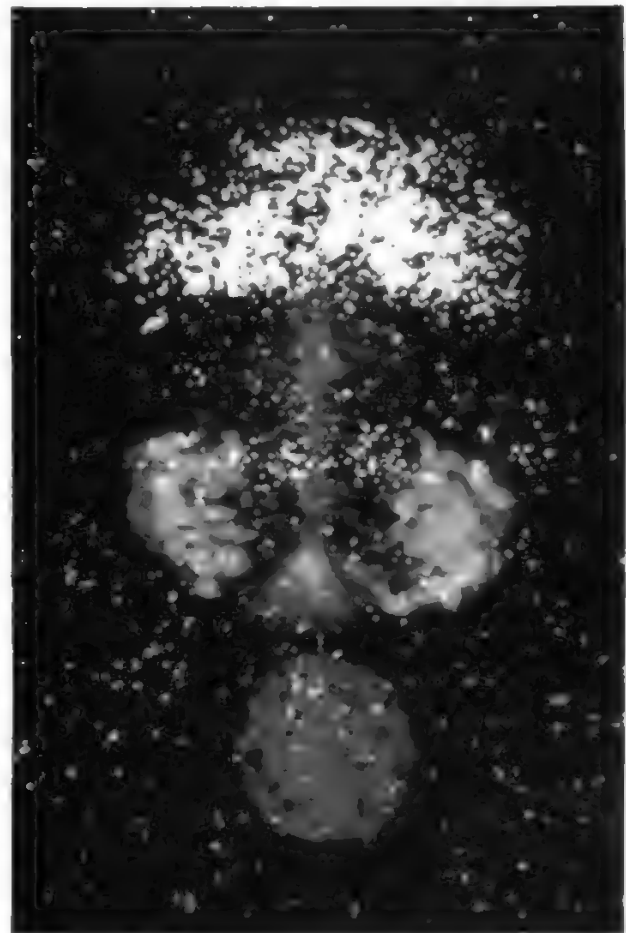


Fig. 10. Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale, messa in evidenza attraverso la rivelazione di marcatori neurali. La sezione trasversale di midollo spinale di embrione di pollo mostra i domini di espressione della glicoproteina di membrana SC1 (immunostochimica, in verde), della proteina contenente oncodominio Islet-1 (immunostochimica, in arancione) e dell'RNA messaggero della proteina secreta dorsalin (ibridazione *in situ*, in bianco-azzurro). SC1 è espressa nella notocorda, nel pavimento del tubo neurale e nei motoneuroni. Islet-1 è espressa nei motoneuroni. L'espressione del messaggero di dorsalin è ristretta alla porzione dorsale del tubo neurale. (Da Gilbert, 1994).

finiscono il «pattern» dorso-ventrale del sistema nervoso (fig. 10). Esperimenti di espianto o di trapianto in embrioni di pollo e di *Xenopus*, analisi di embrioni mutanti nel pesce zebra (*Danio rerio*) o nel topo, e studi di differenziamento *in vitro*, hanno dimostrato che la notocorda è all'inizio di questa serie di eventi induttivi (fig. 11). Segnali verticali inviati dalla notocorda inducono la porzione longitudinale mediana del tubo neurale a differenziarsi nel pavimento del tubo neurale («floorplate»), ed innescano il differenziamento in senso ventrale dei neuroni situati nelle porzioni ventro-laterali del tubo stesso. A sua volta, la «floorplate» indotta diviene capace di generare gli stessi tipi di segnali e quindi di contribuire al differenziamento dei neuroni ventrali, ad essa laterali. Tutti questi segnali sono mediati dalla proteina secreta «Sonic Hedgehog» (SHH), che è necessaria e sufficiente a indurre tipi cellulari ventrali nel tubo neurale. Tale proteina è inizialmente prodotta dalla notocorda, da cui diffonde fino al pavimento del tubo neurale. L'espressione, nella notocorda, di *Shh* è attivata dal fattore di trascrizione HNF-3 β , che è prodotto dal labbro dorsale del blastoporo negli Anfibi e dal nodo nel topo: i dati finora a disposizione mostrano che durante lo sviluppo HNF-3 β attiva *Shh* il quale, a sua volta, scatena una reazione di attivazione reciproca con HNF-3 β . Di fatto, sia l'espressione ectopica di HNF-3 β che di *Shh* riproducono gli effetti del trapianto della notocorda. Inoltre l'assenza del gene codificante per HNF-3 β o per SHH, ottenuta in topi manipolati con tecniche di ingegneria genetica, provoca il mancato sviluppo della notocorda e del pavimento del tubo neurale. SHH esercita la sua funzione inizialmente inibendo l'espressione di alcuni fattori di trascrizione (della famiglia *Pax*) lungo la linea mediana della piastra neurale: tale inibizione è un prerequisito per la generazione di tipi cellulari ventrali. Forse, la scelta successiva di un preciso destino neuronale ventrale (motoneurone, interneurone) può dipendere da soglie di concentrazione della proteina SHH, cui le cellule vengono esposte.

Oltre ai segnali trasmessi dalla proteina SHH, necessari per il differenziamento ventro-laterale, la corretta regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale richiede anche segnali antagonisti rilasciati dal lato dorsale (fig. 11). Anche

in questo caso, un primo segnale deriva da un tessuto non neurale, e precisamente dall'ectoderma dorsale, adiacente alla piastra neurale: questo segnale è mediato da fattori della famiglia BMP. Dopo la chiusura del tubo neurale, diversi fattori sono espressi dalla porzione dorsale del tubo stesso. Questi segnali sono ancora rappresentati da proteine della famiglia dei BMP, ed inoltre da dorsalin (fig. 10), una proteina di tipo TGF- β che svolge anche un ruolo specifico nel differenziamento delle creste neurali. L'insieme di questi fattori secreti induce la formazione di specifici, e diversi, neuroni dorsali.

Induzione dell'endoderma

In contrasto con l'abbondanza di informazioni disponibili per l'induzione neurale e mesodermica, solo oggi emergono indicazioni sui meccanismi molecolari che controllano la formazione dell'endoderma. Come per l'induzione neurale, è il classico esperimento di Spemann e Mangold (1924) all'origine dell'idea che l'endoderma si formi in seguito a interazioni induttive: il trapianto del labbro dorsale del blastoporo dava infatti origine, nell'embrione «gemello», anche a un tubo intestinale secondario (fig. 6, d). È recentemente emerso che l'induzione dell'endoderma, attuata dal labbro dorsale del blastoporo, potrebbe essere mediata, almeno in parte, dalle stesse proteine secrete chordin e noggin, implicate nell'induzione neurale e nella dorsalizzazione del mesoderma. Anche nel caso della induzione dell'endoderma, l'azione delle due proteine è contrastata dal fattore BMP-4 (fig. 4). L'interpretazione di questi dati propone — anche se di questo mancano prove certe — che attraverso questo meccanismo venga indotta l'endoderma dorsale.

L'induzione dei tre foglietti embrionali comprende un meccanismo unico

I risultati molecolari riguardanti l'induzione dell'endoderma estendono il gioco antagonista di noggin, chordin e follistatin, da un lato, e BMP-4, dall'altro, a tutti e tre i foglietti embrionali. Ciò presenta un nuovo scenario di somiglianza e continuità tra gli eventi induttivi precoci dello sviluppo, prima considerati nettamente distinti. Nei tre foglietti, le proteine secrete prodotte dall'organizzatore agiscono

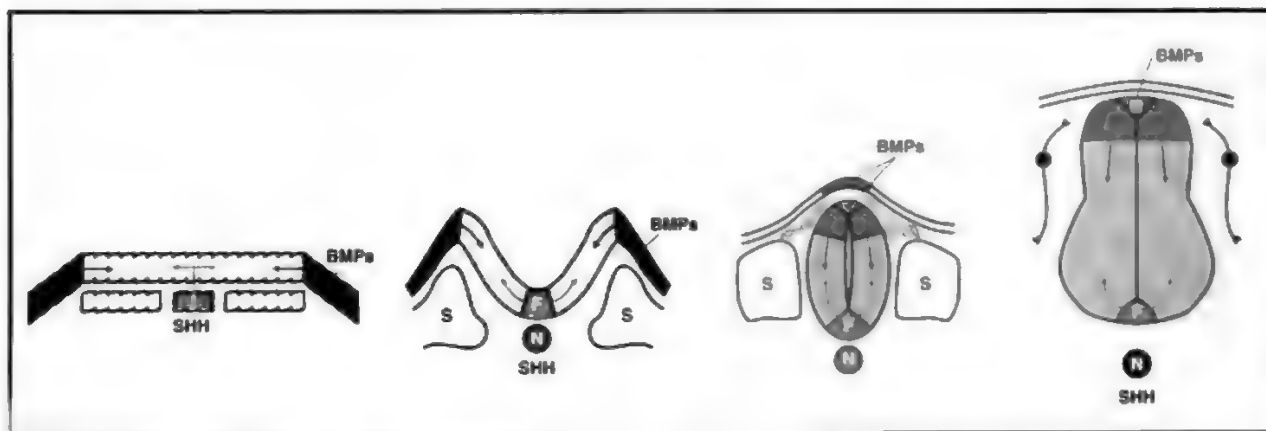


FIG. 11. Segnali antagonisti nella formazione del tubo neurale. In figura è schematizzata l'azione di segnali ventralizzanti (Sonic Hedgehog, SHH) e di segnali dorsalizzanti (BMPs, in arancione) durante diverse fasi della neurulazione. SHH viene inizialmente espresso dalla notocorda (N) e induce la formazione della piastra neurale (P). I fattori di tipo BMP sono prodotti dalle cellule dell'ectoderma epidermico che fiancheggia lateralmente la piastra neurale. Quando il tubo neurale si solleva, SHH inizia ad essere espresso dalle cellule della «floor plate» (F) e i fattori BMP dalla porzione dorsale del tubo neurale. Dopo la chiusura del tubo neurale, l'espressione dei fattori BMP è ristretta al tetto del tubo neurale («roof plate»). BMP agisce in dorsali adiacenti: nell'ectoderma epiteliale l'espressione è solo a carico della regione dorsale («noto-chordal»). Con l'inizio del differenziamento neuronale, l'espressione dei fattori BMP persiste nel tubo neurale dorsale, mentre quella di SHH viene mantenuta nella «floor plate» (Dai Tamabe e Jessell, 1996).

contrastando un segnale ventralizzante, rappresentato da BMP-4 (fig. 4). La diversa risposta — formazione di tessuto neurale, mesoderma dorsale o endoderma dorsale — deve dipendere dalle cellule bersaglio. È sorprendente il fatto che le tre proteine *noggin*, *chordin* e *folistatin* possano tutte antagonizzare (apparentemente legandolo) BMP-4, pur essendo strutturalmente non correlate. Altri fattori (parte dei quali presentati nei paragrafi precedenti) sono certamente implicati in questi primi processi induttivi dello sviluppo, che formano i foglietti fondamentali per la costruzione di tutti gli organi e apparati del corpo: sbrogliare la rete di connessione tra tutte le molecole implicate è attualmente oggetto di intensa ricerca.

INTERAZIONI INDUTTIVE RECIPROCHE

Molti organi dell'individuo adulto sono composti da tipi cellulari diversi, che cooperano per una determinata funzione. Frequentemente, la diversità tessutale degli organi è il prodotto di interazioni induttive tra popolazioni diverse di cellule embrionali, interazioni che possono presentare il carattere della reciprocità. Ad esempio, la formazione del rene, quella del polmone e del dente sono realizzate tramite interazioni induttive reciproche tra epitelio e mesenchima. Anche la formazione dell'occhio e quella dell'arto comprendono l'intervento di eventi induttivi reciproci.

Eventi induttivi nello sviluppo dell'occhio

Come aveva riconosciuto Spemann, la formazione dell'occhio dei Vertebrati è un chiaro esempio di come una sequenza di eventi induttivi possa modellare lo sviluppo di organi specifici. Le cellule che daranno luogo al cristallino derivano da una regione di ectoderma anteriore che riceve segnali induttivi planari, inviati dalla retina presuntiva, e segnali verticali, rilasciati dapprima dall'endoderma faringeo e successivamente dalla vescicola ottica (fig. 12). L'azione progressiva di questi segnali, che inizia con la gastrulazione e termina con l'organogenesi, fa sì che la regione presuntiva del cristallino diventi sempre più determinata verso il suo destino finale, che culmina con il caratteristico differenziamento cellulare che permette a questa regione di funzionare come lente. Molto prima che il differenziamento sia giunto a termine, il cristallino è in grado di funzionare esso stesso come tessuto induttore. Infatti, in un gioco di induzioni reciproche, il cristallino svolge a sua volta un ruolo importante nell'indurre la vescicola ottica a differenziare la retina neurale. Inoltre, l'ectoderma sovrastante il cristallino, probabilmente già condizionato (reso competente) da segnali ricevuti in stadi più precoci dello sviluppo, in seguito ad un'altra induzione promossa dal cristallino, va incontro al differenziamento che lo farà diventare cornea.

Diversi fattori secreti sono indicati come i possibili responsabili dei processi induttivi della formazione dell'occhio. È stato possibile dimostrare, sia in colture cellulari che in topi transgenici, che FGF (*Fibroblast Growth Factor*) svolge un ruolo nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule del cristallino. BMP-7 è un altro fattore secreto sicuramente coinvolto nello sviluppo dell'occhio in quanto l'assenza di questo gene provoca nel topo un mancato sviluppo del cristallino; al momento non è però ancora chiaro a quale stadio BMP-7 svolga la sua azione.

Infine, l'ac. retinoico sembra svolgere un ruolo importante nello sviluppo e nella regionalizzazione della retina. L'ac. retinoico viene sintetizzato nella retina da due diverse aldeide-deidrogenasi, una presente nella retina dorsale ed un'altra, molto più efficiente, localizzata nella porzione ventrale della retina. La diversa efficienza nella produzione di ac. retinoico da parte di questi due enzimi provoca un gradiente di concentrazione con il massimo nella retina ven-

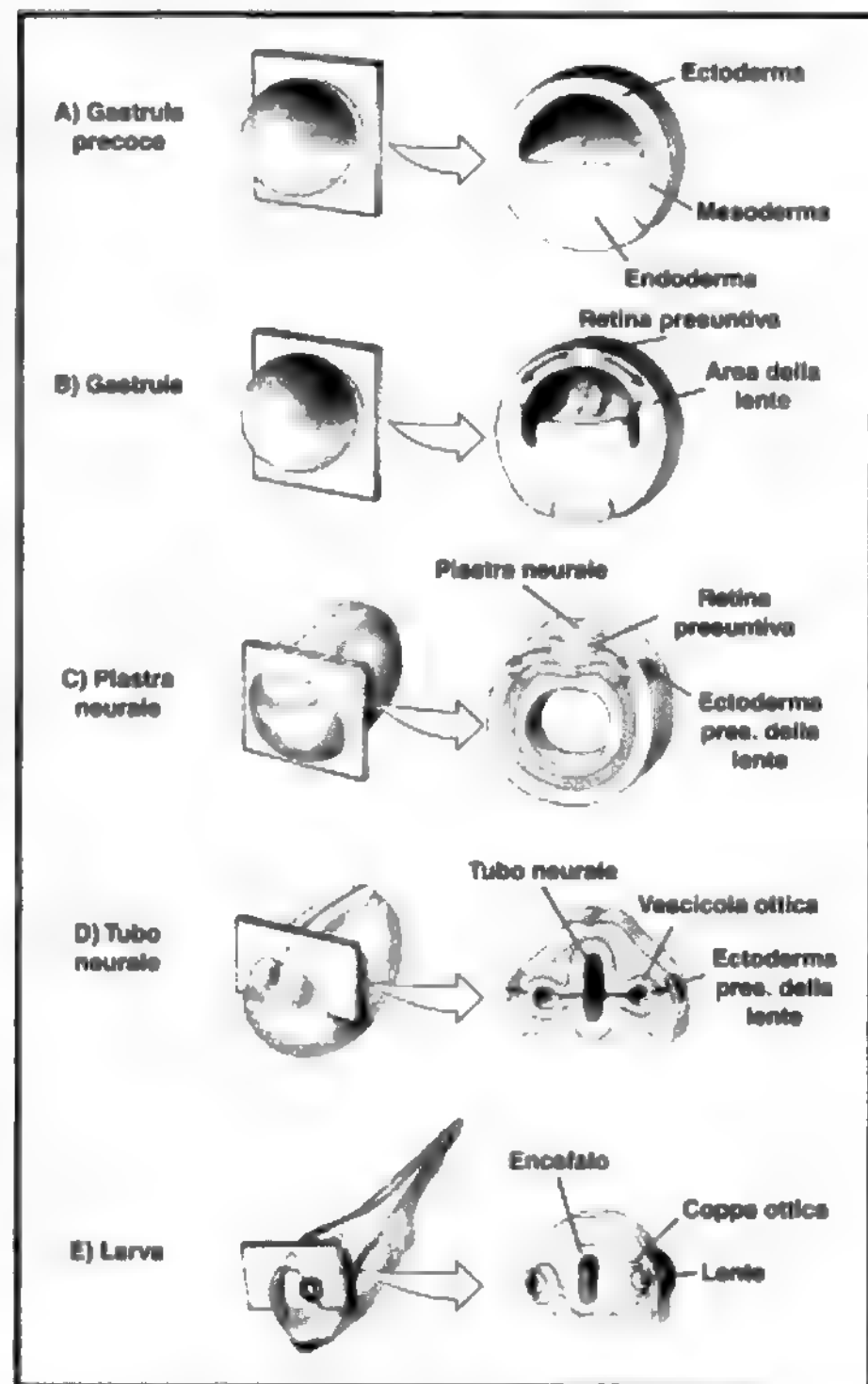


Fig. 12. Induzione della lente. Le frecce indicano i segnali induttivi. A) Allo stadio di gastrula precoce l'ectoderma non è ancora competente a divenire lente, benché possa essere indotto in senso neurale. B) Durante la gastrulazione l'ectoderma presuntivo della lente diviene competente a rispondere a specifici segnali provenienti dalla piastra neurale presuntiva (probabilmente dalle cellule presuntive della retina) e che inducono la lente. Al termine della gastrulazione questi segnali, e forse anche segnali provenienti dall'endoderma anteriore, inducono uno stato di competenza nell'ectoderma presuntivo della lente. C) Allo stadio di neurula precoce, i segnali induttivi stabiliscono nell'ectoderma lentogeno una forte tendenza a divenire lente, senza peraltro specificarlo definitivamente. D) Allo stadio di neurula tardiva la vescicola ottica entra in contatto con l'area presuntiva della lente, causandone la definitiva determinazione. E) Durante lo stadio di larva l'ectoderma lentogeno si differenzia in lente. (Da Grainger, 1992).

trale. Esperimenti eseguiti sull'embrione del pesce zebra hanno mostrato che applicazioni localizzate di ac. retinoico portano ad una duplicazione della retina ventrale e della fessura coroidea (una struttura ventrale dove passano nervo ottico e vasi), indicando che l'ac. retinoico è importante nella determinazione dell'asse dorso-ventrale della retina.

Un ruolo essenziale nello sviluppo dell'occhio è stato recentemente attribuito al gene che codifica per il fattore di trascrizione Pax-6, appartenente alla famiglia dei geni «homeobox» di tipo «paired». Mutazioni in questo gene nel topo provocano il fenotipo *small eye* caratterizzato da occhi non completamente sviluppati nell'eterozigote, oppure del

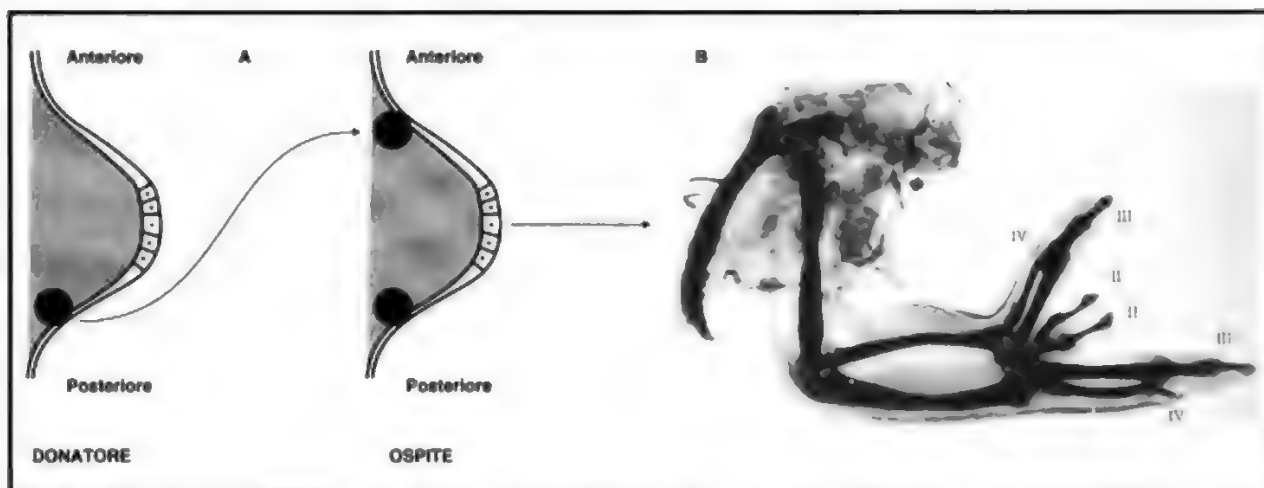


Fig. 13. A) Esperimento di trapianto della zona di attività polarizzante (ZPA). La ZPA (evidenziata in nero) di un abbozzo dell'arto di un embrione donatore viene trapiantata in posizione anteriore nell'abbozzo dell'arto di un embrione ricevente. B) La presenza di una ZPA ectopica induce una serie completa di dita distribuite in ordine speculare rispetto alle dita indotte dalla ZPA endogena. (Modificato da Gilbert, 1994).

tutto assenti nell'omozigote. Nell'uomo mutazioni nello stesso gene sono responsabili della sindrome congenita nota come *aniridia* (v. OCCHIO, X, 1420-1421, fig. 12; v. UVEA, XV, 1527; fig. 1), che porta alla riduzione o totale assenza dell'iride spesso accompagnata da difetti nella cornea, retina e nervo ottico, e della *anomalia di Peter* che risulta nell'opacità della cornea ed in adesioni tra cornea e cristallino. L'importanza di *Pax-6* nello sviluppo dell'occhio è sottolineata dalla sua conservazione evolutiva. Esperimenti di espressione ectopica del gene *Pax-6* di topo in *Drosophila* hanno infatti mostrato che questo gene è in grado di indurre la formazione di occhi con fotorecettori funzionanti persino in strutture normalmente non competenti come le antenne o le ali. *Pax-6*, che è stato definito un gene «master», sembra quindi rivestire un alto ruolo gerarchico nel controllo genetico dello sviluppo dell'occhio.

Interazioni induttive nello sviluppo dell'arto dei Vertebrati

L'arto dei Vertebrati si forma tramite interazioni induttive multiple tra un mesenchima ed un epitelio, e il suo sviluppo è molto simile in tutti i tetrapodi. I territori presuntivi degli arti vengono determinati nel mesoderma durante la gastrulazione e gli abbozzi degli arti si formano in seguito all'interazione tra questi territori e l'ectoderma sovrastante.

La prima manifestazione dello sviluppo dell'arto consiste nella formazione di una «gemma dell'arto», costituita da uno strato più profondo di natura mesodermica ed uno superficiale epidermico. Da queste due componenti e dalle loro interazioni induttive dipende lo sviluppo di un arto completo, correttamente regionalizzato nei tre assi principali (prossimo-distale, antero-posteriore, dorso-ventrale). Il mesenchima della gemma dell'arto inizialmente induce un ispessimento della porzione apicale dell'ectoderma della gemma stessa, che forma così la «cresta ectodermica apicale» (*Apical Ectodermal Ridge*; AER). La AER è necessaria sia per il corretto accrescimento che per la corretta regionalizzazione in senso prossimo-distale: la sua rimozione, o il suo mancato sviluppo, causa la formazione dei soli elementi prossimali dell'arto, mentre quanto più la rimozione è tardiva tanto più completo appare l'arto. Una volta indotta dal mesenchima sottostante, la AER a sua volta emette segnali necessari al mantenimento di una zona

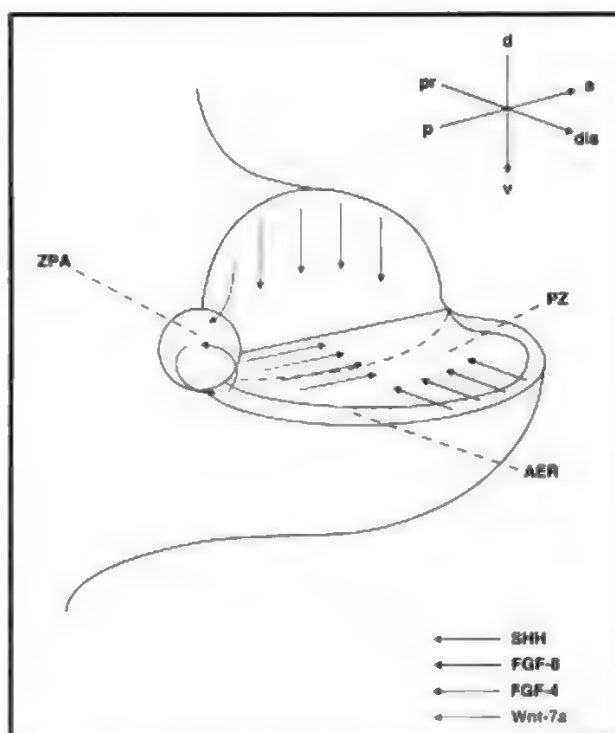


Fig. 14. Schema delle interrelazioni esistenti tra diverse molecole di segnale durante lo sviluppo dell'arto. Fattori del tipo degli FGF (FGF-8, frecce blu) favoriscono l'allungamento prossimo-distale dell'arto, sostenendo la proliferazione cellulare all'interno della zona di progressione, nonché la sua competenza a rispondere ad altri segnali. FGF-4 (freccia verde) agisce sulla ZPA, causando la produzione del fattore SHH (freccia rossa), che a sua volta attiva FGF-8 nella parte posteriore dell'AER e regola la regionalizzazione in senso antero-posteriore. Segnali dorsali (Wnt-7a, frecce magenta) agiscono sulla ZPA, regolando l'espressione di *Shh*, e forniscono alle cellule del mesoderma della gemma informazioni sulla loro posizione lungo l'asse dorso-ventrale. AER, cresta ectodermica apicale; PZ, zona di progressione; ZPA, zona di attività polarizzante; a, anteriore; p, posteriore; pr, prossimale; dis, distale; d, dorsale; v, ventrale.

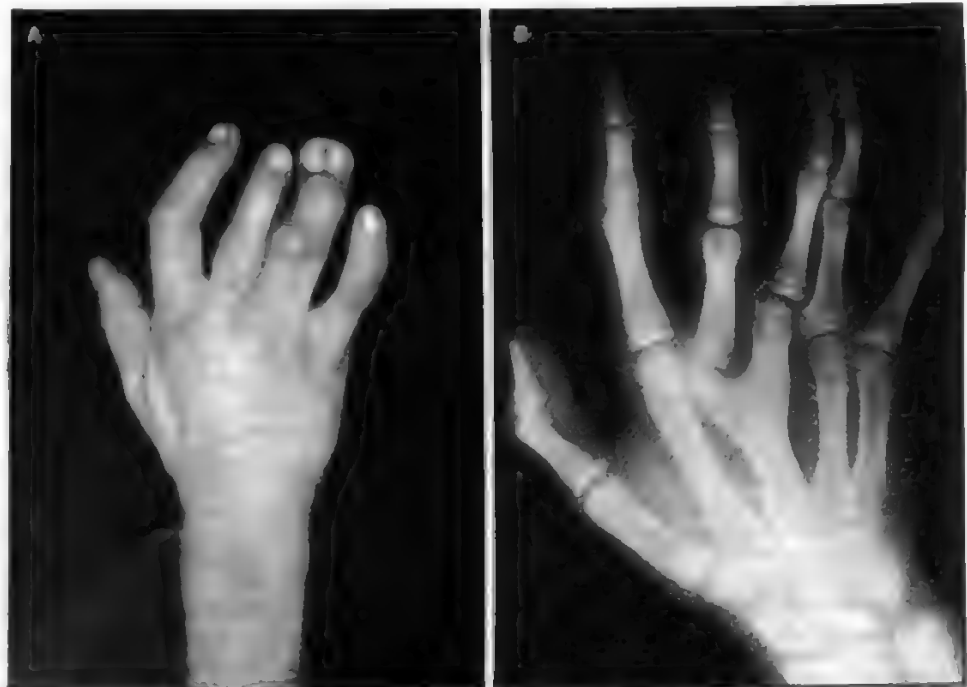
mesodermica di «progressione», ad essa limitrofa, costituita da cellule indifferenziate in attiva proliferazione. Le cellule che, cessando di dividersi, lasciano la zona di progressione, danno origine alle varie strutture di derivazione mesodermica dell'arto, correttamente disposte in senso prossimo-distale: le cellule che lasciano la zona di progressione per prime formano le strutture prossimali, mentre quelle che la lasciano successivamente formano strutture gradualmente più distali. La natura del segnale prodotto dall'AER è stata, per lo meno in parte, chiarita in tempi recenti. Diverse evidenze indicano che molecole del tipo degli FGF («Fibroblast Growth Factors») sono in grado di promuovere la crescita e la regionalizzazione prossimo-distali dell'arto, nonché di indurre lo sviluppo di arti ectopici. FGF-8, in particolare, è prodotto da tutta l'AER (fig. 14) e svolge un ruolo rilevante nello sviluppo dell'abbozzo (Tickle, 1995).

Interazioni induttive sono anche alla base della regionalizzazione antero-posteriore dell'arto, quella che consente, ad es., la corretta specificazione delle singole dita. Un ruolo fondamentale è svolto in tal senso da un centro organizzativo noto come «zona di attività polarizzante» (*Zone of Polarizing Activity: ZPA*), una ristretta porzione di mesoderma nella regione posteriore della gemma dell'arto (fig. 13). Di fatto, il trapianto di una ZPA nella porzione anteriore dell'abbozzo di un arto è in grado di indurre la formazione di una nuova serie di dita che sono l'immagine speculare di quelle normalmente prodotte (fig. 13). È stato ipotizzato che la ZPA sia la sorgente di un induttore diffusibile che si distribuirebbe, secondo un gradiente di concentrazione, lungo l'asse antero-posteriore dell'arto: il tipo di dito formato dipenderà dalla concentrazione di induttore con la quale le cellule dell'abbozzo dell'arto verranno in contatto. In accordo con questa idea, nell'esperimento di trapianto della ZPA la formazione delle due serie speculari di dita sarebbe dovuta alla presenza di due gradienti opposti di induttore, uno dovuto alla ZPA endogena e l'altro a quella trapiantata. Ricerche sulla natura molecolare dell'induttore prodotto dalla ZPA, hanno portato all'identificazione di due molecole in grado di riprodurre l'effetto di

duplicazione speculare delle dita: l'ac. retinoico e la proteina «Sonic HedgeHog». Attualmente si ritiene che l'ac. retinoico attivi nella ZPA il gene *Sonic hedgehog* (*Shh*) la cui proteina (SHH) produrrebbe, in direzione postero-anteriore, un segnale ad ampio raggio in grado di regionalizzare l'arto appunto lungo l'asse antero-posteriore. L'attivazione ed il mantenimento della espressione di *Shh* nella ZPA richiedono peraltro il fattore di crescita FGF-4, prodotto nella parte posteriore della AER. D'altra parte, l'espressione di FGF-4 nell'AER è a sua volta sostenuta da *Shh*, per cui si ha il reciproco mantenimento della attività di questi due geni attraverso un'interazione induttiva tra il margine posteriore dell'AER e la ZPA (fig. 14). «Sonic HedgeHog» e FGF-4 cooperano nell'accensione dei geni *Hox-D*, codificanti per fattori di trascrizione di tipo «homeobox». Diverse evidenze indicano che questi geni siano i principali effettori del segnale prodotto dall'attività della ZPA. Essi sono espressi in domini di espressione contenuti l'uno nell'altro lungo l'asse antero-posteriore dell'abbozzo dell'arto. All'interno di questi domini diverse combinazioni nella espressione dei geni *Hox-D* attribuiscono alle cellule valori antero-posteriori diversi e consentono la corretta specificazione, tra l'altro, delle dita dell'arto. La perdita di funzione di alcuni di questi geni *Hox-D*, e quindi una modificazione nel loro normale «quadro» di espressione nell'arto, determina alterazioni nella normale identità delle dita (fig. 15).

Un ultimo aspetto riguarda infine la regionalizzazione dell'arto in senso dorso-ventrale. È stato osservato che la polarità dorso-ventrale della gemma dell'arto è controllata dall'ectoderma che la riveste; se questo viene ruotato di 180°, rispetto al mesenchima sottostante, si ha una completa inversione dell'asse dorso-ventrale. Questo significa che esiste una intrinseca differenza tra porzione dorsale e ventrale dell'ectoderma della gemma dell'arto, che deve riflettersi anche nelle rispettive capacità di influenzare il mesoderma sottostante. Un segnale molecolare che potrebbe spiegare questa differenza è rappresentato da *Wnt-7a*, una proteina secreta prodotta dalle sole cellule ectodermiche dorsali della gemma. La perdita della funzione del gene

Fig. 15. Mutazioni nel gene *Hox-D13* provocano sinpolidattilia. A) Mano di individuo eterozigote per una mutazione nel gene *Hox-D13* risultante in una proteina non funzionale, a causa della inserzione di polialanina. B) Corrispondente radiografia mostrante la ramificazione del III metacarpale e la presenza di un dito addizionale. (Da Murakami et al., 1996).



Wnt-7a comporta la scomparsa delle strutture dorsali e la formazione di un abbozzo fornito di due facce ventrali. È inoltre interessante notare che la attività di *Wnt-7a*, o la presenza della porzione ectodermica dorsale, influenzano l'espressione del gene *Sonic hedgehog* nella ZPA, cosicché le vie di segnale per la regionalizzazione dell'arto nelle tre dimensioni potrebbero essere in qualche modo coordinate in prossimità della ZPA. Dunque, una complessa sequenza di eventi induttivi, in serie e reciproci, governa la morfogenesi dell'arto attraverso l'emissione, altamente coordinata in senso spazio-temporale, di molteplici segnali interattivi (fig. 14).

Bibliografia

- Balinsky B. I., *Introduzione alla Embriologia*, 1980, Zanichelli, Bologna.
 De Robertis E. M., Oliver G., Wright C. V. E., *Le Scienze*, 1990, XLV, 22.
 De Robertis E. M., Sasai Y., *Nature*, 1996, 380, 37.
 Domach T., *J. Neurobiol.*, 1993, 24, 1256.
 Gilbert S. F., *Developmental Biology*, 1994, Sinauer Associates Inc. Publ., Sunderland.
 Grainger R. M., *Trends Genet.*, 1992, 8, 349.
 Green J. B., Smith J. C., *Trends Genet.*, 1991, 7, 245.
 Hamburger V., *The Heritage of Experimental Embryology. Hans Spemann and the Organizer*, 1988, Oxford University Press, Oxford, New York.
 Kablar B., Vignali R., Menotti L., Pannese M., Andreazzoli M., Polo C., Giribaldi M. G., Boncinelli E., Barsacchi G., *Mech. Dev.*, 1996, 55, 145.
 Kessler D. S., Melton D. A., *Science*, 1994, 266, 596.
 Lewis W. H., *Am. J. Anat.*, 1904, 3, 505.
 Lumsden A., Krumlauf R., *Science*, 1996, 274, 1109.
 Muragaki Y., Mundlos S., Upton J., Olsen B. R., *Science*, 1996, 272, 548.
 Nieuwkoop P. D., *J. Exp. Zool.*, 1952, 120, 83.
 Nieuwkoop P. D., *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1977, 11, 115.
 Sasai Y., Lu B., Piccolo S., De Robertis E. M., *EMBO J.*, 1996, 15, 4547.
 Slack J. M. W., *Mech. Dev.*, 1993, 41, 91.
 Slack J. M. W., *Curr. Biol.*, 1994, 4, 116.
 Spemann H., *Vehr. Anat. Ges. Jena Verslg.*, Bonn, 1901, 15, 61.
 Spemann H., *Embryonic Development and Induction*, 1938, Yale University Press, New Haven.
 Spemann H., Mangold H., *Roux' Arch. Entw. Mech.*, 1924, 100, 599.
 Tanabe Y., Jessell T. M., *Science*, 1996, 274, 1115.
 Tickle C., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1995, 5, 478.

MASSIMILIANO ANDREAZZOLI, ROBERT VIGNALI
 E GIUSEPPINA BARSACCHI

INFANTICIDIO (v. vol. VII, coll. 1766-1774)

L'attuale legge ha mantenuto l'ipotesi criminosa della soppressione del prodotto di concepimento come evento differente e diversamente punito dall'omicidio; a giustificazione del minore rigore punitivo non è più la causa d'onore, sparita dal nostro codice nel 1981, ma una particolare circostanza indicata come «condizioni di abbandono materiale e morale».

L'articolo in questione (578 C.P.) recita: «La madre che cagiona la morte del proprio neonato immediatamente dopo il parto o del feto durante il parto, quando il fatto è determinato da condizioni di abbandono materiale e morale connesse al parto, è punita con la reclusione da quattro a dodici anni. A coloro che concorrono nel fatto di cui al primo comma si applica la reclusione non inferiore ad anni ventuno. Tuttavia se essi hanno agito al solo scopo di favorire la madre, la pena può essere diminuita da un terzo a due terzi. Non si applicano le aggravanti stabilite dall'art. 577 C.P. quando il fatto è determinato dalle condizioni di abbandono materiale e morale».

Il solo soggetto attivo del reato è quindi soltanto la madre ed eventuale complice nel reato non potranno usufruire del trattamento meno severo stabilito dalla legge per l'autore del reato a meno che non si possa dimostrare che coloro i quali hanno concorso al fatto non avevano alcun obbligo di

assistenza nei confronti della donna e che hanno fornito un loro aiuto al solo fine di favorirla.

Pertanto i genitori di figlia minorenni potranno essere imputati del reato non soltanto se hanno partecipato al reato ma anche se, essendo venuti a conoscenza del fatto ed avendo la possibilità di agire non si sono attivati per evitare il reato; infatti la responsabilità dei genitori e tutori nei confronti dei minori si estende anche al dovere di evitare i danni (uccisione del prodotto di concepimento) che possono essere causati dai minori stessi (art. 2048 C.C.).

Per quanto riguarda il soggetto passivo del reato, neonato o feto, elemento fondamentale è che il soggetto fosse vivo e vitale al momento del fatto: per vitalità si deve intendere una vitalità cronologica che convenzionalmente si indica con un'età fetale di almeno 180 giorni. Non è invece necessario che sia presente una vitalità intesa come capacità di vivere a lungo.

La soppressione del prodotto del concepimento è configurabile come *infanticidio* [i.] se l'evento è avvenuto nelle immediatezze del parto. Tale indicazione non può essere intesa in senso letterale ma deve essere interpretata come quel periodo di tempo abbastanza ristretto entro il quale è presumibile che le condizioni psicologiche indicate dal codice a parziale giustificazione del reato possano avere agito. Si tratta quindi di un periodo di tempo piuttosto ristretto durante il quale le condizioni suddette si mantengono.

Punto focale del reato è infine quello delle condizioni di abbandono materiale e morale, dizione che ha sollevato perplessità notevoli specie per quanto riguarda l'abbandono materiale che appare in contrasto con l'esistenza di strutture sociosanitarie su tutto il territorio deputate all'assistenza della popolazione; ha precisato però una sentenza di Cassazione che l'i. è incompatibile con l'esistenza di tali strutture solo se la donna si trovi nelle condizioni sociali e culturali di utilizzare detti sussidi (Cass. Pen., Sez. I, 1 agosto 1991).

L'esistenza delle condizioni di abbandono, obiettivamente presenti, deve essere inteso in senso assoluto e non come opinione personale della donna né tali condizioni possono essere relative ma al contrario devono essere di palese rilievo.

Lo stato di abbandono si configura quando la donna, pur nel seno della sua stessa famiglia è lasciata in balia di se stessa, senza alcun assistenza, nella completa indifferenza di tutti nei suoi riguardi, in una situazione che non lascia prevedere alcun soccorso materiale o morale e ciò in connessione con il parto, evento che la donna si trova ad affrontare in situazione di isolamento.

Non è configurabile il delitto di i. ma quello di omicidio se le condizioni di isolamento siano state determinate dalla donna volontariamente per incuria o indifferenza.

Per quanto riguarda l'elemento materiale della soppressione del prodotto di concepimento sarà necessario provare che la morte è stata causata con un'azione lesiva esterna.

Se tale azione lesiva non è riconoscibile ed il prodotto di concepimento è morto dopo essere stato abbandonato va fatta una distinzione tra i. e abbandono di minore (art. 591 C.P.) da cui deriva la morte.

Lo stesso problema si pone in caso di sopravvivenza del neonato abbandonato: se il prodotto del concepimento è stato abbandonato in condizioni tali per cui la sopravvivenza del medesimo era estremamente improbabile (ad es.: chiusura ermetica in sacchetto di plastica, occultamento in un recipiente per la raccolta dell'immondizia) si può dedurre una volontà indirizzata alla soppressione del prodotto del concepimento e quindi si è nell'ambito del delitto di i. sia pure come tentativo.

Al contrario se il neonato era stato abbandonato in una

situazione per la quale era probabile un intervento di terze persone (abbandono in zone abitate, in condizioni di protezione dai fattori ambientali con vesti o coperte) l'ipotesi può essere quella dell'art. 591 C.P. con pene edittali minori che non per l'i.

Attualmente il reato in questione che sembrava praticamente scomparso è stato segnalato in varie regioni di Italia, sempre però con frequenze molto basse.

Bibliografia

Ambrosetti E. M., *L'infanticidio e la legge penale*, 1992, Cedam, Padova.

Macchiarelli L., Feola T., *Medicina legale*, 1995, CEA, Milano.

MATILDE ANGELINI ROTA

INFARTO MIOCARDICO [v. vol. VII, coll. 1790-1835; Agg. I, coll. *3721-3748]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2773). - **Nuovi metodi di valutazione biochimica dell'infarto miocardico acuto** (col. 2773). - **Recenti acquisizioni nella terapia trombolitica** (col. 2774). - **Trombolisi preospedaliera** (col. 2778). - **Trombolisi tardiva** (col. 2779). - **ACE-inibitori** (col. 2779). - **Angioplastica coronarica** (col. 2780)

Introduzione

Negli ultimi trent'anni i progressi nel trattamento farmacologico, nelle strategie di riperfusione coronarica e nei sistemi assistenziali hanno determinato una drastica riduzione della mortalità ospedaliera nell'infarto miocardico acuto (IMA), che è passata dal 30% del periodo pre-UTIC (unità di terapia intensiva coronarica) al 6-7% dell'era trombolitica. Nel 1986 lo studio GISSI 1 (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico) ha documentato una riduzione del 18% della mortalità ospedaliera (dal 13% al 10,7%) dopo somministrazione per via venosa (e.v.) di streptochinasi (SK) nelle prime 12 ore dall'esordio dei sintomi e addirittura una riduzione del 47% nei pazienti trattati entro la prima ora. Da allora la trombolisi sistemica ha avuto un'ampia diffusione e attualmente ricopre un ruolo fondamentale nel trattamento dell'IMA. L'introduzione di nuovi farmaci trombolitici, l'acquisizione di più efficaci modalità di somministrazione, l'associazione con antitrombotici e antiaggreganti piastrinici, l'integrazione con gli effetti favorevoli di altre classi di farmaci (betabloccanti, ACE-inibitori, nitroderivati) hanno permesso in questi ultimi cinque anni una ulteriore riduzione della mortalità al 6-7%. Il lavoro di Hennekens *et al.* (1996) riassume i dati relativi ai diversi studi clinici controllati, valutando le differenti strategie terapeutiche dell'IMA e delle sue sequele. Il lavoro di Ryan *et al.* (1996) riporta le linee guida per il trattamento dell'IMA.

Infine non vanno trascurati i benefici apportati dall'angioplastica coronarica percutanea (PTCA) e dalle nuove metodologie diagnostiche.

Un altro argomento di grande rilevanza, nell'ambito della malattia ischemica del cuore, è quello costituito dal *precondizionamento ischemico del cuore*. Questo può essere definito come un fenomeno attraverso il quale brevi episodi di ischemia miocardica reversibile suscitano una aumentata tolleranza ad episodi più tardivi, prolungati e potenzialmente fatali. Data la sua importanza, si rimanda alla voce ISCHEMICO PRECONDIZIONAMENTO DEL CUORE** (coll. **2948-2960).

Nuovi metodi di valutazione biochimica dell'infarto miocardico acuto

La determinazione di indicatori biochimici di necrosi cellulare nell'IMA risponde a tre quesiti fondamentali: 1) la

conferma diagnostica soprattutto nelle prime fasi dell'evento; 2) la valutazione prognostica attraverso una stima indiretta dell'estensione della necrosi; 3) la valutazione non invasiva dell'efficacia della terapia trombolitica.

Negli ultimi anni la diagnostica di laboratorio, accanto alla classica determinazione dell'attività sierica della creatinfosfochinasi (CPK), della transaminasi ossalacetica (GOT) e della latticodeidrogenasi (LDH), si è arricchita di nuovi indicatori: l'isoenzima MB della CPK (CKMB), la mioglobina e la troponina. Dopo l'insorgenza dell'infarto ogni indicatore ha una cinetica plasmatica caratteristica e differenziata in termini di tempo di comparsa, tempo di raggiungimento del valore massimo, tempo di ritorno ai valori normali. La conoscenza di questi parametri, della sensibilità e della specificità di ogni *marker*, del tempo necessario per la esecuzione dell'esame è indispensabile per una corretta utilizzazione in campo clinico.

Il CKMB, che è l'indicatore più comunemente utilizzato, è presente prevalentemente nel miocardio e solo in piccola quantità nel muscolo scheletrico; questo spiega la sua superiore specificità rispetto alla CPK. Il CKMB compare nel plasma entro 4-6 ore dall'inizio dell'infarto, raggiunge i livelli di picco entro 12-24 ore e ha una durata di 1-3 giorni. La sensibilità e la specificità, già elevate, sono ulteriormente migliorate con lo sviluppo di nuove metodologie che misurano la concentrazione di massa piuttosto che l'attività enzimatica e che forniscono il risultato in 30 minuti.

La mioglobina è una proteina con basso peso molecolare, che ha una cinetica molto rapida con tempo di comparsa di 0,5-3 ore, tempo di picco di 6-12 ore e tempo di scomparsa inferiore a 24 ore. Nonostante la scarsa specificità per la presenza di elevate concentrazioni nel muscolo scheletrico, l'alta sensibilità, la immediata comparsa e la rapidità della metodica (10-15 minuti) indirizzano verso l'uso preferenziale della mioglobina nelle prime ore dell'IMA.

Le troponine T e I formano un complesso di proteine, che regola l'interazione calcio-mediata dell'actina e della miosina. Anche se sono presenti nel muscolo scheletrico, presentano un'altissima specificità poiché per il dosaggio, disponibile in 60-90 minuti, si utilizzano anticorpi monoclonali che non hanno reattività crociata con le isoforme del muscolo scheletrico. La troponina T, quella più utilizzata, ha un tempo di comparsa di 4-10 ore, un tempo di picco di 3-4 giorni e un tempo di scomparsa di 7-20 giorni; quest'ultima caratteristica la rende particolarmente utile nella diagnosi tardiva di infarto. Inoltre va sottolineato che è l'indicatore biochimico dotato della più elevata specificità.

Il rilascio degli enzimi miocardici di necrosi è influenzato dal ripristino del flusso nella coronaria responsabile dell'infarto, che condiziona un aumentato drenaggio (*washout*). Come parametri per il giudizio di riperfusione sono stati utilizzati il tempo di picco e la velocità di ascesa della CPK, del CKMB, della mioglobina e della troponina. Il tempo di picco della CPK e del CKMB è minore nei pazienti trattati con trombolisi rispetto ai non trattati. Negli studi controllati con coronarografia il tempo medio di picco nei soggetti riperfusi è tra 10 e 14 ore, mentre nei non riperfusi è di circa 20 ore. Nonostante le differenze tra i vari AA, questo parametro viene considerato fra i più attendibili per la diagnosi tardiva di riperfusione. Anche la velocità di ascesa nei primi 90 minuti è un parametro altrettanto valido, con il vantaggio di ottenere la risposta entro un tempo molto più breve.

Recenti acquisizioni nella terapia trombolitica

Gli studi di confronto dei farmaci trombolitici con il placebo avevano accertato la sicurezza e l'efficacia della terapia trombolitica nel ridurre la mortalità. Rimaneva da dimostrare quale farmaco trombolitico o quale combinazione

TAB. I. CONFRONTO FRA AGENTI TROMBOLITICI E MORTALITÀ

Studio	N. pazienti	Farmaci	Tempo	Follow-up	Mortalità %				
					SK	rtPA	rtPA + SK	APSAC	p
GISSI 2/Int. Study	20891	SK, rt-PA	6 ore	Osp.	8,5	8,9			N.S.
ISIS 3	41299	SK, rt-PA, APSAC	24 ore	35 gg.	10,6	10,3		10,5	N.S.
GUSTO	41021	SK, rt-PA, SK + rt-PA	6 ore	30 gg.	7,3	6,3	7		0,001*

* Confronto fra SK (*Streptokinase*) e rt-PA (*recombinant tissue Plasminogen Activator*) accelerato. N.S. non significativo.

fosse più efficace; a tale scopo sono stati eseguiti tre grandi studi di confronto, il GISSI 2-*International Study*, l'ISIS-3 (*International Study of Infarct Survival*) ed il GUSTO (*Global Utilization of Streptokinase and rt-PA for Occluded coronary arteries*), i cui risultati in termini di mortalità sono riportati nella tab. I.

GISSI 2-*International Study*. - 20.891 pazienti con inizio dei sintomi entro 6 ore e con sopraslivellamento di ST all'EKG furono randomizzati al trattamento trombolitico con 100 mg in 3 ore di attivatore tessutale del plasminogeno (rt-PA: *recombinant tissue Plasminogen Activator*) o con 1.500.000 U di SK in 60 minuti. In un disegno fattoriale 2 x 2 i pazienti furono ulteriormente assegnati a nessun trattamento eparinico o a eparina per via sottocutanea (s.c.) alla dose di 12.500 U per due volte al dì con inizio 12 ore dopo la trombolisi. A tutti i pazienti senza controindicazioni vennero somministrati beta-bloccante e acido acetilsalicilico (ASA). I risultati sulla mortalità non dimostrarono alcuna differenza significativa fra i gruppi SK (8,5%) e rt-PA (8,9%), con o senza eparina. Nel gruppo rt-PA vi fu una più alta incidenza di ictus (1,3% vs. 0,9%), ma non attribuibile ad un incremento dell'ictus emorragico (0,4% vs. 0,3%). Gli investigatori conclusero che l'uso dell'rt-PA non determinava nessun vantaggio rispetto alla meno costosa SK.

ISIS-3. - 41.299 pazienti con diagnosi sospetta o accertata di IMA furono randomizzati entro 24 ore a uno dei tre trattamenti trombolitici: 1.500.000 U di SK in 60 minuti, 30 U di acetilstreptochinasi (APSAC: *Anisoylated Plasminogen Streptokinase Activator Complex*) in bolo, rt-PA 600.000 U/kg in 4 ore. Tutti i pazienti ricevettero ASA e furono ulteriormente randomizzati a nessun trattamento eparinico o a eparina s.c. (12.500 U per due volte al dì con inizio 4 ore dopo la trombolisi). La mortalità a 35 giorni fu simile nei tre gruppi: 10,6% con SK, 10,5% con APSAC e 10,3% con rt-PA. La mortalità del gruppo sottoposto a eparina non fu significativamente diversa dal gruppo di controllo (10,3% vs. 10,6%). Nonostante sia stato utilizzato un rt-PA diverso, a catena singola nel GISSI 2 e a catena doppia nell'ISIS-3, i risultati si sono dimostrati sovrapponibili.

Controversie sul GISSI 2 e ISIS-3. - I risultati dei due grandi studi con tassi identici di mortalità fra rt-PA e SK venivano meno alle aspettative sollevate dalla chiara dimostrazione che la pervietà coronarica precoce (dopo 90 minuti) è nettamente maggiore con l'rt-PA (65-75%) rispetto alla SK (45-55%). Secondo la «teoria della pervietà precoce» la vaso responsabile dell'infarto, basata su dati sperimentali e studi clinici di limitate dimensioni, una ripertussione più precoce e più efficiente, salvando una maggiore quantità di miocardio, deve anche salvare più vite; per tale motivo l'rt-PA avrebbe dovuto uscire vittorioso dal confronto testa a testa. I sostenitori dei risultati del GISSI 2 e dell'ISIS-3 ne dedussero che la pervietà coronarica precoce non era l'unico e non il più importante me-

canismo del beneficio della trombolisi nell'IMA e che l'eparina non determinava alcun ulteriore vantaggio, concludendo che il farmaco da privilegiare nella pratica clinica era la SK, 7-8 volte meno costosa dell'rt-PA. I critici giudicarono i risultati inaccettabili in quanto troppo in contrasto con i presupposti fisiopatologici e sostennero che l'esito deludente per l'rt-PA era dovuto ad un errore metodologico sull'uso dell'eparina, che animò un acceso dibattito definito *heparin controversy* (White, 1990). La mancata somministrazione precoce di eparina c.v. con l'rt-PA avrebbe annullato il suo potenziale vantaggio di un tasso più elevato di pervietà precoce, in quanto si sarebbe avuto un eccesso di riocclusioni precoci dopo rt-PA, ma evitabile con la somministrazione immediata di eparina c.v. (non necessaria per la SK che induce un prolungato stato litico sistemico). Questa considerazione traeva spunto da studi angiografici (Hsia *et al.*, 1990; Bleich *et al.*, 1990) che mostravano tassi di pervietà più alti dopo rt-PA con eparina c.v. soprattutto in presenza di valori terapeutici dei parametri emocoagulativi.

GUSTO. - Lo studio fu organizzato allo scopo di stabilire la più efficace strategia trombolitica e prevedeva anche uno studio angiografico di supporto, idoneo a correlare la ricanalizzazione rapida, completa e stabile con la mortalità. 41.021 pazienti con IMA esordito da meno di 6 ore, trattati con ASA, furono randomizzati ad uno dei quattro trattamenti trombolitici: 1) rt-PA accelerato con eparina c.v., 2) rt-PA + SK con eparina c.v., 3) SK con eparina c.v., 4) SK con eparina s.c. (tab. II). Gli *end point* principali erano la mortalità e l'ictus cerebrale; i risultati sono ripor-

TAB. II. I QUATTRO TRATTAMENTI RANDOMIZZATI NELLO STUDIO GUSTO

- 1. rt-PA accelerato**
rt-PA bolo c.v. di 15 mg + 0,75 mg/kg c.v. in 30 min (ma non più di 50 mg) + 0,5 mg/kg in altri 60 min (ma non più di 35 mg)
Eparina bolo c.v. di 5.000 U + 1.000 U/ora (1.200 per i pazienti di più di 80 kg di peso corporeo), regolando la dose in modo da mantenere il PTT tra 60 e 85 sec. per almeno 48 ore
- 2. rt-PA + SK**
rt-PA 1 mg/kg c.v. in 60 min (ma non più di 90 mg), con il 10% in bolo iniziale
SK 1 milione di U c.v. in 60 min (iniziando insieme all'rt-PA ma per altra via venosa)
Eparina come al punto 1
- 3. SK con eparina c.v.**
SK 1,5 milioni di U c.v. in 60 min
Eparina come al punto 1
- 4. SK con eparina s.c.**
SK come al punto 3
Eparina s.c. 12.500 U s.c. ogni 12 ore, iniziando 4 ore dopo l'inizio dell'infusione di SK

TAB. III. PRINCIPALI RISULTATI DELLO STUDIO GUSTO

	Gruppo A SK + eparina s.c. (N° pz. 9796)	Gruppo B SK + eparina e.v. (N° pz. 10377)	Gruppo C rt-PA accelerato (N° pz. 10344)	Gruppo D SK + rt-PA (N° pz. 10328)	p*
Mortalità a 30 giorni	7,2%	7,4%	6,3%	7,0%	0,01
Mortalità + ictus invalidante	7,7%	7,9%	6,9%	7,6%	0,006

* Valore di p per il gruppo C versus gruppi A e B riuniti.

tati nella tab. III. La mortalità totale a 30 giorni fu significativamente minore nel gruppo trattato con rt-PA accelerato rispetto agli altri tre gruppi sia presi singolarmente che come gruppo unificato SK (6,3% vs. 7,3%). Benché l'incidenza di ictus fosse più alta nel gruppo rt-PA (1,55% vs. 1,3%), anche per l'end point combinato mortalità più ictus non fatale invalidante l'rt-PA accelerato dette risultati significativamente migliori. Dei due trattamenti con SK il migliore risulta quello con eparina s.c., rispetto al quale però il trattamento con rt-PA accelerato comporta un risparmio di 9 vite per 1000 pazienti trattati o di 8 vite senza ictus invalidante. Nello studio erano stati predefiniti dei sottogruppi in base all'età (inferiore o superiore a 75 anni), alla sede dell'IMA (anteriore oppure inferiore) ed al tempo trascorso fra l'esordio dei sintomi e la trombolisi (0-2 ore, 2-4 ore, 4-6 ore). La mortalità risultò significativamente ridotta con rt-PA accelerato nei pazienti con età inferiore a 75 anni, nei pazienti con IMA anteriore ed in quelli trattati entro 4 ore. Tuttavia a distanza di un anno (Topol, 1994) venivano corretti i dati riguardanti i sottogruppi in base al tempo e la riduzione di mortalità non risultava più significativa. Il miglioramento della sopravvivenza ottenuto con l'rt-PA accelerato può essere spiegato dai risultati dello studio angiografico in cui 2.431 pazienti, randomizzati ai quattro trattamenti, furono sottoposti a coronarografia. La pervietà del vaso di necrosi con flusso grado TIMI 3 (opacizzazione immediata e completa del vaso) a 90 minuti, indipendentemente dal tipo di trombolitico, era significativamente correlata con una migliore funzione ventricolare sinistra e soprattutto con una importante riduzione della mortalità (4,3% in TIMI 3, 7,9% in TIMI 2, superiore al 9% in TIMI 0-1). La pervietà TIMI 3 era ottenuta più frequentemente nel gruppo rt-PA (54%) che negli altri gruppi (inferiore al 40%). I dati convalidano la teoria della pervietà precoce quale elemento fondamentale per il miglior beneficio in termini di sopravvivenza e la superiorità del trattamento con rt-PA accelerato che determina più alti livelli di pervietà precoce.

Criteri di scelta del farmaco trombolitico e terapia aggiuntiva eparina-aspirina. - Nella scelta del farmaco trombolitico si deve tener conto dei risultati dei grandi studi e del profilo costo-beneficio. Idealmente la scelta andrebbe individualizzata valutando accuratamente le caratteristiche del paziente, l'estensione della necrosi, il tempo dall'inizio dei sintomi, il rischio di complicanze emorragiche ed anche il costo (Simoons e Arnold, 1993). Allo stato attuale ed in maniera schematica l'orientamento è di utilizzare rt-PA accelerato, secondo lo schema del GUSTO, con eparina e.v. nei pazienti di età inferiore a 70 anni e con IMA di ampie dimensioni, che possono essere trattati entro 4 ore dall'inizio dei sintomi. Negli altri casi la scelta dovrebbe cadere sulla SK, secondo lo schema del GISSI, con eparina s.c. solo nei casi con rilevante rischio tromboembolico. In tutti i pazienti è indicata la somministrazione di ASA i cui effetti favorevoli sulla mortalità e sul reinfarto sono stati ampia-

mente documentati nell'ISIS-2 (v. INFARTO MIOCARDICO*, coll. *3736-3737).

Trombolisi preospedaliera

Alla dimostrazione che il vantaggio della trombolisi è tempo-dipendente hanno fatto seguito studi clinici controllati di confronto fra trombolisi preospedaliera e trombolisi dopo il ricovero allo scopo di valutare la fattibilità, la sicurezza ed il valore clinico della somministrazione preospedaliera dell'agente trombolitico.

Nell'EMIP (*European Myocardial Infarction Project*) oltre 5.000 pazienti con segni clinici ed ECG di IMA furono randomizzati entro le prime 6 ore dall'inizio dei sintomi a ricevere un trattamento con APSAC 30 U in bolo prima del ricovero o a ricovero avvenuto. La terapia preospedaliera veniva somministrata dal personale medico addetto alle ambulanze. I pazienti del gruppo preospedaliero ricevettero la trombolisi 55 minuti prima di quelli trattati in ospedale. La mortalità a 30 giorni era ridotta nel gruppo preospedaliero (9,7% vs. 11,1%) ma non in maniera significativa. Le conclusioni dello studio furono che la trombolisi preospedaliera era fattibile con ragionevole sicurezza in quanto l'accuratezza diagnostica era alta (87,8%) e l'incidenza di complicazioni bassa e che il beneficio in termini di mortalità era modesto, evidente solo nei pazienti in cui l'anticipo della trombolisi preospedaliera superava i 90 minuti.

Nel MITI (*Myocardial Infarction Triage and Intervention*) 360 pazienti con IMA nell'area metropolitana di Seattle furono randomizzati al trattamento con rt-PA alla dose di 100 mg in 3 ore o in fase preospedaliera o all'arrivo in ospedale. La diagnosi con l'ausilio del telefono cellulare per la trasmissione dell'ECG e la terapia erano affidate al personale paramedico delle ambulanze. L'accuratezza diagnostica fu molto alta (98%) ed il tempo medio risparmiato per la trombolisi fu di 33 minuti. Il trattamento preospedaliero non produceva un beneficio significativo sulla mortalità (5,7% vs. 8,1%), sulla funzione ventricolare sinistra e sulla dimensione della necrosi. Veniva confermato il notevole beneficio del trattamento precoce, entro i 70 minuti, ovunque fosse eseguito.

Il GREAT (*Grampian Region Early Anistreplase Trial*) è uno studio sulla trombolisi domiciliare eseguito dai medici di base dopo una diagnosi clinica di sospetto IMA nelle comunità rurali della Scozia. 311 pazienti furono randomizzati a ricevere APSAC 30 U in bolo a domicilio o all'arrivo in ospedale. Il tempo medio risparmiato per la trombolisi fu di 139 minuti. Le complicanze non furono diverse nei due gruppi, mentre la mortalità a tre mesi fu nettamente più bassa nei pazienti trattati a domicilio (8% vs. 15,5%).

I risultati di questi studi dimostrano che la trombolisi preospedaliera è fattibile (alta accuratezza diagnostica), sicura (bassa incidenza di complicanze) e che il guadagno temporale determina una lieve riduzione della mortalità. D'altra parte l'entità numerica del beneficio di questa strategia è limitata: solo una piccola parte della totalità dei

INFARTO MIOCARDICO

pazienti con IMA fu ritenuta idonea alla trombolisi preospedaliera. Si può ipotizzare che il risparmio di tempo ottenuto con sistemi organizzativi complessi e costosi potrebbe essere conseguito con minore spesa tramite una attività educativa rivolta alla riduzione del tempo decisionale dei pazienti ed una migliore organizzazione rivolta a diminuire i ritardi intraospedalieri.

Trombolisi tardiva

Nel 1989 in un editoriale Braunwald considerava la possibilità che i benefici clinici della ripercussione potessero derivare anche da un meccanismo diverso dal salvataggio del miocardio ischemico, dipendente comunque dalla pervietà anche tardiva del vaso di necrosi; poneva la questione se non fosse il caso di «espandere il paradigma» della trombolisi prolungando la finestra terapeutica. Successivamente due grandi studi hanno valutato gli effetti della trombolisi tardiva.

Nello studio LATE (*Late Assessment of Thrombolytic Efficacy*) 5.700 pazienti furono randomizzati al trattamento con rt-PA o placebo dopo 6-24 ore dall'inizio dei sintomi. La mortalità a 6 mesi era ridotta del 27% nei pazienti trattati con rt-PA entro 6-12 ore, mentre non c'era nessun beneficio nei pazienti trattati dopo la 12ª ora.

Nell'EMERAS (*Estudios Multicentrico Estreptoquinosa Republica Americas Sud*) 4.534 pazienti furono randomizzati alla SK o placebo dopo 6-12 ore dall'inizio dei sintomi; la mortalità era ridotta del 14% in maniera non significativa nei pazienti sottoposti a trombolisi.

In base a tali risultati è stato proposto di estendere alla 12ª ora la finestra temporale per una trombolisi efficace specialmente nei pazienti con IMA esteso ancora in piena evoluzione. I meccanismi ipotizzati, conseguenti comunque alla pervietà del vaso, per spiegare i benefici della trombolisi tardiva sono di due ordini: 1) beneficio tempo-dipendente con salvataggio miocardico tardivo in presenza di occlusione intermittente o di circolo collaterale; 2) beneficio tempo-indipendente con prevenzione dell'espansione e del rimodellamento, perfusione del miocardio ibernato, maggiore stabilità elettrica.

ACE-inibitori

Nello studio sperimentale di Pfeffer (1985) ed in studi clinici di piccole dimensioni (Pfeffer 1988; Sharpe 1988) gli ACE-inibitori si erano dimostrati capaci di intervenire favorevolmente fin dalle fasi precoci dell'IMA sul rimodellamento ventricolare e di prevenire lo scompenso. Negli ultimi anni sono comparsi numerosi studi di ampie dimensioni, che hanno utilizzato gli ACE-inibitori nelle varie fasi dell'IMA con due obiettivi: 1) riduzione della mortalità con inizio della terapia nei primi giorni solo dopo la comparsa di sintomi e/o segni di disfunzione ventricolare sinistra; 2) miglioramento della sopravvivenza prevenendo la comparsa della insufficienza ventricolare sinistra mediante trattamento iniziato nelle prime 24 ore.

Nel SAVE (*Survival And Ventricular Enlargement*) 2.231 pazienti con disfunzione ventricolare sinistra, ma senza segni clinici di scompenso, furono randomizzati dopo 3-16 giorni (in media 11) al trattamento con captopril (150 mg/die) o placebo; a distanza di 42 mesi la mortalità presentò una significativa riduzione (19%) nel gruppo trattato con captopril.

Nell'Aspirin-ACE-Inhibition Ramipril Efficacy) 2.006 pazienti con segni clinici di scompenso furono randomizzati dopo 10 giorni (media 5,4) al trattamento con ramipril (10 mg/die) o con placebo; dopo 5 mesi la mortalità era significativamente ridotta del 27% nel gruppo trattato con ACE-inibitore.

Nel CONSENSUS II (*Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*), in cui 6.090 pazienti non selezionati furono randomizzati entro 24 ore dall'inizio dell'IMA al trattamento con enalapril (per via venosa nelle prime 6 ore poi per via orale alla dose di 20 mg/die) od al placebo, non si osservò nessuna riduzione della mortalità.

Nel GISSI 3, 18.895 pazienti non selezionati furono randomizzati nelle prime 24 ore dell'IMA alla terapia con lisinopril (10 mg/die) od al placebo; nel gruppo trattato con ACE-inibitore dopo 6 settimane si osservava una significativa riduzione della mortalità dell'11% e dell'*end point* combinato (mortalità più scompenso) dell'8,2%.

Nell'ISIS-4 58.043 pazienti non selezionati furono randomizzati entro 24 ore dall'IMA al captopril (50 mg/die) od al placebo; dopo 5 settimane c'era una significativa riduzione della mortalità del 5,2% nel gruppo trattato con captopril.

Nello SMILE (*Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation*) 1.556 pazienti con IMA anteriore furono randomizzati entro 24 ore dall'inizio dei sintomi allo zofenopril (60 mg/die) o al placebo; a distanza di 6 settimane si osservava una significativa riduzione del 34% dell'*end point* combinato mortalità più scompenso nel gruppo trattato con ACE-inibitore.

I risultati di questi studi indicano un effetto favorevole degli ACE-inibitori nell'IMA quantificabile in 5 vite salvate ogni 1.000 pazienti trattati, ma il vantaggio aumenta notevolmente fino a 40-70 vite salvate ogni 1.000 pazienti ad alto rischio con sintomi e/o segni di scompenso. L'elemento ancora non completamente chiarito è l'esatto momento nel quale iniziare la somministrazione dell'ACE-inibitore. Un inizio precoce del trattamento con ACE-inibitori, come pure con i betabloccanti, impone comunque una continua, attenta sorveglianza dei valori pressori (Hennekens *et al.*, 1996).

Angioplastica coronarica

La PTCA è stata proposta come trattamento dell'IMA secondo una strategia differenziata sulla base del momento di esecuzione, dell'obiettivo terapeutico e dell'associazione o meno alla trombolisi. Esiste un unanime consenso sulla indicazione alla PTCA urgente o elettiva in caso di ischemia residua e sulla mancanza di benefici della PTCA di routine immediata o differita dopo trombolisi. Negli ultimi anni un grande interesse è stato rivolto agli effetti della PTCA senza trombolisi ed in caso di suo fallimento.

Si definisce *PTCA primaria* o *diretta* quella eseguita nelle fasi precoci dell'IMA senza terapia trombolitica, come primo ed unico intervento di rivascularizzazione. Dopo la prima applicazione di Hartzler nel 1983 sono stati condotti studi randomizzati di confronto con la trombolisi sistemica per convalidare il ruolo della PTCA primaria; nella tab. IV sono riassunti i principali risultati dei 4 studi più recenti. La procedura è risultata efficace in un'alta percentuale di casi (90-97%) e si è osservata una minore incidenza di morte e/o reinfarto nei pazienti sottoposti a PTCA. Nello studio PAMI (*Primary Angioplasty in Myocardial Infarction*) il maggior vantaggio è stato riscontrato nei pazienti definiti ad alto rischio (età superiore a 70 anni, IMA anteriore, frequenza cardiaca superiore a 100/min), in cui la PTCA ha ridotto significativamente la mortalità ospedaliera (2% vs. 10,4%).

I vantaggi della PTCA primaria sulla trombolisi possono essere così riassunti: assenza di controindicazioni, elevata pervietà precoce e completa del vaso di necrosi, minore mortalità e reinfarto, minor rischio di emorragia intracranica, simultaneo trattamento del trombo occlusivo e della stenosi sottostante, identificazione immediata dei pazienti

TAB. IV. STUDI CLINICI RANDOMIZZATI DI CONFRONTO TRA TROMBOLISI SISTEMICA E PTCA PRIMARIA

Autori	Studi clinici	N. pazienti	Successo procedura	Tempo di terapia (min)	FE dimissione	Pervietà a 48 h	Mortalità	Re-IMA	Morti + Re-IMA	Emorragia intracranica
Gibbons <i>et al.</i> (1993)	rt-PA PTCA	51/56 (a) 45/47 (a)	93%	232 277	50% 53%	— —	— —	— —	— —	— —
Ribeiro <i>et al.</i> (1993)	SK PTCA	50 40/50 (a)	90%	179 238**	57% 59%	80% 87,5%	2% 6%	10% 8%	— —	— —
Grines <i>et al.</i> (1993)	rt-PA PTCA	200 175/195 (a)	97%	229 241	53% 53%	— —	6,5% 2,6%	6,5% 2,6%	12% 5,1%	2% 0%*
De Boer <i>et al.</i> (1994)	SK PTCA	149 140/152 (a)	97%	192 228	44% 50%***	68% 91%***	7% 2%*	9% 0%*	15% 3%***	— —

(a) Dei due valori riportati, il primo si riferisce ai soggetti trattati, il secondo ai soggetti inizialmente arruolati per randomizzazione.

*p 0,05, **p 0,01, ***p 0,001.

FE = Frazione di eiezione; Re-IMA = reinfarto.

ad alto rischio anatomico (tronco comune e malattia multivasale) e forse riduzione dei costi di degenza.

D'altra parte l'approccio invasivo comporta un notevole sforzo organizzativo con la disponibilità 24 ore su 24 del laboratorio di emodinamica e di un team esperto.

Il possibile ritardo dell'inizio della terapia viene recuperato dalla rapidità e completezza della riperfusione ottenibile con la PTCA. Il maggior costo iniziale della PTCA viene compensato dalla riduzione dei costi indiretti legati ad una durata più breve dell'ospedalizzazione e ad una minore necessità di procedure diagnostico-terapeutiche successive.

Sulla base dei risultati degli studi e delle considerazioni esposte la PTCA primaria, quando organizzativamente attuabile, trova indicazione nei pazienti non candidati alla trombolisi, nei pazienti ad alto rischio (anziani, grande estensione della necrosi, iniziale compromissione emodinamica) ed in quelli in cui la terapia trombolitica non ha mostrato evidenti vantaggi (*shock* cardiogeno, precedente *by-pass* aorto-coronarico). In particolare nei pazienti con *shock* cardiogeno, gravati da un'altissima mortalità sia con la terapia convenzionale (80-90%) che con la trombolisi (70%), la PTCA eseguita entro 12 ore e con l'ausilio di sistemi di supporto meccanico del circolo ha consentito di ridurre la mortalità al 30-40%.

La PTCA di salvataggio, intesa come procedura eseguita dopo insuccesso della trombolisi sistemica, fornisce risultati meno favorevoli della PTCA primaria sia in termini angiografici (pervietà 70%, riuclusione 20%) che clinici (mortalità 11%).

Nello studio RESCUE (*Randomized Evaluation of Salvage Angioplasty with Combined Utilization of End Points* [Ellis *et al.*, 1994]), in cui 150 pazienti con occlusione del ramo discendente anteriore e senza *shock* sono stati randomizzati alla PTCA o alla terapia convenzionale, la PTCA ha dimostrato un alto tasso di successo della procedura (92%) ma solo una lieve e non significativa riduzione della mortalità (5,1% vs. 9,6%) e dello scompenso (1,3% vs. 7%) a 30 giorni.

Il maggior limite della PTCA di salvataggio, che spiega in parte gli scarsi risultati, va ricercato nella inaccuratezza della diagnosi non invasiva di ricanalizzazione e quindi nella incapacità di identificare in tempi brevi e con precisione lo stato del vaso di necrosi e i pazienti che possono beneficiare della procedura.

V. ANGIOPLASTICA TRANSLUMINALE PERCUTANEA* (*551-561); ANGIOPLASTICA TRANSLUMINALE PERCUTANEA** (**374-394).

Bibliografia

- AIRF Study Investigators, *Lancet*, 1993, **342**, 821.
 Ambrosioni E. *et al.*, On behalf of the SMILE Study Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 80.
 Bleich S. D. *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1990, **66**, 1412.
 Braunwald E., *Circulation*, 1989, **79**, 441.
 Braunwald E., *Heart Disease*, 1997, 5 ediz., Saunders, Philadelphia, pp. 1184-1288, *bibl.*
 DeBoer M. J. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 1004.
 Ellis S. G. *et al.*, for the RESCUE Study Group, *Circulation*, 1994, **90**, 2280.
 EMI-RAS Collaborative Group, *Lancet*, 1993, **342**, 767.
 Gibbons R. J. *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 1993, **328**, 685.
 GISSI 1, *Lancet*, 1986, **1**, 397.
 GISSI 2, *Lancet*, 1990, **336**, 65.
 GISSI 3, *Lancet*, 1994, **343**, 1115.
 Grines C. L. *et al.*, for the PAMI Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 673.
 Hartzler G. O. *et al.*, *Am. Heart J.*, 1983, **106**, 965.
 Hennekens C. H., Albert C. M., Godfried S. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**(22), 1661-1667.
 Hsia J. *et al.*, for the HART Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 1433.
 International Study Group, *Lancet*, 1990, **336**, 71.
 ISIS-2 Collaborative Group, *Lancet*, 1988, **II**, 349.
 ISIS-3 Collaborative Group, *Lancet*, 1992, **339**, 753.
 ISIS-4 Collaborative Group, *Circulation*, 1993, **88**, 1-394.
 Julian D., Braunwald E., *Management of Acute Myocardial Infarction*, 1994, Saunders, Philadelphia.
 Late Study Group, *Lancet*, 1993, **342**, 759.
 Lee K. L. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991, **17**, 599.
 Leizorovics A. *et al.*, for the EMIP Group, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 383.
 Pfeffer M. A., Pfeffer J. M. *et al.*, *Circulation*, 1985, **72**, 406.
 Pfeffer M. A., Lamas G. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1988, **319**, 80.
 Pfeffer M. A. *et al.*, for the SAVE Trial Group, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 669.
 Rawles J., on behalf of the GREAT Group, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 1.
 Ribeiro E. E. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1993, **22**, 376.
 Ryan T. J. *et al.*, ACC/AHA guidelines for the management of patient with acute myocardial infarction: executive summary. A report of the American College of Cardiology American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation*, 1996, **94**, 2341-2350.
 Sharpe N. *et al.*, *Lancet*, 1988, **I**, 255.
 Simoons M. L., Arnold A. E. R., *Circulation*, 1983, **88**, 2556.
 Swendberg K. *et al.*, for the CONSENSUS II Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 678.
 The GUSTO Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 673.
 The GUSTO Angiographic Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 1615.
 Topol E. J., Califf R. M., Lee K. L., on behalf of the GUSTO Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 277.
 Topol E. J., *Textbook of Interventional Cardiology*, 1994, Saunders, Philadelphia.
 Weaver W. D. *et al.*, for the MITI Project Group, *JAMA*, 1993, **270**, 1211.
 White D. H., *Lancet*, 1980, **336**, 297.

ALFARDO MARESTA E LUCIANO PIRAZZINI

Definizione e generalità (col. 2783). - **Assicurazione obbligatoria contro gli infortuni sul lavoro** (col. 2783). - **Assicurazione libera contro gli infortuni** (col. 2784). - **Infortuni viari** (col. 2784). - **Infortuni sportivi** (col. 2786). - **Infortuni domestici** (col. 2787).

Definizione e generalità

Per infortunio in genere s'intende un evento accidentale provocatore di un danno all'organismo umano; la medicina infortunistica [m. i.], pertanto, riguarda le varie discipline mediche che si occupano della frequenza e della prevenzione di tali eventi, dell'identificazione delle loro cause e delle loro circostanze, della diagnosi e della terapia intesa nel senso più estensivo dell'espressione (e, quindi, comprensiva della rieducazione funzionale e della riabilitazione professionale), della valutazione medicolegale del danno alla persona.

A seconda di determinate condizioni e soprattutto a seconda delle particolari attività (ad es. a fine lavorativo) durante le quali si verifica l'accadimento pregiudizievole alla persona, si parlerà di infortunio viario (terrestre: stradale, ferroviario e tramviario; marittimo-fluviale-lacustre; aereo; funiviario), di infortunio domestico, di infortunio sportivo, di infortunio sul lavoro. Si parlerà, quindi, di infortunistica così aggettivata e, corrispondentemente, di m. i. lavorativa, viaria, etc.

L'evento potrà riguardare una condotta colposa; potrà essere assicurato obbligatoriamente per legge oppure potrà riferirsi a un'assicurazione privata.

Per quanto concerne l'atto diagnostico-terapeutico, è ovvio che esso differirà ben poco a seconda della qualifica dell'infortunio (ad es., se si tratta di infortunio domestico o sportivo), mentre più o meno sostanzialmente diverse dovranno essere l'attività prevenzionale e la valutazione del danno, che si diversificherà a seconda della sede: penale, civile o assicurativa (obbligatoria o facoltativa).

Sono di competenza medicolegale la maggior parte dei problemi relativi alla ricostruzione dell'avvenimento (e, quindi, il contributo alla prevenzione delle cause provocatrici dell'infortunio è evidente), nonché quelli concernenti la valutazione del danno (v. anche: ASSICURAZIONI, MEDICINA DELLE [v.; v.*; v.**]; CAUSALITÀ, RAPPORTO DI, DANNO, VALUTAZIONE MEDICOLEGALE DEL [v.; v.*]; LEGALE MEDICINA; LAVORO, IGIENE E MEDICINA DEL [v.]; LESIONI PERSONALI [v.]; SPORT, MEDICINA DELLO).

Assicurazione obbligatoria contro gli infortuni sul lavoro

Nel concetto di assicurazione è implicito quello di *rischio*; infatti l'assicurazione è quel contratto per cui, all'avverarsi dell'evento assicurato — e cioè all'attuarsi del rischio — l'avente diritto usufruisce di determinati benefici.

Per *rischio* s'intende qui la possibilità del verificarsi di un evento economicamente sfavorevole, e cioè provocatore di bisogno; l'evento stesso deve essere fortuito, casuale, incerto sul se, sul quando e sul come. Il che non significa che l'evento non sia genericamente prevedibile, perché tutti i calcoli attuariali mirano a precisare il più esattamente possibile la probabilità del verificarsi di un certo evento assicurato, ciò che non è prevedibile e se, quando e come qu. Il evento nel caso singolo si verificherà. Il grado di probabilità, cioè l'intensità del rischio, è desunto dalla proporzione fra i casi favorevoli e quelli contrari.

Accidentalmente tutti i Paesi civili hanno ad estendere il più possibile le provvidenze assicurative che hanno lo scopo primario di liberare dal bisogno l'uomo economicamente precario. Ma un programma ideale non può tendere che

all'estensione di questi benefici a tutti i componenti la collettività, attraverso un ordinamento assistenziale che emana da un intuitivo principio generale di solidarietà collettiva, quale in Italia è stato attuato mediante l'istituzione del Servizio Sanitario Nazionale.

Va rilevato che, a seguito di alcune sentenze della Corte Costituzionale (6 giugno 1989, n. 319; 18 luglio 1991, n. 356; 27 dicembre 1991, n. 485), è stata ammessa la risarcibilità del danno biologico derivante da infortunio connesso con illecito civile, indipendentemente dall'eventuale indennizzo per il danno lavorativo già corrisposto dall'Istituto assicuratore.

Per ciò che riguarda l'assicurazione obbligatoria contro gli infortuni sul lavoro nell'industria e in agricoltura si rimanda alla voce dell'Agg. I, ASSICURAZIONI, MEDICINA DELLE* (*887-892 e rispettivamente *892-894).

Assicurazione libera contro gli infortuni

L'oggetto dell'assicurazione *libera* (chiamata anche *facoltativa*) è definito nel contratto, ove sono contenute le condizioni generali di assicurazione.

Non tutte le società di assicurazione offrono eguali condizioni di polizza, nonostante sia stato ripetutamente proposto ed auspicato, specie da parte dei medici legali, di uniformare le norme relative.

Qui si riportano le principali disposizioni d'interesse medico stabilite dalle più importanti società secondo le indicazioni dell'Associazione Nazionale tra le Imprese Assicuratrici (A.N.I.A.).

Secondo tali clausole, l'assicurazione ha per oggetto gli infortuni che l'assicurato subisce nell'esercizio delle occupazioni professionali dichiarate dal contraente e/o nello svolgimento di attività extraprofessionali connesse con ogni evenienza della vita privata e sociale.

È considerato infortunio indennizzabile ogni evento dovuto a causa fortuita, violenta ed esterna, che produca lesioni fisiche obiettivamente constatabili, le quali abbiano per conseguenza la morte, un'invalidità permanente o un'inabilità temporanea.

La società corrisponde l'indennità per le sole conseguenze dirette ed esclusive dell'infortunio che siano indipendenti da condizioni fisiche o patologiche preesistenti o sopravvenute; pertanto l'influenza che l'infortunio può avere esercitato su tali condizioni, come pure il pregiudizio che esse possono portare all'esito delle lesioni prodotte dall'infortunio, sono conseguenze indirette e quindi non indennizzabili.

Parimenti, nei casi di preesistente mutilazione o difetto fisico, l'indennità per invalidità permanente è liquidata per le sole conseguenze dirette cagionate dall'infortunio come se esso avesse colpito una persona fisicamente integra, senza riguardo al maggior pregiudizio derivato dalle condizioni preesistenti.

Se l'infortunio ha per conseguenza un'invalidità permanente, e questa si verifica entro un anno dal giorno nel quale l'infortunio è avvenuto, la società liquida, entro i limiti della somma convenuta, un indennizzo secondo le percentuali e le disposizioni contenute nella polizza.

V. anche: ASSICURAZIONI, MEDICINA DELLE* (*907-908).

Infortuni viari

Tra questi una particolare importanza acquistano gli incidenti da traffico stradale e in particolare quelli causati da veicoli a motore. Si parla di oltre 400.000 vite umane perdute ciascun anno sulle strade del mondo per questa vera e propria piaga sociale, mentre a milioni si contano i feriti e gli invalidi; statistiche attendibili indicano in almeno il decuplo dei morti il numero dei feriti gravi.

Dai dati, soltanto parziali, desumibili dalle pubblicazioni dell'O.M.S., risulta che il numero dei morti per incidenti stradali si aggira sui 300.000 all'anno.

Secondo quanto reso noto recentemente dall'ISTAT, in Italia nel 1992 gli incidenti da traffico stradale sono stati 170.814; il numero dei feriti è stato di 241.094 e quello dei morti di 7.424. Da osservare che nel 1995 gli infortuni sul lavoro denunciati sono stati 118.437 in agricoltura e 775.484 nell'industria (complessivamente 893.921), dei quali rispettivamente 172 e 1.081 con esito mortale (complessivamente 1.253).

Ciò spiega il grande interessamento degli studiosi, medici e non medici, ai diversi problemi della m. i., nonché quello di organizzazioni nazionali ed internazionali e degli stessi governi, rivolti a stabilire soprattutto le cause dell'infortunio stradale, tradizionalmente riferibile a tre gruppi di fattori: vie di comunicazione, mezzo di trasporto, condotta del guidatore. Non v'è dubbio che il fattore umano prevalga nella causalità dell'incidente e questo giustifica le disposizioni tendenti a reprimere la condotta colposa del guidatore: negligenza, imprudenza, imperizia, inosservanza dei regolamenti del traffico sono spesso la vera causa degli infortuni stradali. Oltre le norme contenute nel codice stradale, si ricorda che nel Codice Penale all'art. 589 (omicidio colposo) e all'art. 590 (lesioni personali colpose) è previsto un aumento della pena per i fatti commessi con violazione delle norme sulla disciplina della circolazione stradale, nonché di quelle per la prevenzione degli infortuni sul lavoro; anche le attuali disposizioni sui limiti di velocità si affiancano a queste norme sulla prevenzione degli incidenti della strada.

Gli psicologi e gli psicopatologi, nell'interpretazione di tale condotta criminosa (a ragione si afferma l'esistenza di una delinquenza colposa della strada), parlano di personalità istrioniche o «bisognose di valore» (vale a dire di persone che continuamente cercano di richiamare l'attenzione, forse per supplire ad un recondito sentimento di inferiorità), di frustrati (che reagiscono alle disillusioni, all'insicurezza e all'insoddisfazione con una condotta aggressiva legata alla struttura intrinseca della personalità o a esperienze ricche di carica emotiva), di anancastici (che in situazioni di incertezza sono vittime di dubbi angosciosi), di sognatori (che davanti al volante si comportano come in estasi e perdono il controllo della realtà). Non sono da sottovalutare, e non solo per numerosità, gli incidenti viari legati all'assunzione di droghe del tipo *crack* o *ecstasy*, che interessano soprattutto i giovani che frequentano le discoteche (i cosiddetti «incidenti del sabato sera»). Questo aspetto psicologico e psicopatologico del problema in esame è ampiamente convalidato dagli aspetti antropologico-esistenziali del problema medesimo.

È certo che la rapidissima diffusione del veicolo a motore e dell'automobile in particolare ha modificato radicalmente la struttura della vita collettiva, delle relazioni tra l'uomo e il mondo, brutalmente e repentinamente, di modo che molti individui si possono considerare in un vero stato di disadattamento biologico-sociale.

Non si tratta soltanto di un problema di costume e di rispetto dei diritti altrui, ma anche di un problema di natura psicologica molto più complesso di quanto potrebbe apparire a prima vista.

In effetti, non è raro riscontrare che dinamismi psicologici peculiari sono alla base della condotta antisociale, sia del guidatore sia, non si deve dimenticarlo, del pedone.

Ad es., quando l'equilibrio psicologico è turbato (stati ansiosi, fobie, etc.) l'individuo può cercare nell'abitacolo una sicurezza e una protezione per la sua corporeità, che sente insufficiente e minacciata dal mondo nel quale vive e opera.

Dopo anni di attesa e di sollecitazioni, anche nel nostro Paese entrò in vigore, con la legge 26 dicembre 1969, n. 990 (Gazz. Uff. 3 gennaio 1970, n. 2), l'assicurazione obbligatoria della responsabilità civile derivante dalla circolazione dei veicoli a motore e dei natanti.

Da osservare (v. anche: DANNO, VALUTAZIONE MEDICOLEGALE DEL [v.; v.*]) che, nel caso di mancato reddito da lavoro, il reddito da prendere in considerazione ai fini del risarcimento non può essere inferiore a tre volte l'ammontare annuo della pensione sociale (legge 26 febbraio 1977, n. 39, concernente la modifica della disciplina della predetta assicurazione obbligatoria, in Gazz. Uff. 26 febbraio 1977, n. 54), mentre la successiva evoluzione giurisprudenziale in tema di *danno biologico* ha comunque introdotto il principio della risarcibilità del danno psicofisico inteso come lesione del diritto alla salute costituzionalmente garantito (art. 32 della Costituzione), indipendentemente dalle eventuali conseguenze di carattere propriamente patrimoniale (danno da perdita subita e/o da mancato guadagno) o morale.

L'esposizione delle problematiche concernenti l'infortunistica viaria non può dirsi esaurita nei pochi concetti qui ricordati: ovviamente studi più ampi e più completi (e non solo per quanto riguarda gli incidenti stradali) si troveranno nella trattatistica relativa.

Infortuni sportivi

In merito agli infortuni sportivi, va osservato che la natura e il carattere della lesività saranno relativamente diversi a seconda del tipo di sport esercitato, tenendo presente che non vi può essere una perfetta analogia tra il rischio lavorativo e quello sportivo, in quanto nello sport il rischio assume a volte caratteristiche del tutto peculiari. È pacifico che se il pericolo del verificarsi di un danno alla persona è connaturato a ogni attività lavorativa (il che ne ha imposto la tutela a cominciare dalle lavorazioni più pericolose), esso è pur sempre meno intenso e più aleatorio di quanto non lo sia per alcuni tipi di sport a base violenta, nei quali è proprio il verificarsi del danno in grado maggiore in uno dei due contendenti a condizionare il risultato dell'incontro.

Tale situazione, oltre ad assumere un particolare significato dal punto di vista dottrinale, presenta dei riflessi anche nel campo della prevenzione, nel senso che l'attività prevenzionale, mentre in alcuni casi potrà presentare caratteristiche assai simili a quanto si attua nel settore del lavoro, in altri avrà i suoi limiti proprio in quella ineluttabilità del danno di cui si è detto e potrà quindi essere rivolta soltanto alla riduzione della gravità delle conseguenze dannose.

Mentre negli sport individuali e negli sport di squadra, infatti, si potrà tendere all'eliminazione delle cause dannose o quanto meno cercare di ridurre la frequenza del loro incontro con l'organismo umano, nei combattimenti diretti peculiari degli sport «marziali» si potrà soltanto cercare di contenere il danno in stati morbosi reversibili e di breve durata.

In talune particolari attività annoverabili tra gli sport suddetti (e si allude soprattutto al pugilato) il verificarsi di un evento dannoso, per quanto lieve e transitorio, rientra nell'ambito della stessa attività sportiva. Infatti, il fine che ognuno dei contendenti si propone è proprio quello di determinare nell'avversario uno stato di inferiorità tale da obbligarlo a interrompere l'incontro.

Dato il carattere sociale dell'attività sportiva, anche per questa è prevista la tutela assicurativa, estesa a tutti i soggetti, persone fisiche o organizzazioni, iscritti o affiliati alle federazioni sportive riconosciute dal CONI o alle altre istituzioni sportive sulle quali il CONI esercita potere di sor-

veglanza e di tutela, mediante la Cassa di previdenza per l'assicurazione degli sportivi (SPORTASS).

Nel 1992, su 7.446.729 assicurati, sono stati denunciati 18.992 infortuni con 66 casi mortali e con 1.540 di invalidità permanenti. Da rilevare che, secondo il Regolamento della SPORTASS, per infortunio si intende l'evento improvviso di una causa violenta esterna che si verifichi, indipendentemente dalla volontà dell'assicurato, nell'esercizio dell'attività protetta dalla Cassa e produca immediatamente lesioni corporali obiettivamente determinabili.

Sono indennizzabili le lesioni corporali che abbiano nell'infortunio, come sopra specificato, la loro causa diretta, esclusiva e provata e che producano all'assicurato l'invalidità temporanea, l'invalidità permanente al massimo entro un anno dalla guarigione clinica, o la morte al massimo entro un anno dall'infortunio denunciato.

Infortunio domestici

Per infortunio domestico s'intende quello che si verifica nell'ambito dell'abitazione e dei suoi annessi; pertanto in questa definizione rientrano tutti quegli incidenti che accadono durante lo svolgimento della vita familiare.

Fanno parte degli infortuni sul lavoro assicurati obbligatoriamente quelli che si verificano nei « lavoratori addetti ai servizi domestici e familiari », nonché nei « lavoratori addetti ai servizi di riassetto e pulizia dei locali », che godono della tutela assicurativa in base al D.P.R. 31 dicembre 1971, n. 1403 ter.

Naturalmente, anche per gli incidenti domestici si possono stipulare contratti assicurativi privati, sulle cui condizioni di polizza non v'è ragione di soffermarsi.

L'attenzione su tali eventi accidentali — e che in taluni casi sono riferibili a condotte colpose verso soggetti della prima e della seconda infanzia (ad es. negligente custodia di mezzi lesivi) — è stata richiamata specie dopo la diffusione di dati da parte dell'ISTAT e relativi al periodo dicembre 1989-maggio 1990, dai quali risulta che le persone coinvolte in incidenti domestici sono state circa 2.554.000 e che di queste oltre il 15% ne hanno subito più di uno, per un totale di 3.301.000 incidenti e con una media di 1,3 incidenti a persona. I soggetti più colpiti sono le donne (2.294.000 casi contro 1.007.000 occorsi ad uomini), che costituiscono circa i due terzi degli infortunati (1.733.000 donne contro 820.000 uomini). Si registra, altresì, una prevalenza assoluta delle cadute, sia da dislivelli (scale mobili e fisse, sedie o mobili) sia su superfici prive di dislivelli (pavimenti, vasche da bagno, docce), con 229.000 incidenti tra gli uomini e 490.000 nelle donne. A loro volta, gli utensili da cucina sono responsabili di 498.000 incidenti (106.000 negli uomini e 392.000 nelle donne), mentre gli elettrodomestici di 172.000 (rispettivamente 25.000 negli uomini e 147.000 nelle donne).

Estremamente difficile è l'elencazione delle cause degli infortuni domestici, ovviamente in rapporto alle caratteristiche dell'ambiente familiare. Oltre alle cause già menzionate, occorre ricordare che la presenza di medicamento di ogni genere, l'utilizzazione assai diffusa negli ambienti familiari di apparecchi elettrici, l'uso altrettanto esteso di detersivi chimici, la fuga accidentale di gas domestici sono esempi di causalità lesiva più frequente specie nei bambini, che non sono protetti dalla sorveglianza dei genitori, impegnati per gran parte del giorno in attività lavorative. Da osservare che le lesioni determinate da cadute riguardano soprattutto i due gruppi di popolazione più a rischio, i soggetti da 1 a 5 anni e quelli da 65 anni e più. Inoltre, la frequenza delle cadute in tali età è correlata alle caratteristiche della loro vita, che sono strettamente legate alle caratteristiche dell'ambiente domestico.

I dati di statistica sanitaria sull'infortunio domestico sono naturalmente di grande interesse, soprattutto in relazione al fenomeno del suicidio, ma, nonostante l'importanza del fenomeno, non

poche, anche se assai lodevoli, sono le ricerche al riguardo, tanto sul piano nazionale, quanto su quello internazionale.

Bibliografia

- Alibrandi G., *Infortunio sul lavoro e malattie professionali*, 1992, Giuffrè, Milano.
- Antonietti F., di Luca N. M., *Medicina legale e delle assicurazioni nello sport*, 1996, S.E.U., Roma.
- Buratta A., *Gli incidenti in ambiente domestico*, 1994, ISTAT, Roma.
- De Matteis A., *L'assicurazione obbligatoria contro gli infortuni sul lavoro e le malattie professionali*, 1996, Utet, Torino.
- di Luca N. M., *L'infortunio nell'assicurazione privata. Profili medico-legali ed assicurativi*, 1992, Giuffrè, Milano.
- Gerin C., Antonietti F., Merli S., *Medicina legale e delle assicurazioni*, 1996, S.E.U., Roma.

CESARE GERIN E NATALE MARIO DI LUCA

INGEGNERIA GENETICA [v. Agg. I, coll. *3810-3824; v. anche GENETICA**, DNA-ricombinante; CLONE E CLONAZIONE*]

Errata-Corrige

A col. *3811 dell'Agg. I, voce INGEGNERIA GENETICA*, è « saltato » un breve sottocapitolo che qui di seguito riportiamo:

« Enzimi di restrizione »

Gli enzimi di restrizione sono anche noti come endonucleasi di restrizione. Questi enzimi sono stati isolati esclusivamente da batteri e la loro funzione ha implicazioni evolutive importanti. Come il loro nome suggerisce, essi operano tagli all'interno di una sequenza di DNA. La modalità di taglio è estremamente specifica in quanto essi riconoscono brevi sequenze di DNA, che di solito non eccedono le 8-10 coppie di basi. La struttura di queste sequenze è palindromica, ovvero esse hanno la stessa frequenza sia che il DNA venga letto in direzione 5'-3' che in direzione opposta. Le estremità, generate dal taglio del legame 5'-3' fosfodiesterico lungo lo scheletro del DNA, possono avere caratteristiche diverse. In generale le estremità coesive sono quelle più utili per la tecnologia del DNA ricombinante ».

In questo Aggiornamento II l'argomento è sviluppato nel capitolo DNA ricombinante della voce GENETICA** (coll. **2405-2413).

INIBITORI SELETTIVI DELLA RICAPTAZIONE DELLA SEROTONINA (ISRS): v. FLUOXETINA E ANALOGHI**, coll. **2336-2342; v. anche ANTIDEPRESSIVI FARMACI**, coll. **436-440.

INSULINA [v. vol. VII, coll. 2063-2080; Agg. I, coll. *3863-3867]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2788). - **Sensibilità all'insulina** (col. 2789). - **Insulinorestenza** (col. 2790). - **Lys-Pro-insulina** (col. 2790). - **Preparazioni disponibili di insulina** (col. 2790). - **Dispositivi per la somministrazione di insulina** (col. 2790): *Siringhe convenzionali*. - *Iniettori di insulina a penna*

Introduzione

Il ruolo determinante svolto dall'insulina nella regolazione del metabolismo di tutti i substrati energetici (carboidrati, lipidi, proteine) è stato oggetto di crescente interesse scientifico negli ultimi anni. Gli organi bersaglio dell'i. sono il fegato, il tessuto adiposo ed il muscolo. I principali meccanismi attraverso i quali l'ormone esercita la sua azione ipoglicemizzante sono la riduzione della produzione epatica di glucosio (e quindi della immissione nel sangue di zucchero) e l'aumento della utilizzazione periferica dell'esoso nei tes-

suti più squisitamente insulino-sensibili (tessuto muscolare e tessuto adiposo). Inoltre, l'i. influenza il metabolismo dei lipidi, inibendo la liberazione di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo, e il metabolismo proteico favorendo la captazione di aminoacidi ed inibendone la liberazione a livello muscolare. Tra le molteplici azioni che l'i. esercita, quelle sul metabolismo dei carboidrati sono certamente le più note e gli studi dell'ultimo decennio hanno chiaramente dimostrato che i soggetti normali, cioè esenti da qualunque patologia, presentano una notevole variabilità di risposta biologica all'ormone, cioè una diversa *sensibilità* nei suoi confronti.

Sensibilità all'insulina

È intuitivo che per valutare la sensibilità all'ormone è necessario disporre di un metodo ripetibile e standardizzato per la quantificazione *in vivo* di quel fenomeno biologico indotto dall'i. che si vuole valutare. Allo stato attuale, gli effetti biologici maggiormente studiati sono quelli sul metabolismo glicidico, in particolare la produzione epatica di glicoso e la captazione periferica dello zucchero. Entrambi questi parametri sono misurabili con una tecnica, denominata *clamp euglicemico iperinsulinemico*, consistente nella somministrazione di i. per via venosa, per mantenere concentrazioni circolanti dell'ormone elevate in grado di esercitare il massimo effetto biologico prevedibile, e nella infusione contemporanea di glicoso in dosi tali da mantenere la glicemia relativamente costante intorno a 100 mg/dl. In tale maniera, essendo la produzione epatica di glicoso completamente inibita dalla iperinsulinemia, al raggiungimento dello stato di equilibrio, la quantità di glicoso infusa è pari alla quantità di glicoso captata dai tessuti insulino-sensibili (nella fattispecie rappresentati in modo preminente dal tessuto muscolare, che in queste condizioni è il maggiore consumatore di glicoso dell'organismo) ed è quindi possibile ottenere un indice della sensibilità di questi tessuti a concentrazioni massimali di i. La contemporanea infusione di traccianti radioattivi permette di quantificare, qualora lo si desidera, anche la produzione epatica di glicoso. Ciò consente, con opportune variazioni delle dosi di i. infuse, di valutare la sensibilità del fegato all'azione inibente dell'i. sulla produzione epatica di glicoso.

L'applicazione su vasta scala di questa metodica ha permesso di studiare la sensibilità all'i. in diverse condizioni fisiologiche e patologiche e di quantificare il fenomeno della *insulino-resistenza*, cioè della riduzione della attività biologica dell'ormone, originariamente rilevato già nel 1939.

I fattori in grado di influenzare la sensibilità all'i. sono molteplici. Il più importante è certamente il rapporto tra altezza e peso corporeo (*indice di massa corporea* IMC o BMI [v. X, 1352]), che è fondamentalmente espressione della percentuale di tessuto adiposo presente nell'organismo (v. anche: ADIPOSO TESSUTO, I, 668; *120; COMPOSIZIONE CORPOREA**, col. **1366). Maggiore il BMI, maggiore è la quantità di tessuto adiposo, *minore* è la sensibilità all'i. L'obesità (v.; v.*; v.**), espressione di un eccesso di tessuto adiposo, si accompagna a franca insulino-resistenza. A parità di BMI, la distribuzione dell'adipe svolge un ruolo importante. Una distribuzione di tipo «centrale», con il grasso addominale prevalentemente intraperitoneale, si accompagna a maggiore riduzione della sensibilità all'i. rispetto ad una equivalente quantità di grasso distribuita sui glutei, alla radice delle cosce o nel sottocutaneo. La distribuzione del grasso corporeo può essere grossolanamente valutata attraverso la determinazione del *rapporto vita/fianchi* (circonferenza del giro di vita a livello della ombelicale trasversa/circonferenza del bacino nel punto di massima sporgenza delle natiche) da misurare nella stazione eretta. Infine, la sensibilità all'i. decresce progressivamente con l'età.

Il maggior fattore in grado di determinare un *aumento* della sensibilità all'i. è certamente l'attività fisica, intesa come ripetizione nel tempo, ad intervalli regolari, di sessioni di esercizio fisico di intensità, durata e frequenza tali da determinare un incremento della capacità aerobica massimale (massimo consumo di ossigeno durante lo sforzo massimale). L'esercizio aerobico, che coinvolge ampie masse muscolari ed è costituito prevalentemente da movimenti isotonici, determina un aumento della sensibilità all'i. con meccanismi molteplici: aumento del flusso ematico muscolare con aumentata esposizione tessutale all'i. ed al glicoso; aumento del numero e dell'affinità dei recettori per l'ormone; aumentato reclutamento delle molecole di trasportatori di glicoso; aumento delle fibre muscolari. Correlati con l'aumentata sensibilità all'i. sono anche la riduzione del colesterolo totale, del colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità, dei trigliceridi, del fibrinogeno, l'aumento del colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità, tutte variazioni in senso anti-aterogeno del quadro lipidico (v. LIPEMIA, VIII, 2059; LIPEMIA**, LIPOPROTEINE, VIII, 2132; *4672) e coagulativo.

Insulinoresistenza

È una condizione nella quale si osserva una diminuita risposta all'ormone (v. anche DIABETE MELLITO*, col. *2130). In genere, è riconoscibile per la coesistenza di iperinsulinemia e glicemia normale (per mantenere la glicemia nei limiti l'organismo ha bisogno di una quantità maggiore di i.) o elevata (l'iperproduzione di i. non riesce a compensare la ridotta risposta biologica). Fatta eccezione per condizioni specifiche legate a patologia del recettore per l'i., l'insulinoresistenza è una patologia subclinica ad elevata prevalenza che determina, con meccanismi non ancora del tutto chiariti, dislipidemia (in particolare ipertrigliceridemia), iperuricemia, ipertensione arteriosa, aumentato rischio di malattia cardiovascolare.

Lys-Pro-Insulina

Sono stati proposti vari analoghi dell'i., al fine di migliorarne la farmacocinetica. Fra questi composti sarà disponibile tra breve la Lys-Pro-Insulina (Howey *et al.*, 1994), che differisce dall'i. umana per l'inversione di due aminoacidi terminali della catena B dell'i., prolina e lisina, e che presenta un più rapido assorbimento dal tessuto sottocutaneo (v. DIABETE MELLITO**).

Bibliografia

- De Fronzo R. A., Tobin J. D., Andres R., *Am. J. Physiol.*, 1979, **237**, E214-223.
 Felig P., Bergman M., *The Endocrine pancreas: Diabetes Mellitus*, in Felig P., Baxter J. D. e Frohman L. A. eds., *Endocrinology and Metabolism*, 1995, McGraw-Hill, New York, pp. 1107-1250.
 Howey D. C. *et al.*, *Diabetes*, 1994, **43**, 467-478.
 Reaven G. M., Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, 1988, **37**, 1595-1607.
 Scheen A. S., Paquot N., Castillo M. S., Lefevre P. J., *Diabetes Metab. Rev.*, 1994, **10** (2), 151-188.

ALBERTO IALA

Preparazioni disponibili di insulina

Con l'inizio del 1996 sono disponibili in Italia solo preparazioni di i. umana biosintetica, realizzate mediante la tecnica del DNA ricombinante, che riportiamo in tab. I.

Dispositivi per la somministrazione di insulina

Siringhe convenzionali

La maggior parte dei pazienti si inietta l'insulina utilizzando le *siringhe di plastica monouso* da 1 ml complete di ago. Questi presidi risultano affidabili ed economici. Alcuni studi dimostrano che le siringhe di plastica monouso pos-

TAB. I. PREPARAZIONI DI INSULINA ATTUALMENTE DISPONIBILI

Caratteristiche farmacodinamiche	Ditta produttrice	Insuline umane biosintetiche da DNA ricombinante	Inizio azione (ore)	Picco (ore)	Durata (ore)
A durata d'azione breve	Novo Nordisk	<i>Actrapid HM</i> f, c	0,5	2,5-5	8
	Guidotti	<i>Bio-Insulin R</i> (regolare) f, c	0,5	1-3	5-7
	Lilly	<i>Humulin R</i> (regolare) f, c	0,5	1-3	5-7
A durata d'azione intermedia	Novo Nordisk	<i>Monotard HM</i> f	2,5	7-15	22
		<i>Protaphane HM</i> f, c	1,5	4-12	24
	Guidotti	<i>Bio-Insulin I</i> f, c	1	2-8	18-20
		<i>Bio-Insulin L^{oo}</i> f	1,5	4-10	24
	Lilly	<i>Humulin I</i> f, c	1	2-8	18-20
		<i>Humulin L^{oo}</i> f	1,5	4-10	24
A durata d'azione lunga	Guidotti	<i>Bio-Insulin U</i> f	2-6	8-24	24-28
	Lilly	<i>Humulin U</i> f	2-6	8-24	24-28
	Novo Nordisk	<i>Ultratard HM</i> f	4	8-24	28
Ad azione bifasica (miscela di insulina regolare e rispettivamente di insulina isofano)	Novo Nordisk	<i>Actraphane</i> f, c 10/90; 20/80; 30/70; 40/60; 50/50	0,5	2-12	24
	Guidotti	<i>Bio-Insulin</i> f, c 10/90; 20/80; 30/70; 40/60; 50/50	0,5	1-8	14-18
	Lilly	<i>Humulin</i> f, c 10/90; 20/80; 30/70; 40/60; 50/50	0,5	1-8	14-18

f = flaconcino da 10 ml 40 U.I./ml.

c = cartuccia (tubofiale) da 1,5 ml 100 U.I./ml. Le cartucce della Novo Nordisk vengono chiamate *Penfill*

"" = usualmente vengono considerate a lunga durata d'azione nella pratica clinica.

sono essere riutilizzate dallo stesso paziente diabetico senza rischio di contaminazioni batteriche. Se reincappucciate subito dopo l'uso e conservate in un recipiente chiuso in frigorifero possono essere impiegate con sicurezza per almeno una settimana. Le *siringhe di vetro* vengono usate solo occasionalmente.

Le insuline che vengono impiegate con le siringhe convenzionali devono essere prelevate dai flaconcini.

Iniettori di insulina a penna

In Italia esistono vari modelli di iniettori a penna funzionanti con le tubofiale da insulina da 1,5 ml, prodotti dalla Novo Nordisk e dalla Becton-Dickinson. Le loro caratteristiche vengono riassunte nella tab. II. Le ditte produttrici di insuline raccomandano di usare le loro cartucce con una penna specifica (la Novo Nordisk, la *NovoPen*; la Lilly e la Guidotti, la *B-D Pen*). Le tubofiale sono prescrivibili a

TAB. II. INIETTORI DI INSULINA A PENNA

(Dati al 30 giugno 1996)

Nome commerciale	Ditta produttrice	Caratteristiche tecniche
NOVOPEN	Novo Nordisk	— Somministrazione automatica di 2 unità di insulina per volta sino ad un massimo pari al contenuto della tubofiale (150 unità) — Completamente metallica
NOVOPEN II	Novo Nordisk	— Selezione programmabile da 2 a 36 unità di insulina (2 unità per volta) — Sistema di sicurezza per la correzione degli errori di selezione — In materiale plastico
NOVOPEN 1,5	Novo Nordisk	— Selezione programmabile da 1 a 40 unità di insulina con scatti singoli — Completamente metallica — Sistema di sicurezza per la correzione degli errori di selezione
NOVOPEN « Arcobaleno »	Novo Nordisk	— Versione nei colori blu, giallo, rosso, verde della NOVOPEN II
La ditta Novo Nordisk raccomanda di utilizzare le penne NOVOPEN solo con le tubofiale <i>Penfill</i> di propria produzione.		
NOVOPEN	Becton Dickinson	— Selezione programmabile da 1 a 36 unità di insulina con scatti singoli — Dispositivo di azzeramento per la correzione degli errori di selezione — In materiale plastico — Utilizzabile con tutte le insuline in cartuccia da 1,5 ml
B-D PEN	Becton Dickinson	— Selezione programmabile da 1 a 59 unità di insulina con scatti singoli — Dispositivo di azzeramento per la correzione degli errori di selezione — Memoria dell'ultima dose iniettata — In materiale plastico — Utilizzabile con tutte le insuline in cartuccia da 1,5 ml

carico del SSN, mentre le penne e gli aghi vengono dispensati gratuitamente dai consultori diabetologici. Molti pazienti preferiscono le penne (che consentono di evitare di dover aspirare l'insulina dal flaconcino prima dell'uso) in virtù della loro maggiore comodità rispetto alle tradizionali siringhe e flaconcini.

Le iniezioni possono essere effettuate con una sola mano, premendo il pulsante. Questi tipi di penne non richiedono l'inserimento delle cartucce e si rivelano utili nei pazienti che hanno problemi visivi, scarsa coordinazione o artrite reumatoide.

I pazienti devono essere istruiti sull'uso degli iniettori a penna prima che vengano loro consegnati. Alcuni pazienti portano con sé una cartuccia di riserva in caso di smarrimento o di fallimento della prima. È importante che i pazienti che usano le penne sappiano anche come prelevare l'insulina da un flaconcino con una siringa convenzionale nel caso capitasse loro di perdere la penna o in caso di suo non funzionamento.

Bibliografia

- Collins B. J. et al., *Lancet*, 1983, i, 559-561.
 Davis S. N., Granner D. K., *Insulin*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9 ed., 1996, McGraw-Hill, New York, pp. 1487-1507.
 DTB (*Drug and Therapeutics Bulletin*), 1992, 30, 3-4.
 DTB (*Drug and Therapeutics Bulletin*), 1996, 5, 11-14.
 Lester E. et al., *Br. Med. J.*, 1994, 289, 1498-1499.

MAURO MISELLI

INTELLIGENZA ARTIFICIALE

1. artificial intelligence.

Tra le tante definizioni di «intelligenza» (v. VII, 2090), quella di «capacità di risolvere problemi nuovi» sembra la più efficace, realistica e concisa. In questo modo l'intelligenza appare come una qualità valutabile e quantificabile mediante test decisionali su situazioni paradigmatiche. Negli anni '40, a seguito dell'entusiasmo che la nuova scienza informatica generava, grazie a elettronici e matematici come McCulloch, Shannon, Von Neumann, Turing, grande interesse veniva riposto nell'allestimento di sistemi elettronici in grado di dimostrare comportamento intelligente in compiti decisionali tipicamente umani.

Negli anni '60 Minsky denomina questa branca dell'informatica «Intelligenza Artificiale» (brevemente I. A.) e definisce le componenti principali di quei programmi, più tardi chiamati «sistemi esperti» (v. *6723), orientati appunto a compiti diagnostici/decisionali.

Questo approccio, fortemente computazionale, derivava dai concetti di funzionalismo particolarmente graditi a psicologi e informatici di quel tempo, che ipotizzavano che l'intelligenza fosse una «procedura» indipendente dal substrato fisico che la metteva in essere. In altri termini, secondo questi principi un comportamento intelligente può essere definito matematicamente e non è necessario un cervello biologico per effettuarlo. Interessi bellici ed economici produssero sistemi esperti realmente efficaci e conseguentemente per un breve periodo ci fu anche una ricaduta nell'ambito della ricerca in psicologia, con la creazione di programmi in grado di sostenere «conversazioni» (ELIZA) o di eseguire compiti manipolativi su di uno scenario semplificato in base ad ordini umani espressi in linguaggio corrente (SHRDLU).

Questi tentativi miravano a dimostrare la capacità di «comprensione» dell'ambiente nel quale il calcolatore operava; in realtà solo a verifiche superficiali si creava questa illusione.

In termini riduttivi e schematici un sistema esperto è paragonabile ad un dizionario sempre aggiornabile e molto agevole nella consultazione (sotto questo aspetto la qualità «intelligenza» si svuota del suo significato, senza contare la necessità di un progettista sicuramente più intelligente del sistema). Esso è costituito da un archivio di verità depositate (base della conoscenza) e di un sistema di confronto tra i dati in ingresso e la base della conoscenza (motore inferenziale). I più comuni meccanismi di ricerca sono quelli ad «albero» con notevoli varianti per la ottimizzazione della funzione.

Numerose applicazioni sono attualmente utilizzate in ambito scientifico, e i seguenti nomi ne esemplificano alcune:

MYCIN: diagnostica le infezioni batteriche e ne suggerisce il trattamento

HODGKIN: pianifica le procedure diagnostiche per il morbo di Hodgkin

GENESIS: aiuta a programmare e simulare esperimenti di sintesi genetica

EURISKO: usato per progettare circuiti elettronici

DENDRAL: interpreta dati sulla spettrometria di massa per determinare strutture molecolari

AIRPLAN: pianifica il traffico aereo attorno ad una portaerei

LDS: imita i processi decisionali degli avvocati

SOPHIE: diagnostica gli errori nei circuiti elettronici.

Per quanto efficaci si dimostrino questi sistemi, ad un'analisi anche superficiale appare evidente che la loro intelligenza è qualitativamente, oltre che quantitativamente, molto diversa dall'intelligenza biologica. Le differenze più eclatanti emergono quando il sistema deve processare dati di ingresso parziali e/o contraddittori o del tutto nuovi. In questi casi i sistemi esperti sbagliano troppo o non raggiungono alcuna conclusione. In altri termini tutte le soluzioni devono essere previste dal sistema. Per ovviare parzialmente a queste limitazioni sono state implementate procedure di addestramento costante e di continuo ampliamento della base delle conoscenze.

Parallelamente, e necessariamente in contrasto con questo approccio metodologico, si sono sviluppati modelli «connessionisti» del sistema nervoso biologico, questa volta con particolare attenzione alle reali modalità di funzionamento dei neuroni e delle relative connessioni (sinapsi) anche se necessariamente semplificate. Hebb negli anni '40 aveva ipotizzato meccanismi di plasticità sinaptica (v. NEUROPLASTICITÀ**) retroattivi al funzionamento dei neuroni coinvolti, che apparivano plausibili con i dati neurofisiologici. Così negli anni '60 Minsky e Rosenblatt allestiscono il *perceptrone*, un modello semplificato di neurone e relative sinapsi in grado di apprendere il riconoscimento di alcune categorie di stimoli strutturati, ma invece di sviluppare questa metodologia ne sanciscono i limiti e di fatto arrestano la ricerca in ambito connessionista per circa 20 anni. Solo quando Hopfield, Rumelhart e McClelland negli anni '80 riprendono le sperimentazioni con perceptroni multistrato, si scorgono le notevoli potenzialità di questi sistemi che ormai vengono identificati con il termine di «reti neurali artificiali» (v.**). Sinteticamente questi sistemi sono basati sul funzionamento parallelo di «unità» che singolarmente compiono operazioni molto semplici ma che collettivamente sono capaci di compiti di riconoscimento, classificazione e generalizzazione molto sofisticati. Questi sistemi, contrariamente ai precedenti, non hanno una base di conoscenze definita *a priori* ma devono essere addestrati al compito. La continua ripetizione del compito e la conseguente correzione degli errori, costruisce di fatto la «conoscenza» della rete modificandone fisicamente la struttura e le modalità di interconnessione.

Esistono meccanismi di apprendimento supervisionato e non. Mentre i primi hanno immediati risvolti applicativi nella diagnostica medica, nelle previsioni economiche e metereologiche, e nella robotica, i secondi destano profondo interesse nella modellistica del sistema nervoso biologico.

Tra le caratteristiche peculiari di questi sistemi, la *plasticità*, ossia il continuo adattamento al compito, e la *capacità di generalizzare* li rende particolarmente efficaci nell'affrontare problemi decisionali su dati di ingresso non ben definiti o mascherati da «rumore».

Secondo la definizione iniziale di intelligenza, ogni soluzione di problemi richiede una precisa mediazione tra riconoscimento di situazioni già sperimentate e generalizzazione su situazioni nuove.

I sistemi biologici, anche i più elementari, per sopravvivere devono costantemente affrontare problemi di questo genere considerando la variabilità dell'ambiente naturale: è comprensibile quindi che l'evoluzione abbia selezionato i meccanismi più efficienti allo scopo. Da questo punto di vista i sistemi connessionisti artificiali si dimostrano quindi sicuramente i migliori candidati per lo sviluppo di comportamenti intelligenti paragonabili a quelli biologici.

I processi evolutivi biologici però, nel corso dell'aumento di complessità delle singole specie, hanno prodotto la «consapevolezza» o «coscienza» dell'individuo (v. COSCIENZA, IV, 1207), che evidentemente permette una pianificazione migliore delle scelte operative. Una definizione di consapevolezza è ancora più elusiva e difficile di quella di intelligenza: in modo estremamente riduttivo la prima potrebbe essere considerata un processo che prepara l'azione e ne immagina alcune conseguenze sull'ambiente e sull'individuo stesso. È necessario quindi che l'individuo sia complesso al punto da avere gli strumenti per ottenere una buona conoscenza del mondo e di sé. Probabilmente questo è il motivo per cui nella specie umana la consapevolezza è strettamente connessa a qualità cenestesiche ed etiche.

Queste ultime considerazioni inevitabilmente raffreddano l'ottimismo circa la possibilità di raggiungere rapidamente una buona simulazione dell'intelligenza biologica più evoluta, poiché sembrerebbe indispensabile simulare contemporaneamente un «corpo» evoluto.

V. anche BIONICA, II, 2379; INFORMATICA (VII, 1945: *3775); RETI NEURALI ARTIFICIALI**; SISTEMI ESPERTI*, col. *6723.

Bibliografia

- Anderson J. A., Rosenfeld E., *Neurocomputing*, 1988, MIT Press, Cambridge, Mass.
- Bar A., Feigenbaum E. A., *The handbook of Artificial Intelligence*, I, 1981, Pitman.
- Bar A., Feigenbaum E. A., *The handbook of Artificial Intelligence*, II, 1982, Pitman.
- Boden M., *Artificial Intelligence and Natural Man*, 1977, Harvester Press.
- Cohen P. R., Feigenbaum E. A., *The handbook of Artificial Intelligence*, III, 1983, Pitman.
- Grossberg S., *Neural networks and natural intelligence*, 1988, MIT Press, Cambridge, Mass.
- Parisi D., *Intervista sulle reti neurali*, 1989, Il Mulino.
- Rumelhart D. E., McClelland J. L., *Parallel distributed processing*, I-II, 1986, MIT Press, Cambridge, Mass.
- Simon G. L., *Intelligenza Artificiale la nuova frontiera dell'informatica*, S. Feltrinelli, Napoli, Milano.
- Winston P. H., *Artificial Intelligence*, 1984, Addison Wesley.

NERI ACCORNERO

INTERFERONE: V. INTERFERONE (VIII, 2109-2114); INTERFERONE* (*3867-3882); CITOCHINE** (*1223-1235)

INTERLEUCHINE [v. Agg. I, coll. *3883-3894]

SOMMARIO

Introduzione (col. 2796). - Le nuove citochine (col. 2798). - Il sistema IL-1 (col. 2799). - Il sistema TNF (col. 2799). - Prospettive future (col. 2800).

Introduzione

Dalla pubblicazione della precedente voce (v. INTERLEUCHINE*), la ricerca in questo campo si è sviluppata secondo due direzioni: da un lato è aumentato il numero delle interleuchine descritte (che ora arrivano all'IL-15) ed in particolare delle i. chemiotattiche; dall'altro la ricerca sulle due più studiate, IL-1 e TNF, ha evidenziato una serie di molecole correlate (inibitori, antagonisti, recettori solubili) che rende necessario parlarne in termini di «sistema IL-1» e «sistema TNF».

Il termine «interleuchine» è stato adottato negli anni '70, per definire mediatori solubili di natura proteica che fanno comunicare tra loro diverse popolazioni leucocitarie. Da qui la regola di assegnare alle nuove molecole di questo tipo un numero (IL-1, IL-2, ... IL-15). Tuttavia risulta sempre più chiaro come queste molecole siano in realtà prodotte da moltissimi tipi di cellule, non solo del sistema immunitario, ed abbiano una vasta gamma di attività su diverse cellule bersaglio (anch'esse non solo del sistema immunitario). Per tale motivo è ormai uso corrente che a questi mediatori ci si riferisca utilizzando il termine più generico di *citochine* (v.**), sebbene per molte di esse si sia conservato il nome *interleuchine*, tranne che per il TNF (*Tumor Necrosis Factor*, fattore necrotico antitumorale), i CSF (*Colony Stimulating Factors*, fattori di crescita emopoietici) e l'IFN (interferone), termini che fanno riferimento alla loro attività biologica.

Per quanto riguarda gli aspetti più prettamente «immunologici» delle i., una chiave interpretativa è stata fornita dagli studi di Mossman nel topo, estesi all'uomo dal gruppo di Romagnani a Firenze. Questi studi hanno mostrato che i cloni di linfociti T-cooperanti (T-helper) possono essere classificati in due tipi (TH1 e TH2) a seconda della loro dipendenza da IL-4. Le cellule TH1 e TH2 sono caratterizzate da un diverso spettro di produzione di citochine, come mostrato in fig. 1. Essendo del tipo TH2, i cloni T CD4⁺ che

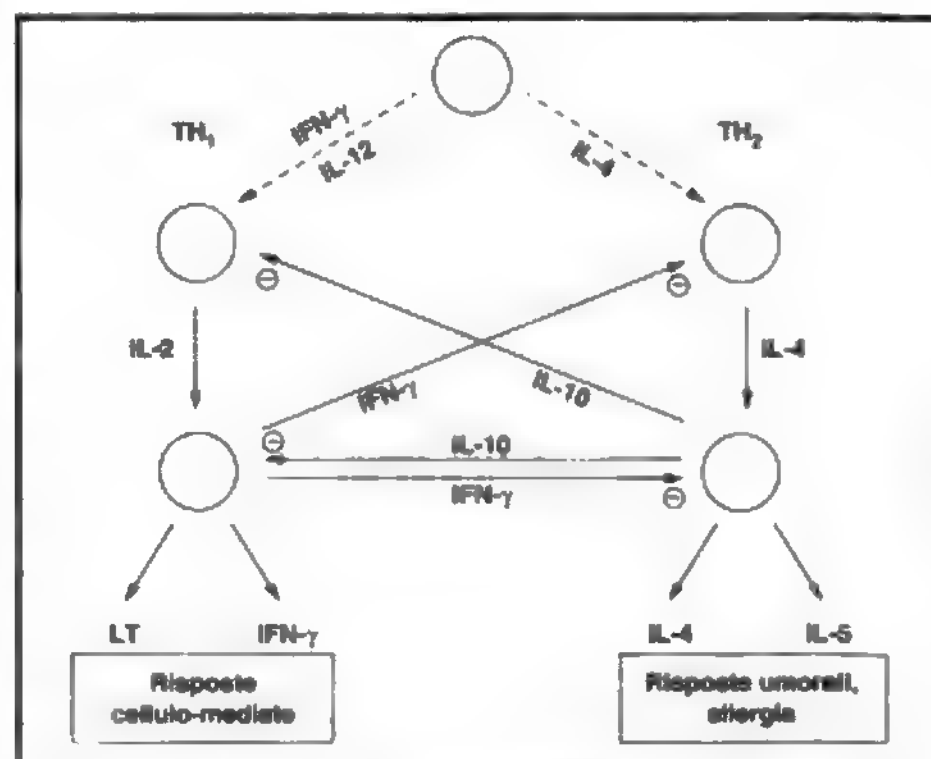


Fig. 1. Le citochine coinvolte nella regolazione delle cellule TH1 e TH2. Per le sigle, cfr. tab. I.

riconoscono gli allergeni, è importante sottolineare come l'IL-5 sia attiva sulla differenziazione e la funzione degli eosinofili, che sono tipici delle malattie allergiche. Oltre a costituire un fattore di crescita per le cellule TH2 mature, IL-4 favorisce anche il differenziamento di precursori T in senso TH2. IL-4 è pertanto uno dei mediatori centrali nella patogenesi dell'allergia.

La fig. 1 schematizza anche alcuni circuiti di regolazione negativa fra cellule TH1 e TH2: l'IFN- γ , prodotto da cellule TH1, inibisce le cellule TH2 mentre l'IL-10 prodotta da cellule TH2 (ma non solo da queste), inibisce la produzione di IFN- γ da parte di cellule TH1.

Una seconda considerazione importante va fatta rispetto alle applicazioni cliniche delle i. e delle citochine. L'uso terapeutico di citochine ricombinanti dei CSF e di IL-2 era già stato accennato nella voce comparsa nell'Agg. I, e molte di queste molecole sono ormai entrate nella pratica clinica.

Tuttavia, come si era detto, molte i. (in particolare TNF, IL-1, IL-8 ed altre citochine chemiotattiche) hanno attività

proinfiammatorie che ne fanno degli importanti mediatori patogenetici implicati nelle patologie infiammatorie (inclusa l'infiammazione sistemica associata alla sepsi). La ricerca farmacologica in questo caso è orientata non soltanto alla ricerca di citochine da somministrare come farmaci, ma piuttosto alla ricerca di inibitori delle citochine.

Le nuove citochine

Come detto sopra, il maggior numero di citochine recentemente descritte appartiene alla classe delle citochine chemiotattiche (*chemochine*) che verranno descritte a parte in questo aggiornamento (v. CHEMOCINE**; CITOCHINE**).

Un sommario delle «nuove» i., o citochine, non incluse nel precedente Agg. I e delle loro principali attività biologiche è fornito in tab. I. In alcuni casi abbiamo ritenuto utile menzionare i nomi alternativi alla numerazione «IL», in quanto ne sottolineano spesso l'attività biologica principale o quella per cui l'i. è stata inizialmente descritta.

TAB. I. PRINCIPALI CARATTERISTICHE DELLE INTERLEUCHINE

Nome	Peso molecolare (kD)	Cellule produttrici	Attività biologiche e bersagli principali	Nomi alternativi
IL-1	17	Diverse. Soprattutto monociti/macrofagi	Diversi: linfociti T e B. Febbre, riassorbimento osseo, effetti vascolari	Pirogeno endogeno; LAF
IL-2	15	Linfociti T attivati	Crescita di linfociti T e B. Citotossicità NK-LAK	TCGF
IL-3	28	Linfociti T attivati	Crescita di precursori emopoietici immaturi; mastociti	Multi-CSF
IL-4	20	Linfociti TH2 attivati; mastociti	Crescita di linfociti T e B; produzione di IgE; mastociti	BSF-2 BCGF-II
IL-5	45	Linfociti TH2 attivati	Differenziazione eosinofili; produzione IgA	Eo-CSF BCGF-II
IL-6	19-21	Diverse. Soprattutto monociti/macrofagi e cellule endoteliali	Crescita linfociti B e T. Stimolazione proteine di fase acuta epatiche	BSF-2; interferoneB2; hepatocyte-stimulating factor
IL-7	25	Stroma midollare	Linfociti T e B	
IL-8	8	Diverse. Soprattutto monociti/macrofagi e cellule endoteliali	Chemiotassi e attivazione di neutrofili, linfociti T, basofili e cellule di melanoma	Neutrophil-activating protein-1
IL-9	40	Linfociti T	Crescita di cloni T, megacariociti e precursori mieloidi	p40
IL-10	20	Linfociti T (TH2)	Inibisce la produzione di citochine da macrofagi	CSIF
IL-11	19	Linfociti stromali	Attivazione cellule B. Stimolazione proteine di fase acuta epatiche	—
IL-12	75 (dimero 40 + 35)	Linfociti B. Monociti	Crescita di cellule T ed NK. Differenziazione TH1	NKCSF
IL-13	15	Linfociti T attivati	Inibisce la produzione di citochine da macrofagi. Crescita di linfociti B	
IL-14	53	Linfociti T	Crescita di linfociti B	HMW-BCGF
IL-15	14-15	Monociti; cellule epiteliali	Crescita di cloni T citotossici (CTL)	

BSF: B-cell stimulating factor (fattore stimolante i linfociti B).

CSIF: cytokine synthesis inhibitory factor (inibitore della sintesi di citochine).

HMW-BCGF: high-molecular weight B-cell growth factor (fattore di crescita per linfociti B ad alto peso molecolare).

LAF: lymphocyte activating factor (fattore di attivazione dei linfociti).

NKCSF: NK-cell stimulating factor (fattore stimolante i linfociti NK).

TCGF: T-cell growth factor (fattore di crescita dei linfociti T).

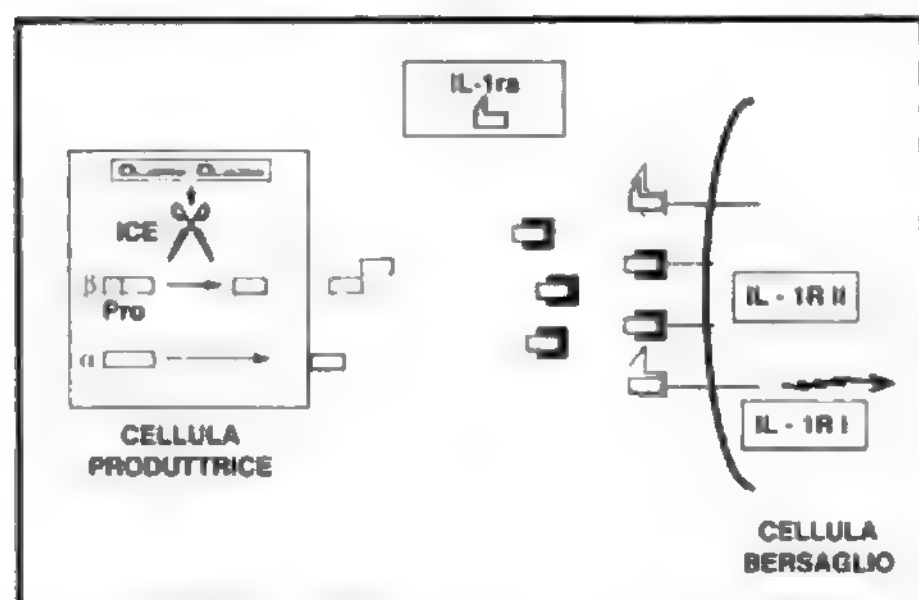


Fig. 2. Il «sistema IL-1». IL-1ra: antagonista del recettore dell'IL-1; ICE: IL-1 converting enzyme; β Pro: precursore dell'IL-1 β . Per la spiegazione v. testo.

Il sistema IL-1

L'IL-1 è il principale pirogeno endogeno e la citochina forse più studiata per la sua attività proinfiammatoria. Queste attività, come nel caso della stragrande maggioranza di citochine e ormoni, è dovuta all'interazione con recettori specifici posti sulla membrana cellulare. In realtà esistono diverse IL-1: IL-1 α , IL-1 β ed IL-1ra.

IL-1 α , IL-1 β sono due forme con attività *agonista* (cioè con le attività biologiche di IL-1, incluse la febbre, l'infiammazione, etc.). L'IL-1 β viene sintetizzata come molecola più grande (pro-IL-1) che per essere secreta viene tagliata proteoliticamente da un enzima (ICE, IL-1-converting enzyme) che ne libera la molecola matura ed attiva.

IL-1ra (IL-1-receptor antagonist) è un *antagonista recettoriale*, ovvero si lega al recettore di IL-1 (come IL-1 α e β) ma non induce nessuna attività. Il suo legame al recettore impedisce all'IL-1 di legarsi ed attivarlo, e pertanto IL-1ra è da considerarsi un antagonista recettoriale vero e proprio. Va detto che esistono diverse forme, alcune secrete ed altre intracellulari, di IL-1ra. La sintesi di IL-1ra viene indotta, *in vivo* ed *in vitro*, da prodotti batterici, insieme a quella di IL-1.

Anche per quanto riguarda i recettori, la situazione è complessa. Sono stati infatti descritti due tipi di recettori per IL-1, detti di tipo 1 e di tipo 2. Il recettore di tipo 1 è chiaramente implicato nella trasduzione del segnale e dunque nelle attività biologiche di IL-1. Al contrario, per il recettore di tipo 2 non solo non si è dimostrata nessuna attività, ma agirebbe in realtà da recettore «trappola» (in inglese *decoy*, specchietto per le allodole) che sottrarrebbe molecole di IL-1 al recettore vero e proprio, come mostrato da nostri studi.

La complessità del «sistema IL-1» è mostrata in fig. 2. L'esistenza di inibitori endogeni (IL-1ra e recettore di tipo 2) mostra come, essendo l'IL-1 una molecola che, se presente in eccesso, è tossica, si siano evoluti diversi meccanismi per limitarne l'azione, e ne sottolinea il ruolo patogenetico fondamentale.

Il sistema TNF

La tossicità di questa citochina (*Tumor Necrosis Factor*) ne limita, fortunatamente, la possibile applicazione come farmaco antitumorale. Anche in questo caso gli studi sono orientati, ormai quasi esclusivamente, sul ruolo patogenetico e sulla ricerca di antagonisti ed inibitori.

L'utilizzo di anticorpi anti-TNF in modelli animali di pa-

tologie umane ha mostrato che il TNF ha un ruolo chiave nella patogenesi dello shock settico ed endotossico, dell'encefalomielite allergica, della malaria cerebrale e della meningite batterica.

Esistono due forme di TNF (α e β , quest'ultima nota anche come *linfotossina*), con attività infiammatorie e tossiche largamente sovrapponibili.

Esistono due diversi recettori per il TNF, TNFR55 e TNFR75 (rispettivamente, di peso molecolare 55 e 75). Sembra che il recettore 75 abbia un ruolo particolare nella tossicità del TNF rispetto al 55, e si stanno studiando molecole specifiche per il TNFR55 che possano essere sperimentate come antitumorali.

Anche nel caso del TNF, esistono degli inibitori endogeni che, in questo caso sono i recettori solubili. Le stesse molecole TNFR55 e TNFR75 che, presenti in membrana, trasducono il segnale e mediano le varie attività biologiche del TNF, possono venire rilasciate come recettori solubili. Questi, non essendo in membrana, e quindi connessi ai sistemi di trasduzione del segnale, si comportano da inibitori: sottraggono, legandolo, il TNF dal circolo impedendone così il legame ai recettori di membrana e dunque la tossicità. I livelli circolanti dei recettori solubili di TNF aumentano in seguito ad infezione o infiammazione, probabilmente a limitare le azioni tossiche del TNF.

Prospettive future

Sono in corso sperimentazioni cliniche con diversi inibitori di IL-1 e TNF (recettori solubili, anticorpi, antagonisti recettoriali) in patologie infiammatorie o infettive. Gli studi clinici più recenti hanno, in particolare, mostrato un'efficacia terapeutica di anticorpi anti-TNF nell'artrite reumatoide e nel morbo di Crohn. Analogamente, si pensa di sfruttare in questo senso l'attività di inibizione della sintesi di TNF da parte dell'IL-10.

Tuttavia, la ricerca farmacologica sta arrivando allo sviluppo di piccole molecole come inibitori della sintesi o dell'azione di TNF ed IL-1.

Bibliografia

- Colotta F., Dower S. K., Sims J. E. and Mantovani A., *Immunol. Today*, 1994, **15**, 562.
 Dinarello C. A., *Blood*, 1991, **77**, 1627.
 Dinarello C. A., Wolff S. M., *New Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 106.
 Romagnani S., *Immunol. Today*, 1990, **11**, 316.
 Thomson A. W. ed., *The Cytokine Handbook*, 1995, 2 ed., Academic Press-Harcourt Brace & Company, London-New York.
 Tracey K. J., Cerami A., *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1993, **9**, 317.

PETRO GHEZZI E ALBERTO MANTOVANI

INTESTINO TENUE E CRASSO [v. vol. VII, coll. 2118-2402; Agg. I, coll. *3896-3934; v. anche RETTO E ANO, vol. XIII, coll. 1121-1230]

SOMMARIO GENERALE

FISIOLOGIA	col. 2800
CANCRO DEL COLON-RETTO	col. 2823
CHIRURGIA DEL CRASSO E DEL RETTO	col. 2841

FISIOLOGIA

SOMMARIO

MOTILITÀ INTESTINALE	col. 2801
Motilità dell'intestino tenue (col. 2801): <i>Genesi e controllo dell'attività motoria. - Fasi di attività e di quiescenza. - Sfintere ileo-cecale</i> (col. 2803) - <i>Motilità dell'intestino crasso</i> (col. 2804): <i>Proprietà miotettiche. - Controllo nervoso. - Controllo ormonale.</i>	

PROCESSI DI ASSORBIMENTO E DI SECREZIONE col. 2808

Trasporto idrosalino (col. 2808): *Aspetti quantitativi. - Meccanismi di trasporto. - Digiuno. - Ileo. - Colon. - Assorbimento del calcio* (col. 2812): *Fattori che agiscono nel lume intestinale. - Fattori cellulari. - Assorbimento del ferro* (col. 2813): *Fattori che agiscono nel lume intestinale. - Fattori cellulari. - Regolazione dell'assorbimento. - Assorbimento di vitamine* (col. 2815): *Vitamina A (Retinolo). - Acido folico (acido pteroilglutammico, PteGlu₁)* - **Funzioni secretorie e di assorbimento connesse con l'immunità intestinale** (col. 2817).

DIGESTIONE BATTERICA NEL COLON. ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI col. 2817
Digestione batterica (col. 2817). - **Assorbimento degli acidi grassi volatili** (col. 2820).

GAS INTESTINALI col. 2821

MOTILITÀ INTESTINALE

Motilità dell'intestino tenue

Genesi e controllo dell'attività motoria

Il movimento del chimo lungo l'intestino tenue è un fenomeno complesso che dipende dalla interazione di molteplici fattori miogeni, nervosi ed umorali.

Il **ritmo elettrico basale** (BER, *Basic Electrical Rhythm*) nell'intestino tenue è generato nelle cellule *pacemaker* dello strato di muscolatura longitudinale e da qui si propaga nello strato circolare. La frequenza del BER va progressivamente decrescendo in senso aborale da 12 cicli/sec nel duodeno a 8 cicli/sec nell'ileo.

Il transito intestinale del chimo è controllato: 1) dal gradiente di frequenza in senso aborale del BER lungo tutto il tenue; 2) dalla propagazione del potenziale elettrico dalle cellule *pacemaker* alla muscolatura contigua.

Nel duodeno e nel digiuno prossimale esiste una stretta copula delle onde lente generate dal BER con i siti vicini; ciò determina una frequenza costante delle contrazioni nell'intestino prossimale, mentre viceversa, nella porzione distale del tenue, non tutte le onde lente riescono a propagarsi alla muscolatura contigua. Questa incostante propagazione fa ulteriormente aumentare il gradiente di frequenza delle contrazioni tra intestino prossimale e distale.

La frequenza del BER è stimolata dagli ormoni tiroidei ed inibita dal progesterone (aumento della peristalsi e

diarrea nelle tireotossicosi e costipazione durante la gravidanza).

L'intestino tenue riceve l'innervazione estrinseca dal sistema nervoso autonomo. I nervi parasimpatici stimolano le contrazioni mentre quelli simpatici le inibiscono. I nervi estrinseci agiscono sia direttamente sulle cellule muscolari, che indirettamente tramite i nervi intrinseci del plesso mienterico. La muscolatura liscia intestinale possiede recettori sia α - che β -adrenergici; l'attivazione di questi recettori inibisce la contrattilità. In alcune specie animali la noradrenalina esplica la sua azione inibente facendo diminuire la liberazione di acetilcolina dal sistema nervoso intrinseco. Recettori adrenergici sono presenti inoltre nel plesso mienterico. La serotonina esercita un'azione stimolante sull'attività contrattile del tenue. Altri neurotrasmettitori non adrenergici che svolgono un ruolo nel controllo della motilità sono l'ATP ed il peptide intestinale vasoattivo (VIP) (v.**). Anche le encefaline intervengono nel controllo della motilità: esse, infatti, possono stimolare direttamente la muscolatura liscia e/o agire indirettamente tramite il plesso mienterico. La regolazione nervosa si attua inoltre tramite numerosi riflessi intestinali eccitatori o inibitori scatenati, ad es., in risposta al riempimento, alla distensione, alle manipolazioni e alla irritazione peritoneale.

Fasi di attività e di quiescenza

Durante il periodo interdigestivo il tenue mostra lunghi periodi di quiescenza alternati a fasi di intensa attività contrattile. Come per lo stomaco, l'attività elettrica e motoria interdigestiva della muscolatura liscia del tenue può essere schematicamente suddivisa in quattro fasi:

fase 1: periodo di quiescenza in cui non si osservano né potenziali a punta né attività motoria;

fase 2: periodo di potenziali a punta e attività motoria *random*;

fase 3: periodo di intensa attività elettrica e motoria che inizia a livello gastroduodenale o nel digiuno prossimale e si propaga in senso aborale lungo tutto l'intestino tenue svuotandolo di tutto il suo contenuto. Questo periodo di intensa attività, che si verifica ogni 90-110 min, viene anche denominato «complesso motorio migrante interdigestivo» (IMMC, *Interdigestive Migrating Motor Complex*) (fig. 1);

fase 4: breve periodo di transizione tra le fasi 3 e 1.

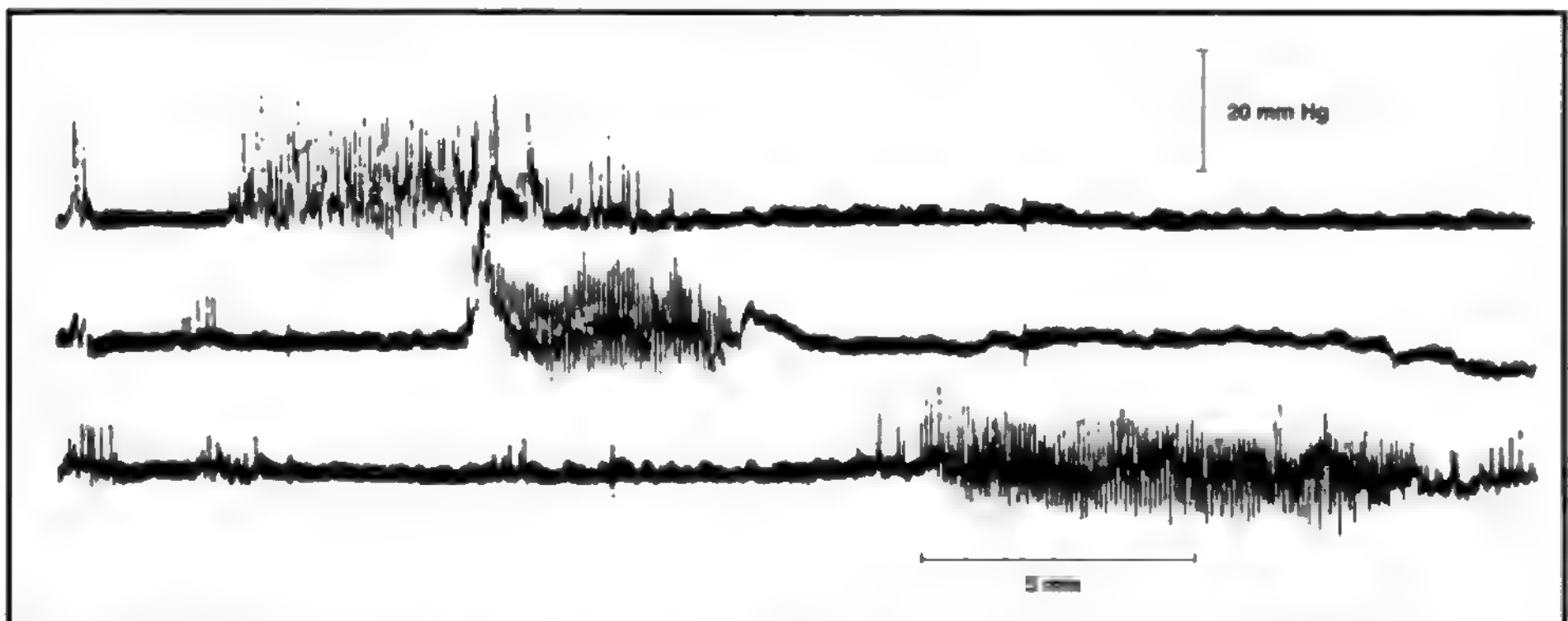


Fig. 1. Attività motoria interdigestiva (fase 3). Registrazione manometrica dei complessi motori migranti interdigestivi (IMMC: *Interdigestive Migrating Motor Complex*). (Da Van Trappen G. et al., 1977).

INTESTINO TENUE E CRASSO

I principali meccanismi che regolano l'IMMC sono: 1) il controllo nervoso estrinseco, 2) il controllo ormonale e 3) il controllo nervoso intrinseco.

1) Il sistema nervoso autonomo (SNA) non è direttamente responsabile dell'inizio dell'IMMC, ma ne modula l'attività anticipandone, ritardandone o inibendone l'insorgenza.

2) L'inizio dell'IMMC è strettamente correlato con il tasso ematico dell'ormone *motilina*. La somministrazione endovenosa di motilina può infatti far insorgere prematuramente la fase 3. Questa può iniziare anche a seguito di somministrazione di sostanze colinergiche o di oppiacei; in questi casi, però, con l'inizio dell'IMMC è sempre stato osservato aumento del tasso ematico della motilina. Altri ormoni o peptidi, quali il peptide pancreatico, la somatostatina, la sostanza P e l'istamina, sembrano essere correlati con l'insorgenza della fase 3.

3) Il fenomeno ciclico dell'IMMC è regolato dall'innervazione intrinseca dell'intestino tenue e sembra dipendere da oscillazioni spontanee dell'attività dei neuroni del plesso mienterico. Il propagarsi di queste oscillazioni è bloccato sia dalla interruzione del plesso mienterico (sezione intestinale e successiva rianastomosi), che dalla denervazione farmacologica sperimentale del plesso mediante iniezione *in loco* di atropina, esametonio e tetrodotossina. Questi dati fanno supporre che l'attività ciclica dell'IMMC si origini nei nervi intrinseci dell'intestino tenue e che l'innervazione estrinseca ed i fattori ormonali ne modulino l'attività. L'ingestione di un pasto arresta la fase 3 per alcune ore facendo iniziare l'attività motoria digestiva che è caratterizzata da raffiche *random* di potenziali a punta e di attività motoria. L'interruzione da pasto dell'IMMC dipende sia dalla quantità che dalla qualità del cibo ingerito. Infatti, la durata dell'interruzione è direttamente proporzionale al contenuto calorico e può essere influenzata dal tipo di alimenti ingeriti. A parità di contenuto calorico, ad es., i lipidi sono molto più efficaci dei glucidi e dei protidi nell'interrompere l'IMMC. Sembra che il tipo di alimento abbia forse un ruolo più importante nel determinare la durata piuttosto che l'induzione dell'interruzione della fase motoria interdigestiva. La nutrizione parenterale totale non modifica l'attività motoria interdigestiva: quindi le sostanze nutrienti in circolo non sono responsabili dell'interruzione dell'IMMC. La fase 3 può essere interrotta anche dagli ormoni gastrina, colecistochinina (CCK) ed insulina. L'inizio della fase 3 nel duodeno è coordinata sia con l'attività motoria ciclica interdigestiva dello sfintere esofageo inferiore, dello stomaco e delle vie biliari che con l'attività secretiva interdigestiva gastrica, pancreatica e biliare. Quest'ultima comincia in genere 10-30 minuti prima della comparsa dell'IMMC a livello duodenale. La coordinazione dell'attività secretoria con quella motoria può essere attribuita agli ormoni motilina e peptide pancreatico ed a riflessi nervosi intrinseci. Anche la 5-idrossitriptamina, che ha un'azione stimolante sulla motilità, partecipa al controllo dell'IMMC. La fase 3 è stata denominata anche «*pulitrice intestinale*» («*intestinal housekeeper*»), perché svolge la funzione di «*pulire*» periodicamente l'intestino tenue dalle secrezioni, dalle desquamazioni cellulari e dagli eventuali residui alimentari.

Sfintere ileo-cecale

Le poche ricerche eseguite sull'uomo indicano che lo sfintere ileocecale, pur non essendo una entità anatomica ben definibile, svolge, a causa dell'elevato tono muscolare basale, una vera e propria attività sfinterica. Esso, ad es., costituisce una barriera al reflusso del contenuto cecale nell'ileo, come è anche dimostrato dal fatto che nell'immediata prossimità dello sfintere la popolazione batterica dell'ileo è nettamente inferiore a quella del cieco.

La muscolatura liscia dello sfintere ha un ritmo di onde lente simile a quello dell'ileo e mostra scariche di potenziali spontanee con contrazioni fasiche.

Lo sfintere ileo-cecale si contrae in risposta a stimoli sia vagali che splanenici. La risposta vagale è mediata da nervi colinergici, quella splanenica si attua tramite eccitazione di recettori α -adrenergici.

Il funzionamento dello sfintere è regolato dai riflessi ileo-cecale e colon-ileale; lo sfintere si rilassa con qualche volta l'ileo viene disteso e si contrae con la distensione del colon. Il rilassamento riflesso dello sfintere da distensione del-

l'ileo si propaga a tutto il cieco favorendone il riempimento (*riflesso ricettivo*).

Motilità dell'intestino crasso

Le contrazioni del colon dipendono dalle onde lente di depolarizzazione e dai potenziali a punta generati dalle cellule muscolari lisce.

Da un punto di vista funzionale l'intestino crasso può essere suddiviso in tre parti: colon destro, colon sinistro e retto. Il colon destro svolge la funzione di mescolamento, di digestione batterica e di assorbimento idrosalino, di acidi grassi volatili e di gas; il colon sinistro è la sede dell'accumulo fecale e non ha essenziali funzioni digestive e di assorbimento di sostanze nutritive; il retto e l'ano sono la sede della regolazione del meccanismo della defecazione (v.).

Abitualmente le contrazioni del colon ascendente e di parte del trasverso sono di tipo antiperistaltico. La frequenza delle onde peristaltiche oscilla in media intorno a 5,5 cicli/min, la loro velocità di propagazione intorno a 1-2 cm/sec. La motilità del colon sinistro è differente; qui il contenuto intestinale, per la presenza di contrazioni anulari che si spostano lentamente verso il retto, viene frammentato in piccole masse globulari che diventano sempre meno fluide per l'assorbimento dell'acqua. La velocità di transito del contenuto dal colon destro al sinistro è la più lenta di tutto l'intestino e può durare anche giorni. Nel colon distale si verificano inoltre contrazioni peristaltiche, generate da potenziali a punta non correlati col BER, che sono responsabili dei cosiddetti *movimenti massivi* che spingono il contenuto del colon trasverso nel sigma.

Proprietà mioelettriche

Il BER nel colon prossimale origina da un *pacemaker* dominante situato nello strato muscolare circolare della parte mediana del colon ascendente; da qui le onde di depolarizzazione si propagano in direzione orale verso il cieco senza peraltro raggiungerlo. La frequenza delle contrazioni è stabilita dai potenziali a punta che si generano sulle creste delle onde lente (fig. 2). Questi potenziali a punta generano inoltre movimenti non propulsivi di segmentazione.

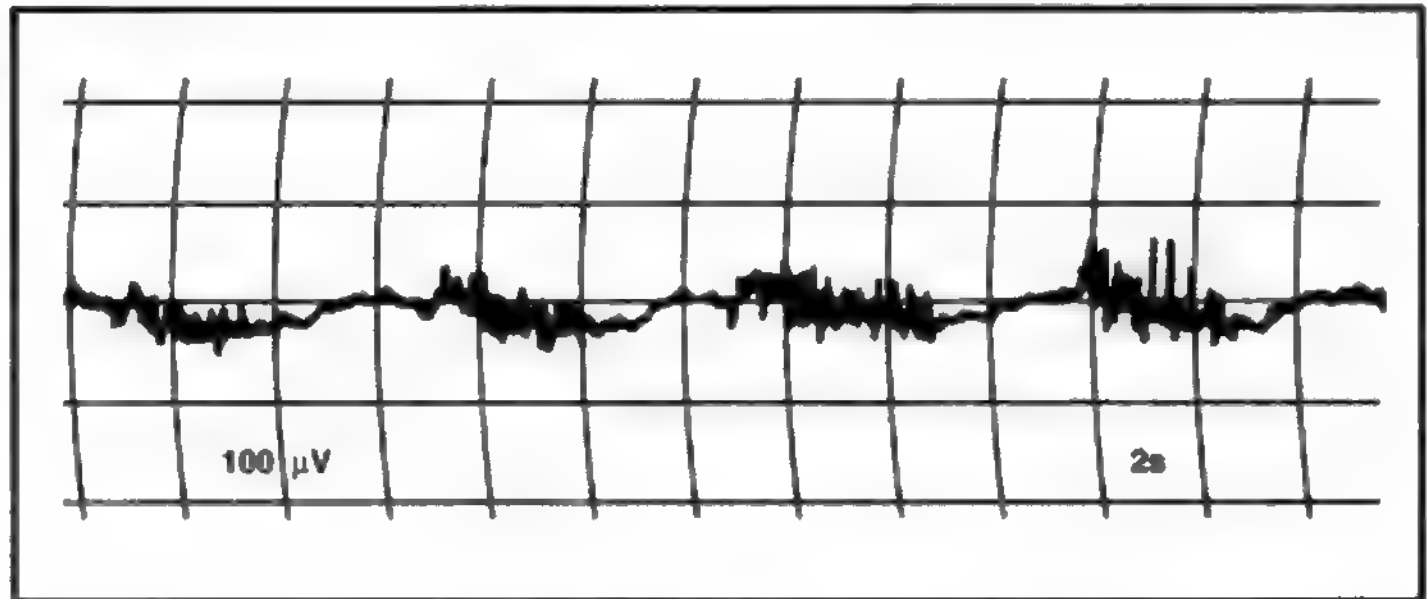
Nell'uomo non esistono prove sicure dell'esistenza di BER nel colon distale. Sembra invece che esistano dei potenziali oscillatori, non correlati con il BER, che danno origine a scariche migranti di potenziali a punta. Questi potenziali oscillatori si originano nella muscolatura longitudinale del colon trasverso e migrano in senso aborale. Le scariche migranti di potenziali a punta danno origine alle contrazioni peristaltiche responsabili dei movimenti massivi che spingono le feci nel sigma (fig. 3).

Le contrazioni intestinali generate nel colon trasverso e nell'ascendente sono dirette più frequentemente indietro verso il cieco che distalmente verso il retto; fatto questo che provoca un notevole rallentamento della velocità di transito in senso aborale del contenuto intestinale. Questo rallentamento favorisce sia la digestione batterica dei residui alimentari indigeriti ed indigeribili, sia l'assorbimento di sali ed acqua. Un accelerato transito in questo tratto d'intestino può, infatti, provocare diarrea per ridotto assorbimento idrosalino.

Il transito fecale nel colon non è regolarmente progressivo: il chimo proveniente dall'ileo può, infatti, mescolarsi nella prima porzione del colon con i residui alimentari di pasti precedenti.

I movimenti di segmentazione non propulsivi generati dai potenziali a punta delle onde lente, spostando avanti e indietro le feci, prevengono un rapido transito nel colon

Fig. 2. Potenziali a punta e onde lente registrati *in situ* nel colon umano. (Da Coutourier D. et al., 1969).



delle sostanze solide ma non di quelle liquide e gassose, che transitano con una velocità 30-100 volte più elevata.

Il cibo ingerito raggiunge normalmente l'ileo dopo circa 3 ore; lo svuotamento dell'ileo nel cieco può essere influenzato in via riflessa anche dall'accumulo di feci nel colon distale o nel retto (*riflessi colon-ileare e retto-ileare*).

Il passaggio del contenuto fecale dal colon ascendente al trasverso è accelerato dalla presenza nel lume di acidi grassi a lunga catena.

Il colon trasverso funge da deposito; qui le feci ristagnano fino a quando non saranno sospinte nel sigma dai movimenti massivi.

Dopo un pasto si verifica un notevole aumento dei potenziali a punta sovrapposti alle onde lente e dell'attività contrattile antiperistaltica e di segmentazione del colon prossimale. Si osserva, inoltre, un aumento delle scariche di potenziali a punta associate con l'aumento dell'attività contrattile propulsiva massiva (*riflesso gastrocolico e/o entero-colico*). L'entità della risposta è in rapporto con il numero

delle calorie e con la quantità di grassi del pasto ingerito. L'effetto di un pasto grasso sulla motilità del colon è difasico: uno precoce, che inizia dopo circa 10 min, l'altro tardivo che si verifica dopo 70-90 min (fig. 4). Il riflesso gastrocolico è dovuto alla stimolazione di recettori presenti nella mucosa gastroduodenale e la risposta è mediata sia dagli oppioidi che dall'acetilcolina. Il volume ed il pH del pasto non influenzano la motilità del colon, gli aminoacidi la inibiscono. La mancanza dell'effetto tardivo dopo un pasto misto può essere attribuita all'azione inibente degli aminoacidi (fig. 4). I movimenti massivi di propulsione si verificano più raramente (6% dei casi) anche durante il digiuno.

Controllo nervoso

Il colon prossimale nell'uomo riceve l'innervazione parasimpatica dal vago mentre quello distale riceve fibre colinergiche dai nervi del plesso pelvico sacrale. I nervi colinergici hanno un'azione stimolante; nel vago, però, esistono anche fibre inibitorie non colinergiche.

I nervi simpatici inibiscono la motilità del colon sia bloccando la trasmissione dell'impulso nelle sinapsi colinergiche del plesso mienterico, sia iperpolarizzando direttamente le cellule muscolari lisce. I recettori β -adrenergici sono coinvolti in questi meccanismi inibitori dato che i β -bloccanti fanno aumentare il tono basale nella regione rettosigmoidea. I gangli paravertebrali agiscono come modulatori dell'attività nervosa; i centri midollari spinali esercitano una inibizione nervosa cronica sulla motilità del colon (aumento della motilità nelle lesioni del midollo spinale), mentre i centri nervosi sopraspinali sembrano avere una influenza stimolatrice.

L'inibizione cronica nervosa sulla muscolatura liscia intestinale è mediata dal plesso mienterico. I neurotrasmettitori più importanti responsabili di questa mediazione sarebbero: sostanza P, VIP, encefalina e somatostatina. Questi neurotrasmettitori possono agire sia direttamente sulle cellule muscolari lisce, sia indirettamente sul plesso nervoso mienterico influenzando la liberazione di acetilcolina o noradrenalina.

Sono note le influenze di stati emotivi sulla motilità del colon. Una suggestiva espressione della suscettibilità del colon a influenze psiconeuromorali è illustrata dalla fig. 5.

Controllo ormonale

I peptidi gastrointestinali controllano la motilità del colon agendo sia come classici ormoni, sia come neurotrasmettitori locali.

La *gastrina* e la *colecistochinina* (CCK) fanno aumentare l'attività contrattile del colon. Dato che l'aumento del tasso

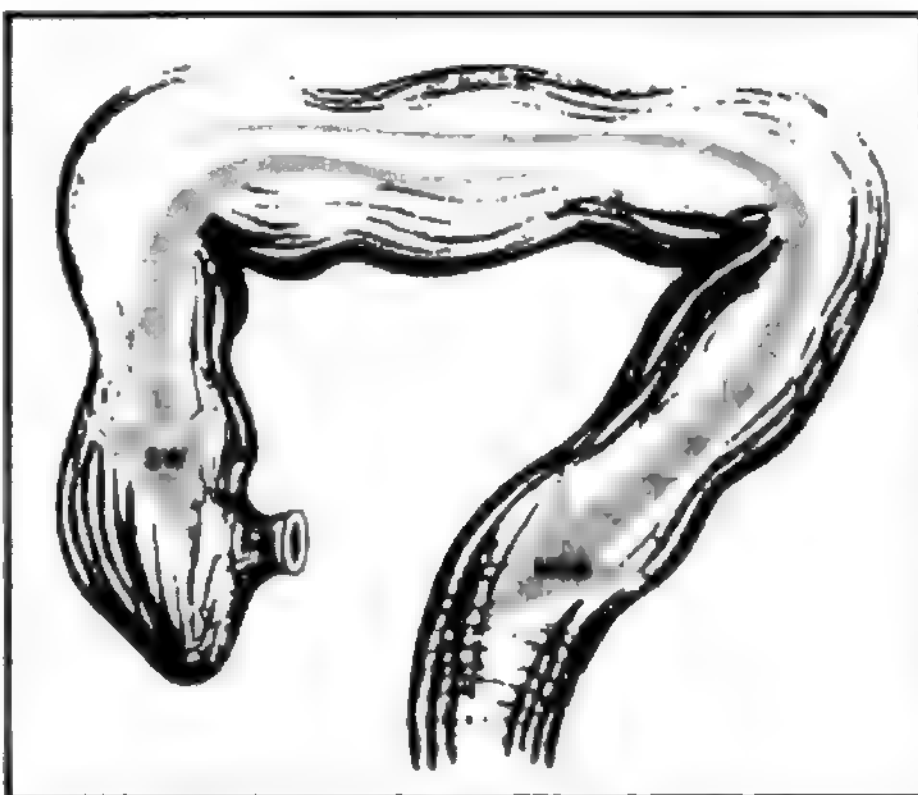


Fig. 3. Relazione tra direzione del flusso del contenuto fecale ed attività elettrica del colon. Le onde elettriche lente (SW: *Slow Waves*) originano dalla muscolatura circolare del colon ascendente e trasverso e si propagano in senso orale verso il cieco; i potenziali a punta migranti (MSB: *Migrating Spike Bursts*) originano dalla muscolatura longitudinale, in posizioni variabili nel colon trasverso, e si propagano prevalentemente in senso aborale verso il retto. (Da Christensen J. et al., 1974).

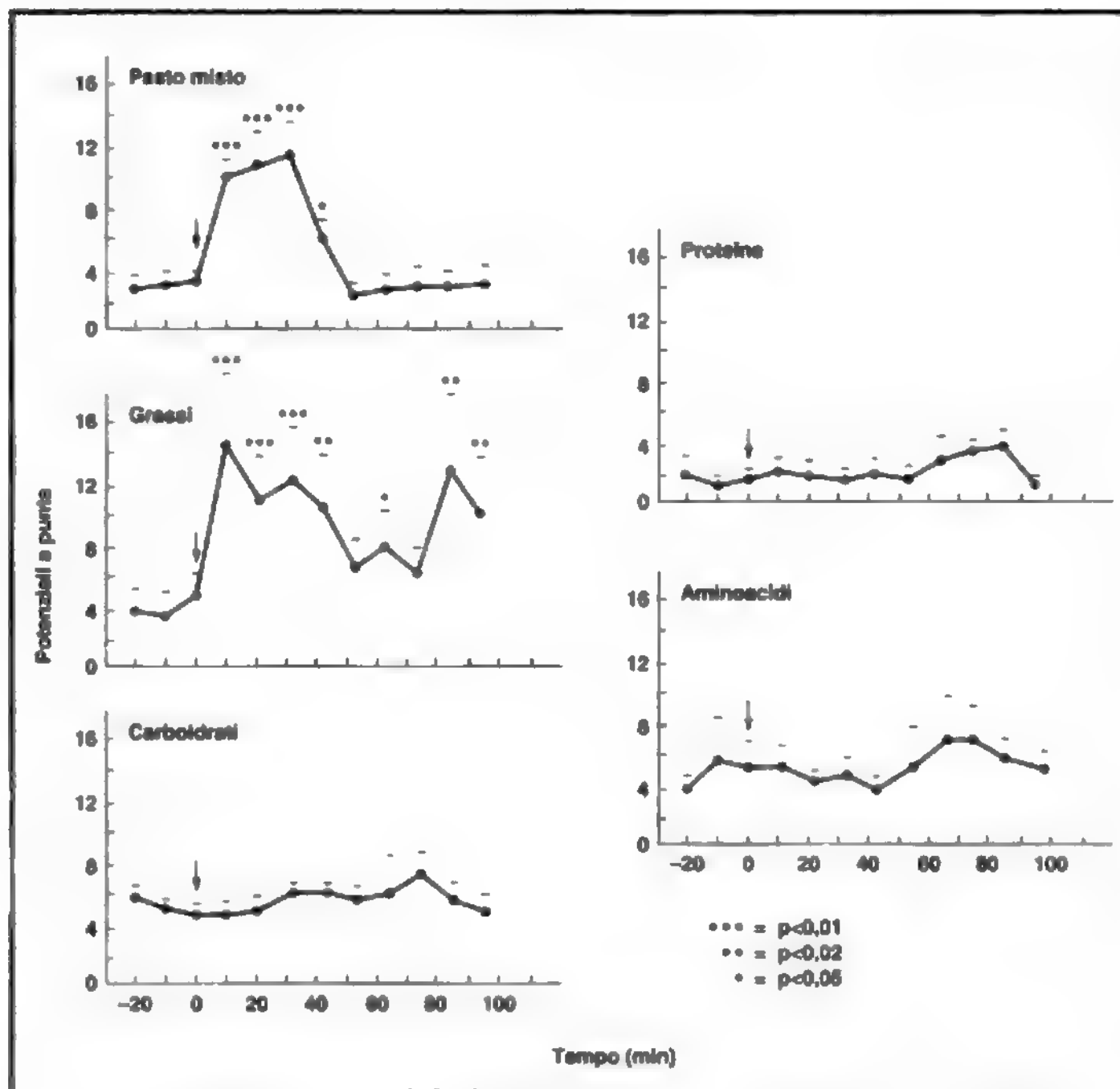


Fig. 4. Effetto dei pasti sulla motilità del colon. Numero di potenziali a punta (per periodi di 10 min) prima e dopo ingestione di un pasto misto di 1000 kcal o costituito da singoli componenti dietetici: grassi (600 kcal), carboidrati (320 kcal), proteine (200 kcal) o aminoacidi (200 kcal). La freccia indica l'ingestione del pasto. Valori medi con deviazione standard di 7 soggetti normali. (Da Snape W. et al., 1980).

plasmatico della CCK si verifica circa 45 min dopo il pasto, si ritiene che questo ormone possa svolgere un ruolo importante nella regolazione della motilità postprandiale del colon, mentre viceversa il ruolo fisiologico della gastrina sull'attività motoria del colon non è ancora conosciuto.

La *neurotensina* è presente nella mucosa e nel plesso mienterico del colon. L'ingestione di grassi fa aumentare la concentrazione plasmatica di neurotensina e induce un aumento della motilità del colon specie nel tratto prossimale.

La *sostanza P* stimola la contrazione dello strato muscolare circolare, probabilmente riducendo la conduttanza per il K^+ e provocando quindi la depolarizzazione della membrana delle cellule muscolari. Neuroni contenenti la sostanza P emergono dal plesso mienterico e mandano assoni negli strati muscolari longitudinale e circolare.

Le *encefaline* si ritrovano nella parete del colon ed intervengono come neurotrasmettitori nel controllo della motilità. Anche se è noto che la morfina stimola la motilità del colon, il ruolo fisiologico svolto dagli oppioidi endogeni non è ancora del tutto chiarito. La *met-enkefalina* ha un'azione inibitrice sulla motilità del colon con un meccanismo periferico, mentre la *leu-enkefalina* svolge un'azione stimolante con un meccanismo mediato dal S.N.C. Il *morfino* *6-acetilomorfone*, che è un metabolita della morfina con potente effetto analgesico, ha un'azione inibitrice con un meccanismo mediato dal S.N.C.

La *serotonina* ed il *glucagone* inibiscono la motilità del colon.

Il *progesterone* svolge un'azione inibente probabilmente alterando l'influsso di Ca^{2+} nelle cellule muscolari. Questo effetto può spiegare le alterazioni dell'alvo che si verificano nelle donne durante la gravidanza.

Il *VIP* ha un'azione inibente sulla motilità. I neuroni contenenti VIP prendono origine nel plesso sottomucoso e da qui si irradiano nel plesso mienterico. Questa peculiarità anatomica fa sospettare che l'azione inibitoria del VIP sia implicata nei meccanismi di autoregolazione riflessa della motilità del colon.

PROCESSI DI ASSORBIMENTO E DI SECREZIONI

Trasporto idrosalino

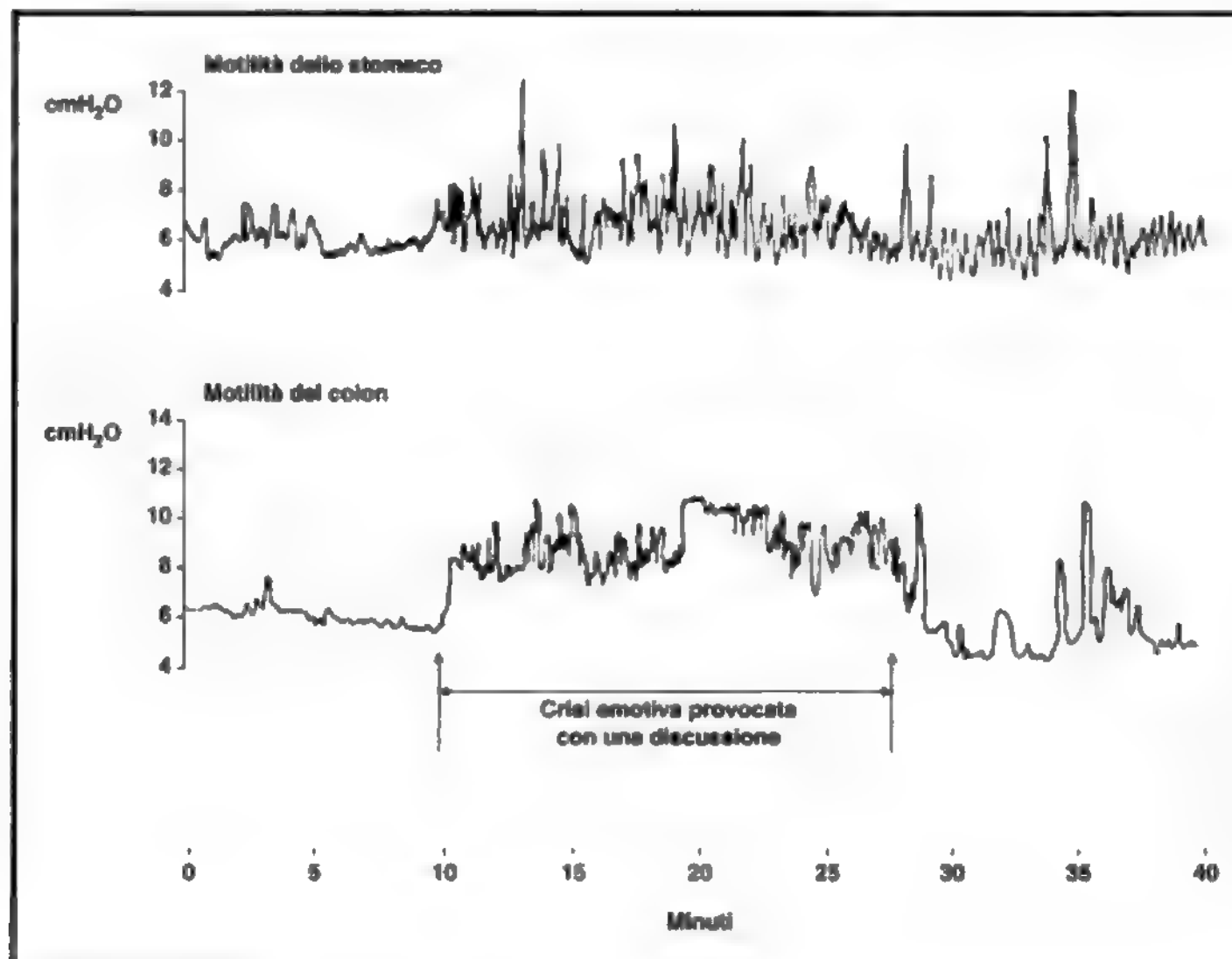
Aspetti quantitativi

L'assorbimento intestinale idrosalino è regolato da sistemi di trasporto, che nelle cellule epiteliali del digiuno, dell'ileo e del colon differiscono per alcune specifiche peculiarità che caratterizzano le modalità di assorbimento.

Il carico di liquidi nell'intestino tenue, stimato intorno ai 14 l/die, è dato (tab. I) dalle secrezioni salivari, gastriche, biliari e pancreatiche sommate ai liquidi introdotti con la dieta ed alle secrezioni intestinali. Il 75-80% di questo carico idrico viene assorbito nel tenue (12-13 l/die) e la rimanente quota entra nel crasso.

Oltre all'acqua l'intestino tenue assorbe grandi quantità di sodio, di cloro e di potassio e secerne bicarbonato. Il tenue assorbe un liquido approssimativamente isotonicamente e, a differenza del colon, ha scarsa capacità di assorbire il sodio contro un gradiente di concentrazione. Nell'intestino

Fig. 5. Registrazione manometrica delle alterazioni della motilità del colon durante una crisi emotiva provocata. Il tracciato della motilità gastrica funge da controllo per le modificazioni della pressione endoaddominale indotte dalla respirazione. (Da Almy T. P. et al., 1949).



tenue l'assorbimento di acqua è stimolato dalla presenza di glicoso. Rispetto al tenue, il colon assorbe minore quantità di acqua ma contro gradienti osmotici notevolmente più elevati ed in modo indipendente dal glicoso. Nel colon arrivano quotidianamente 1500-2000 ml di liquidi; di questi ne vengono assorbiti circa il 90%, il rimanente 10% (150-200 ml) è espulso con le feci. Il colon può assorbire il sodio fino a quando la sua concentrazione endoluminale non scende al disotto di 30 mEq/l. La capacità massima di assorbimento di liquidi del colon è di circa 5 l/die. Se il carico idrico supera questo valore insorge diarrea. Il colon, inoltre, secerne potassio e bicarbonato; l'assorbimento del sodio e la secrezione di potassio sembrano essere influenzati dall'aldosterone. Il carico idrico inibisce, inoltre, in via riflessa la secrezione di ADH tramite la stimolazione di osmocettori splancnici atropino-sensibili con afferenze vagali.

TAB. I. CARICO E ASSORBIMENTO DI ACQUA E DI SODIO NELL'INTESTINO

	H ₂ O ml/die	Na ⁺ mmol/die
Apporto orale	2.000	50-100
Secrezione salivare	1.000	50
Secrezione gastrica	2.000	100
Secrezione pancreaticata	2.000	200
Bile	1.000	150
Secrezione intestino tenue	6.200	840
Totale	14.200	1.440
Quota assorbita nel tenue	12.700	1.240
Transito ileocecale	1.500	200
Quota espulsa con le feci	100-150	5

Meccanismi di trasporto

L'assorbimento netto (o la secrezione) di un elettrolita è la risultante della somma algebrica di processi di trasporto in direzioni opposte sia attivi che passivi.

Si ritiene che i processi attivi di assorbimento si verifichino nei villi ed i processi attivi di secrezione nelle cripte. L'assorbimento e la secrezione di elettroliti attraverso la mucosa intestinale avvengono con tre principali meccanismi: 1) diffusione passiva, 2) drenaggio del solvente e 3) trasporto attivo (v. anche: ASSORBIMENTO, II, 1461; *910; MEMBRANE BIOLOGICHE, IX, 770; *4965; TRASPORTO IN BIOLOGIA, XV, 339).

Diffusione passiva. - I movimenti elettrolitici secondari a diffusione passiva di acqua costituiscono una grossa componente dell'assorbimento elettrolitico totale e dipendono dalla permeabilità dell'epitelio, dai gradienti osmotici ed elettrostatici transmembranari e dalla relativamente bassa resistenza dell'epitelio intestinale. L'epitelio permeabile è caratterizzato da: bassa resistenza elettrica, bassa differenza di potenziale transmembranario, alta permeabilità all'acqua ed incapacità di assorbire Na⁺ contro elevati gradienti di concentrazione. Le differenze nella capacità di assorbimento passivo della mucosa del digiuno, dell'ileo e del colon, dipendono proprio dal variare di questi parametri (tab. II). I movimenti passivi si verificano per via paracellulare, attraverso le giunzioni serrate, e per via intracellulare. Questi movimenti sono sempre guidati da forze generate dai gradienti elettrochimici.

Drenaggio del solvente. - Con questo termine si definisce il movimento convettivo dei soluti, attraverso le membrane apicale e laterobasale dell'enterocita, che segue il flusso d'acqua. Nel digiuno, per la relativamente (rispetto al colon) alta permeabilità e bassa resistenza dell'epitelio, gran parte dei movimenti di sodio sono secondari al flusso d'acqua.

Del tutto recentemente sono state identificate e caratterizzate alcune proteine di membrana specializzate nel trasporto transmembranario dell'acqua, denominate *aquaporine*. In particolare, nella mucosa gastrointestinale, è stata documentata la presenza di una proteina di 279 amminoacidi, denominata *aquaporina-3*, che è in

INTESTINO TENUE E CRASSO

TAB. II. CARATTERISTICHE CHE RIFLETTONO IL VARIARE DELLA PERMEABILITÀ EPITELIALE NEL DIGIUNO, NELL'ILEO E NEL COLON

	Digiuno	Ileo	Colon
Potenziale di membrana	- 3 mV	- 6 mV	- 20 mV
Resistenza della mucosa	bassa	media	alta
Raggio medio dei pori	700 nm	300 nm	230 nm
Movimento passivo di NaCl	alto	basso	minimo
Concentrazione di equilibrio per l'assorbimento netto di Na ⁺	130 mEq/l	75 mEq/l	30 mEq/l

grado di facilitare assieme all'acqua il trasporto di urea e glicerolo (v. AQUAPORINE**).

Trasporto attivo. - I sistemi di trasporto attivo sono quelli che si verificano contro gradienti elettrici ed osmotici con dispendio di energia, come ad es. il pompaggio del Na⁺ dall'interno della cellula nel liquido interstiziale ad opera dell'Na⁺-K⁺-ATPasi di membrana. Molti soluti, come glicoso e aminoacidi, vengono assorbiti contro un gradiente di concentrazione tramite proteine di membrana che utilizzano come energia il gradiente elettrochimico transmembranario del sodio (cotrasporto) generato dalle Na⁺-K⁺-ATPasi (tab. III).

Digiuno

La principale caratteristica del trasporto idrosalino nel digiuno è l'elevata permeabilità passiva dell'epitelio. Come risultato di ciò, in questo tratto d'intestino, i processi passivi sono quelli che contribuiscono in modo determinante all'assorbimento del sodio e del cloro. Nonostante nel digiuno siano presenti entrambi i meccanismi attivi, Na⁺-K⁺-ATPasi e cotrasporto Na⁺-glicoso, l'85% del sodio viene assorbito per drenaggio del solvente secondario all'assorbimento dei monosaccaridi. Un altro importante meccanismo di assorbimento del sodio è dovuto al controtrasporto Na⁺-H⁺. Il cloro è assorbito principalmente in modo passivo lungo un gradiente elettrochimico; in condizioni basali può verificarsi una secrezione attiva.

Ileo

Il meccanismo predominante di assorbimento del sodio e del cloro nell'ileo è il trasporto elettroneutro dovuto all'accoppiamento dei due sistemi di controtrasporto Na⁺-H⁺ e Cl⁻-HCO₃⁻. Solo una piccola parte del sodio è assorbita per drenaggio del solvente probabilmente a causa della più elevata resistenza della mucosa dell'ileo rispetto a quella del digiuno (v. sopra, tab. II).

Colon

Il trasporto idrosalino del colon differisce da quello del tenue:

- 1) per la relativamente elevata resistenza che è espressa

TAB. III. MECCANISMI DI TRASPORTO SPECIFICI DEL SODIO

- 1) Assorbimento elettrogenico (Na⁺-K⁺-ATPasi)
- 2) Assorbimento non-elettrolito-stimolato (Na⁺-glicoso-aminoacidi cotrasporto)
- 3) Assorbimento idrogenico (Na⁺-H⁺ controtrasporto)
- 4) Assorbimento elettroneutro (Na⁺-Cl⁻ cotrasporto, [Na⁺1K⁺2Cl⁻ cotrasporto, accoppiamento di due meccanismi di controtrasporto Na⁺-H⁺ e Cl⁻-HCO₃⁻)
- 5) Drenaggio del solvente

da un'elevata differenza di potenziale a da una bassa permeabilità (v. sopra, tab. II);

- 2) perché il glicoso e gli aminoacidi non stimolano l'assorbimento del sodio e dell'acqua;

- 3) perché non sono presenti processi di assorbimento attivo di nutrienti;

- 4) perché il trasporto di elettroliti è influenzato in modo significativo dagli ormoni mineralcorticoidi.

La porzione prossimale del colon ha, rispetto a quella distale, una maggiore capacità assorbente ed una minore capacità di pompare Na⁺ contro gradienti elevati.

Assorbimento del calcio

L'assorbimento del calcio è influenzato da fattori che agiscono nel lume intestinale e da fattori cellulari che sono a loro volta modulati da complesse interazioni ormonali.

Fattori che agiscono nel lume intestinale

Essendo i sali di calcio poco solubili in acqua, ne consegue che la loro forma e stabilità nei vari tipi di alimenti influenzeranno direttamente l'assorbimento.

Il calcio è assorbito nella forma ionizzata, cosicché l'ideale per l'assorbimento sarebbe di averlo associato con anioni che formino sali che non precipitano. I sali dei cationi bivalenti, specie se gli anioni sono fosfati, tendono a precipitare nelle soluzioni alcaline; l'assorbimento del Ca²⁺ avverrà di conseguenza principalmente nel duodeno e nel digiuno prossimale dove il pH è ancora lievemente acido. Siccome sia il pH endoluminale che la concentrazione dei fosfati tendono progressivamente a crescere lungo l'intestino tenue, nelle porzioni distali dell'intestino la precipitazione dei sali aumenterà e l'assorbimento diverrà più difficile. Nelle porzioni prossimali del tenue troveremo, quindi, una concentrazione più elevata di sali di calcio solubili rispetto alle porzioni distali.

Numerose sostanze, quali acidi grassi a lunga catena (steatorrea), colestiramine, acido ossalico e fosfati organici, se presenti nel lume intestinale fanno diminuire l'assorbimento del calcio a causa della formazione di complessi insolubili. Anche il magnesio fa ridurre l'assorbimento ma il meccanismo non è noto. Altre sostanze, quali sali biliari, alcuni aminoacidi (lisina e arginina), alcuni antibiotici (penicillina e cloramfenicolo) e mono- o disaccaridi (specialmente il lattosio) fanno viceversa aumentare l'assorbimento del calcio probabilmente formando complessi più solubili (tab. IV).

Fattori cellulari

La captazione del calcio attraverso l'orletto a spazzola dei villi intestinali è vit. D dipendente. In alcune specie animali gli enterociti duodenali sono maggiormente sensibili rispetto a quelli dell'ileo allo stimolo della vit. D per il trasporto del calcio, però non si sa con sicurezza se questa distinzione sia valida anche per la specie umana.

L'effetto più studiato della vit. D è proprio la stimolazione del trasporto intestinale del calcio. Nonostante la vit. D stimoli la produzione intestinale delle macromolecole coinvolte nel trasporto del calcio (proteine leganti il calcio, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPasi ed il complesso legante il calcio dell'orletto a spazzola), sembra che l'effetto principale favorente l'assorbimento sia quello di far aumentare la permeabilità della membrana dell'orletto a spazzola agli ioni calcio.

Nella membrana laterobasale è stato individuato un meccanismo vit. D dipendente, per l'estrusione del calcio dalla cellula, che utilizza una Ca²⁺-ATPasi e/o un controtrasporto Na⁺-Ca²⁺. Il trasferimento del calcio nel citosol è veicolato da una proteina legante il calcio o può verificarsi in micro-

TAB. IV. EFFETTO DI ALCUNE SOSTANZE INGERITE CON I PASTI SULL'ASSORBIMENTO DEL CALCIO

Riduzione	Nessun effetto	Aumento
Fitati	Fosfati	Lattoso
Cellulosa	Proteine	Lisina
Acidi grassi a catena lunga	Ac. ascorbico	Arginina
Alginati	Ac. citrico	Trigliceridi a catena media
Ossalati		Penicillina
Alcol		Cloramfenicolo
Antiacidi		
Magnesio inorganico		
Colestiramine		
Cortisolo		
Tetracicline		

vescicole. Sia le proteine leganti il calcio che la secrezione del calcio da parte degli organuli cellulari (mitocondri, reticolo endoplasmatico) svolgono il compito di mantenere la concentrazione del calcio nel citosol a livelli non tossici.

Il sistema di trasporto del calcio si adatta alle modificazioni dell'apporto dietetico. Una dieta povera di calcio determina aumento dell'assorbimento intestinale, associato a maggior rilascio di calcio dal tessuto osseo ed a riduzione dell'escrezione urinaria. Queste modificazioni sono dovute ai complessi meccanismi ormonali che regolano l'omeostasi del calcio. I soggetti anziani assorbono il calcio meno bene dei giovani e si adattano meno bene ad una dieta povera di calcio, probabilmente a causa di sclerosi renale (minore formazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è il più potente stimolante dell'assorbimento del calcio. Nelle carenze della vit. D il trasporto attivo del calcio è assente. Il $25(\text{OH})\text{D}_3$ ha un'azione stimolante sull'assorbimento del calcio, ma il suo effetto è circa l'1% di quello dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. L'ormone della crescita ed il paratormone stimolano anche loro l'assorbimento del calcio mentre i glicocorticoidi, gli estrogeni, l'ormone tiroideo e i tiazidici l'inibiscono. Nell'uremia e nell'acidosi l'assorbimento del calcio è diminuito, viceversa nell'alcalosi.

V. anche: CALCIO [v.; v.*; v.**]; VITAMINE [v.; v.*].

Assorbimento del ferro

Il ferro è contenuto in molti alimenti vegetali, come pure nelle carni rosse e nei tuorli d'uovo. I sali inorganici ed il ferro contenuto nei vegetali sono assorbiti con difficoltà in assenza dell'effetto riducente dell'HCl o dell'ac. ascorbico; il ferro legato all'eme è invece assorbito più facilmente di quello di origine vegetale. L'omeostasi della sideremia è mantenuta esclusivamente dai sistemi che regolano l'assorbimento dei sali ferrosi, dato che non esistono meccanismi che regolano l'escrezione dell'eccesso di ferro.

Il ferro può essere assorbito come eme o come ferro non emico; il ferro emico viene assorbito meglio (20% circa) del ferro non emico (5% circa). Mediamente, con una dieta bilanciata vengono forniti quotidianamente 15-20 mg di ferro non emico e 1,5-3 mg di ferro emico, ma la quota assorbita in condizioni normali è di solo 1-1,5 mg. Durante la crescita, durante la gravidanza e nelle deplezioni secondarie a emorragie, l'assorbimento del ferro aumenta considerevolmente.

L'assorbimento del ferro può dipendere: 1) da fattori che agiscono nel lume intestinale, quali, ad es., il pH del chimo e la composizione della dieta, e 2) da fattori cellulari.

Fattori che agiscono nel lume intestinale

L'ac. cloridrico favorisce indirettamente l'assorbimento del ferro non emico, prevenendo la formazione di complessi insolubili e scarsamente assorbibili, quali fosfati e fitati. Tutte le sostanze dietetiche che riducono lo ione Fe^{3+} a ione Fe^{2+} , quali ad es. l'ac. ascorbico e gli aminoacidi liberati dalla digestione proteica, rendono il ferro non emico più solubile; in particolare, fra gli aminoacidi, la lisina e l'istidina stabilizzano il ferro in uno stato solubile formando con esso dei complessi a basso peso molecolare facilmente assorbibili.

Oltre ai fosfati ed ai fitati sopra menzionati, anche le fosfoproteine, gli ossalati ed i tannati formano col ferro dei complessi insolubili scarsamente assorbibili. Il calcio e le fibre presenti nella dieta quali pectina, emicellulosa e lignina sembrano avere anche loro un effetto inibente sull'assorbimento del ferro. La *lattoferrina*, che è la più abbondante delle proteine leganti il ferro presente nelle secrezioni esocrine (latte, succo pancreatico e bile), sembra svolgere una duplice azione a volte inibente, a volte stimolante l'assorbimento di ferro, pur non venendo essa stessa assorbita dalle cellule duodenali. Il ruolo fisiologico svolto dalla lattoferrina nell'assorbimento del ferro è ancora incerto. L'assorbimento del ferro non emico è inibito dalla presenza negli alimenti di ioni calcio.

Fattori cellulari

L'assorbimento cellulare avviene in tre fasi successive: ingresso del ferro nell'enterocita, trasporto intracellulare e rilascio del ferro nel sangue, ognuna delle quali sembra avere un meccanismo di regolazione autonomo.

La fase iniziale di captazione del ferro da parte della mucosa è un processo metabolico attivo mediato da trasportatori saturabili.

Il ferro emico e quello non emico sono assorbiti dalla mucosa duodenale con differenti modalità di trasporto. L'eme viene assorbito dagli enterociti probabilmente con un meccanismo di trasporto facilitato. All'interno della cellula il ferro viene staccato dall'eme con un processo ossidativo che utilizza una xantina ossidasi, e quindi escreto dalla membrana laterobasale ed immesso in circolo e/o accumulato nei depositi di ferritina. Il trasporto del ferro nel citosol sembra essere veicolato dalla transferrina.

L'assorbimento del ferro non emico da parte degli enterociti duodenali avviene principalmente con due meccanismi: 1) quello in cui è coinvolta la formazione di complessi del ferro con una proteina specifica secreta dall'intestino (*Fe-transferrina*); 2) quello in cui è coinvolta la formazione di complessi del ferro con sostanze a basso peso molecolare quali citrato, ascorbato o aminoacidi (*Fe-micromolecole*).

1) L'apotransferrina, secreta dagli enterociti, si lega nel lume intestinale con gli ioni ferrosi formando il complesso Fe-transferrina. Questo complesso si lega ad un recettore specifico di membrana presente sull'orletto a spazzola e penetra nella cellula probabilmente per un processo di endocitosi. All'interno della cellula si verifica la lisi del complesso Fe-transferrina-recettore: il recettore viene riciclato nella membrana; la transferrina viene risecreta nel lume intestinale e riutilizzata per legare altri ioni ferrosi; il ferro viene, a seconda delle esigenze dell'organismo, o sequestrato nei depositi di ferritina oppure secreto attraverso la membrana laterobasale, con meccanismi ancora poco noti, ed immesso in circolo, legato ad una transferrina diversa da quella enterica.

2) L'ac. citrico, l'ac. ascorbico e gli aminoacidi formano col ferro dei complessi solubili a basso peso molecolare facilmente assorbibili. Il processo di assorbimento di questi complessi è mediato da un trasportatore che è in comune con altri metalli quali cobalto, nichel, manganese, zinco, cadmio e piombo. Nella cellula i complessi Fe-micromolecole sono veicolati sul versante laterobasale della membrana ed immessi nel circolo portale con meccanismi di trasporto non ancora conosciuti. Nella cellula il ferro può anche essere staccato dalle micromolecole e sequestrato nei depositi di ferritina. I meccanismi che regolano il rilascio del ferro nel circolo portale non sono ancora ben conosciuti. Il complesso Fe-ferritina rimarrà accumulato nel citoplasma fino a quando con la desquamazione cellulare, non sarà liberato nel lume intestinale ed espulso con le feci. Il ruolo principale della ferritina citoplasmatica è quello di limitare l'immissione in circolo di eccessive quantità di ferro assorbito dalle cellule nel caso di un elevato apporto dietetico.

Regolazione dell'assorbimento

L'assorbimento del ferro viene regolato in funzione delle necessità dell'organismo. La regolazione del bilancio avviene esclusivamente durante la fase di assorbimento: a) con meccanismi che fanno aumentare o diminuire, a seconda delle necessità, la quota assorbita e b) con meccanismi di sequestro in depositi intracellulari, non riutilizzabili, dell'eccesso di ferro assorbito dal lume intestinale.

a) I fattori che regolano la capacità assorbente della mucosa intestinale nei riguardi del ferro sono poco conosciuti. Come abbiamo precedentemente esposto, i meccanismi di assorbimento sono molteplici e richiedono la presenza di differenti tipi di recettori e la sintesi e secrezione di vettori specifici che fanno la spola tra cellula e lume intestinale. È stato osservato che il numero dei recettori e dei vettori del ferro aumenta notevolmente nelle deplezioni da emorragia. Questo aumento si attua con una latenza di 3-4 giorni che corrisponde al tempo impiegato dalle cellule delle cripte di Lieberkühn per maturare e migrare nei villi. Ciò ha fatto supporre che la programmazione della capacità assorbente degli enterociti nei riguardi del ferro, in funzione del fabbisogno dell'organismo, avvenga negli enterociti durante la fase di maturazione.

b) Un importante meccanismo atto a prevenire un eccesso di assorbimento ematico di ferro è l'accumulo nei depositi di ferritina. Quando la quantità di ferro assorbito dalla cellula supera il fabbisogno, questi depositi vengono incrementati con un duplice meccanismo: 1) aumento dei processi metabolici che fanno legare il ferro all'apoferritina; 2) incremento della sintesi dell'apoferritina. Con l'aumento del numero di molecole di apoferritina, più ferro potrà essere sequestrato nella cellula nella forma non più utilizzabile destinato, dopo la morte della cellula, a cadere con la desquamazione nel lume intestinale e ad essere espulso con le feci. La concentrazione di apoferritina nella mucosa duodenale è proporzionale ai livelli ematici di ferritina e sembra essere influenzata dai livelli alti della sideremia.

V. anche: FERRO [v.; v.*; v.**].

Assorbimento di vitamine

Vitamina A (Retinolo)

La vit. A è presente negli alimenti di origine animale nella forma di esteri e nel retinolo ed in quelli di origine vegetale nella forma di β -carotene.

Gli esteri di retinolo per essere assorbiti devono prima essere emulsificati dai sali biliari ed emulsionati dalle esterasi pancreatiche e intestinali. Nei microvilli degli enterociti è

presente una proteina specifica, la CRBP II (*Cellular Retinal Binding Protein type II*), che trasporta tutto il retinolo all'interno della cellula dove viene di nuovo esterificato ed incorporato nei chilomicroni.

Il β -carotene attraversa la membrana dell'enterocita per diffusione senza l'ausilio di un trasportatore. Una volta penetrato nella cellula viene per il 90% idrolizzato in due molecole di retinale e quindi trasformato in retinolo. Dopo un processo di esterificazione, il retinolo viene incorporato nei chilomicroni ed immesso nel circolo linfatico. La rimanente quota del 10% di β -carotene entra nel circolo linfatico intatta, trasportata dai chilomicroni.

Una volta raggiunto il grande circolo, gli esteri del retinolo sono accumulati nel fegato sotto forma di retinolo. Circa il 10% del retinolo dei depositi epatici viene convertito in ac. retinoico, coniugato con l'ac. glicuronico e secreto con la bile nel duodeno. Nell'intestino questi complessi sono riassorbiti per via portale, captati dagli epatociti e riscreti nelle vie biliari (*circolo entero-epatico della vit. A*). La concentrazione biliare dei metaboliti del retinolo è proporzionale all'entità dei depositi epatici; nelle carenze di vit. A la maggior parte del retinolo assorbito è trasportato ai tessuti mentre solo una piccola parte finisce nei depositi epatici.

Il 90% del retinolo epatico, dopo essere stato riesterificato, viene immesso in circolo legato con una proteina specifica denominata RBP (*Retinol Binding Protein*), la quale si lega con un'altra proteina plasmatica: la *transretina* (TTR). Il complesso retinolo-RBP-TTR viene distribuito dal sangue nei vari tessuti dove sono presenti altre proteine che legano il retinolo e lo trasportano ai siti intracellulari specifici. Alcuni tessuti, come la retina ed il testicolo, hanno delle proprie specifiche proteine leganti il retinolo. Il complesso retinolo-RBP-TTR previene, inoltre, la perdita di vit. A attraverso il rene per filtrazione glomerulare. Una volta liberato il retinolo, l'apo-RBP viene catabolizzata dal rene. Nelle epatopatie i livelli di RBP e TTR sono più bassi, mentre nelle nefropatie sono aumentati; in queste patologie i tassi ematici di vit. A non sono correlati con quelli dei tessuti corporei.

Acido folico (Acido pteroilglutammico, PteGlu₁)

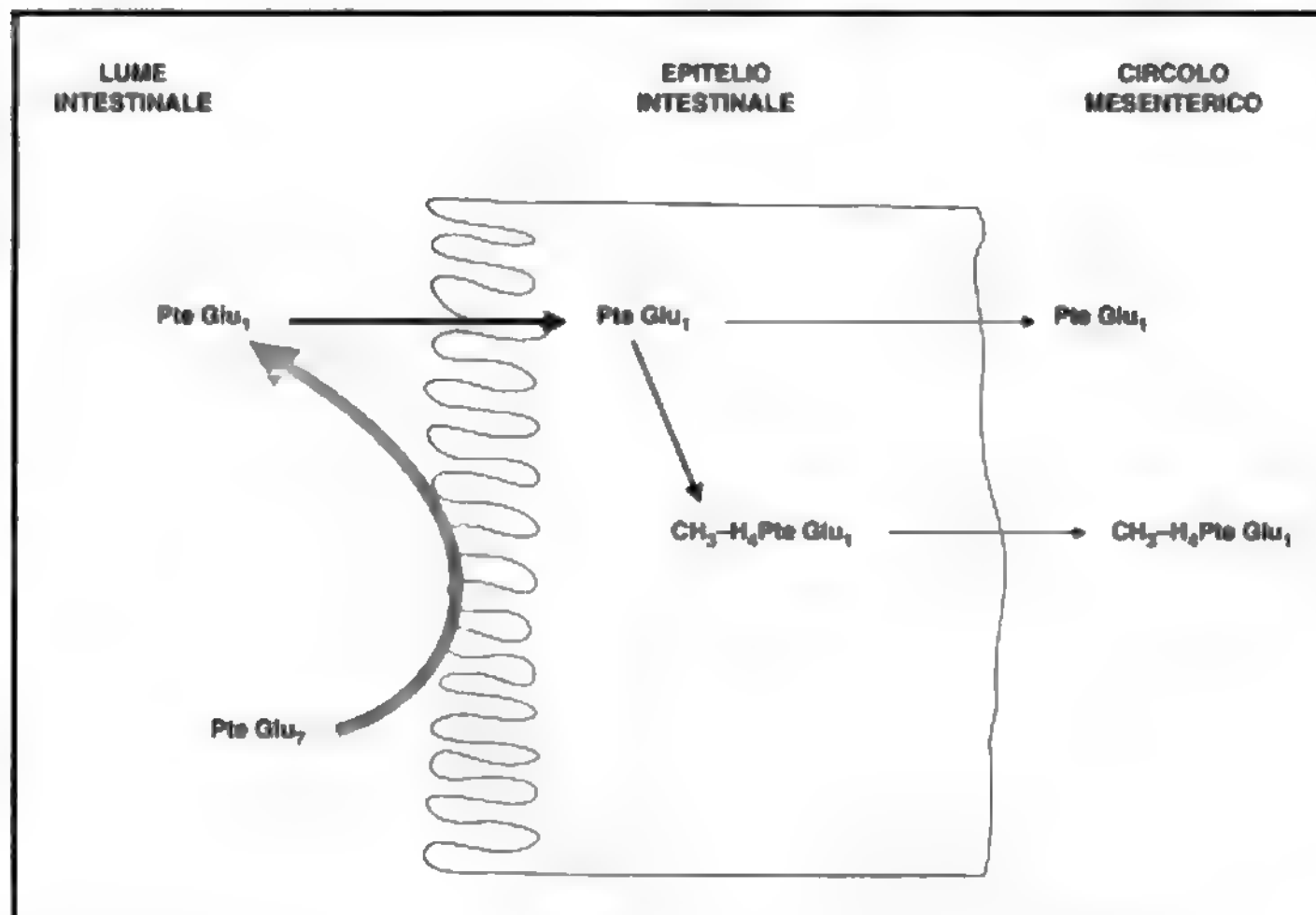
L'ac. folico si ritrova negli alimenti sotto forma di poliglutammati (PteGlu_n). Una volta ingeriti, i PteGlu_n vengono progressivamente idrolizzati nell'intestino tenue da una coniugasi presente nell'orletto a spazzola degli enterociti, fino a quando residua un monoglutammato (PteGlu₁) (fig. 6).

La modalità di assorbimento del PteGlu₁ dipende dalla sua concentrazione intestinale: 1) nel caso di concentrazione bassa, si avrà assorbimento attivo mediato da un trasportatore saturabile; 2) nel caso di concentrazione elevata, si avrà un trasporto passivo.

L'assorbimento dei folati è favorito dal pH acido, perciò sarà maggiore nel duodeno e nel digiuno prossimale dove il pH è ancora lievemente acido. L'assorbimento sarà ridotto nei casi di anacloridria, a causa del pH duodenale alcalino.

Nelle cellule mucose, l'ac. folico viene in massima parte metilato e ridotto nella forma tetraidrogenata CH₃H₄PteGlu₁, legato alla proteina trasportatrice FABP (*Folic Acid Binding Protein*) e quindi immesso nel circolo portale. Il 10-20% dei glutammati assorbiti sono captati dal fegato durante un singolo passaggio e secreti con la bile, principalmente nella forma di CH₃H₄PteGlu₁. Nell'intestino i glutammati vengono riassorbiti per via ematica, captati dagli epatociti e riscreti nelle vie biliari (*circolo enteroepatico del CH₃H₄PteGlu₁*). La quota che sfugge alla captazione epatica è utilizzata dai tessuti periferici.

Fig. 6. Rappresentazione schematica della digestione e dell'assorbimento degli pteroilpoliglutammati (PteGlu_n) della dieta. L'idrolisi degli PteGlu_n a monoglutammati (PteGlu₁) probabilmente si verifica al di fuori delle cellule intestinali. L'entità di assorbimento nel circolo mesenterico è regolata dalla velocità del trasporto intracellulare del PteGlu₁ prodotto nel lume intestinale. Nelle cellule intestinali una parte del PteGlu₁ viene ridotto e quindi metilato ($\text{CH}_3\text{-H}_2\text{PteGlu}_1$) prima di essere immesso nel circolo mesenterico. (Da Rosenberg I. H., 1975).



Funzioni secretorie e di assorbimento connesse con l'immunità intestinale

Nelle secrezioni intestinali si ritrovano in massima parte immunoglobuline IgA (IgA secretorie) (v. IMMUNOGLOBULINE [v.; v.*]). La quantità di IgA secreta dall'intestino oscilla intorno a 3 g/die. Le IgA secretorie, a differenza di quelle plasmatiche, sono costituite da due molecole di IgA unite tra di loro da un ponte peptidico denominato «catena J» e da un complesso glicoproteico di origine intestinale chiamato «componente secretorio o recettore polimmunoglobulinico». Questo recettore polimmunoglobulinico, che è una glicoproteina localizzata nelle membrane laterobasali degli enterociti, si lega con le immunoglobuline (IgA e IgM) formando un complesso che viene secreto nel lume intestinale. Questo legame con il recettore rende le immunoglobuline meno sensibili all'azione degli enzimi proteolitici pancreatici.

Le diverse classi di immunoglobuline esplicano nell'intestino funzioni differenti. La funzione principale delle IgA secretorie sembra essere quella di impedire l'assorbimento di batteri, di virus e probabilmente anche di macromolecole pervenuti nel lume intestinale con gli alimenti. Le IgG vengono prodotte in grande quantità nelle reazioni autoimmuni e nelle malattie infiammatorie intestinali; le IgE intestinali aumentano nelle reazioni intestinali allergiche ed in presenza di parassiti.

Nella mucosa, in corrispondenza delle placche del Peyer, si ritrovano delle cellule particolari denominate «cellule M» che svolgono la funzione di facilitare il trasporto delle macromolecole dal lume intestinale alle strutture linfatiche delle placche al fine di attivare la risposta immunitaria (fig. 7).

V. anche: INTESTINO TENUE E CRASSO*, coll. *3896-3901.

DIGESTIONE BATTERICA NEL COLON. ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI

Digestione batterica

Le principali funzioni del colon non riguardano soltanto, come comunemente si ritiene, i movimenti idrosalini: vi

sono invece molte altre funzioni digestive e di assorbimento di grande interesse biologico. Alcuni costituenti del contenuto del colon sono residui alimentari non assorbiti o non assorbibili, altri originano dalla desquamazione mucosa, altri ancora derivano dalle secrezioni, dalla diffusione plasmatica e dalla popolazione batterica. Tutti questi costituenti sono soggetti a fermentazione batterica anaerobica. Tra i derivati dalla diffusione plasmatica troviamo nel colon alcuni costituenti, quali la creatinina, l'urea e l'ac. urico che, pur non potendo essere degradati dal nostro organismo, non si rinvergono normalmente nelle feci.

La creatinina nel cieco è convertita dalla flora batterica in sacrosina, metilamina e l-metil-guanidina. Alcuni di questi prodotti di degradazione sono assorbiti per semplice diffusione e degradati successivamente a livello epatico.

L'ac. urico è degradato in allantoina e l'urea in ammoniaca. La quantità di urea degradata in ammoniaca nel colon è notevole (ca. 200 mmol/die); è stato calcolato che circa il 20% della produzione metabolica giornaliera di urea viene degradata in ammoniaca nell'intestino crasso. La diffusione plasmatica non è però la sola fonte dell'ammoniaca intestinale, data la presenza nel colon di altre sostanze azotate di origine alimentare e batterica. Dell'ammoniaca prodotta nel colon solo l'1% viene eliminata con le feci, il 99% viene assorbita per diffusione passiva nella forma non ionizzata che è predominante nel colon a causa del pH alcalino.

Proteine originate dalla trasudazione plasmatica, dalla flora batterica morta, dalla desquamazione cellulare e dalle secrezioni digestive sono degradate dalla flora batterica colica in acidi grassi volatili (VFA, Volatile Fatty Acid) ed ammoniaca. Dalla fermentazione delle proteine si formano, oltre che acetato, propionato e butirrato, che sono i VFA più importanti da un punto di vista quantitativo, anche isobutirrato, isovalerato e 2-metilbutirrato che derivano in particolare dalla fermentazione degli aminoacidi racemici valina, leucina e isoleucina.

I carboidrati sono trasformati dalla fermentazione batterica in VFA. I principali substrati per la fermentazione batterica sono: a) carboidrati indigeribili di origine vegetale,

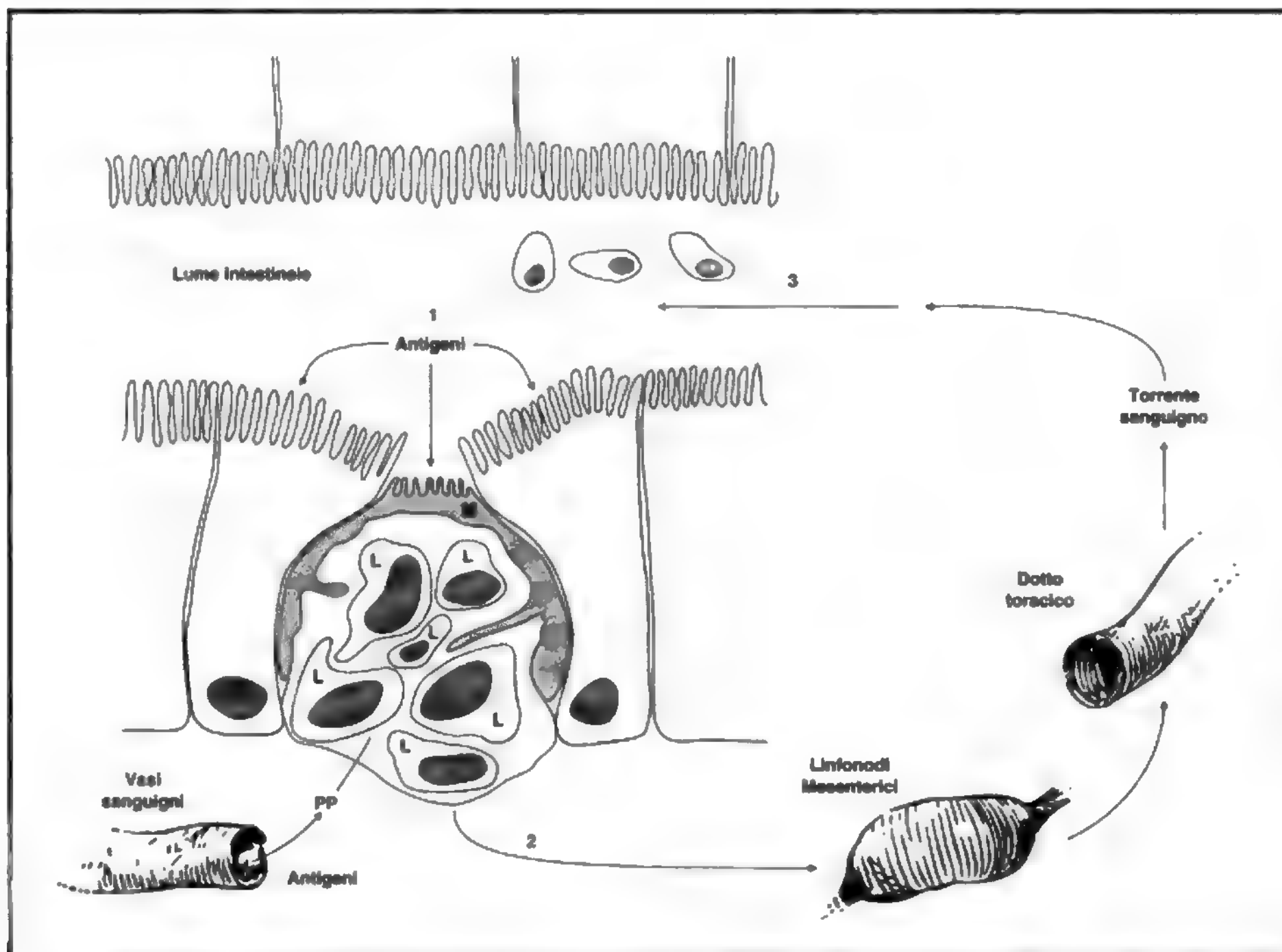


Fig. 7. Rappresentazione schematica del ciclo delle plasmacellule che popolano la mucosa intestinale. Linfociti (L) del tessuto linfoide associato all'intestino, principalmente le placche del Peyer (PP) dell'ileo, sono stimolati dagli antigeni che entrano sia dal lume intestinale (1) attraverso l'epitelio specializzato (cellule M) o l'epitelio normale sia direttamente dall'apparato circolatorio. Linfociti migrano nei linfonodi mesenterici dove subiscono una ulteriore maturazione (2) e quindi entrano nel circolo sistemico come linfociti e plasmacellule per distribuirsi lungo la superficie mucosa intestinale (3) e produrre anticorpi (IgA secretorie) in risposta agli antigeni intestinali assorbiti. (Da Walker W. A., 1986).

quali cellulosa, emicellulosa, pectine, oligosaccaridi; b) carboidrati digeribili, quali principalmente amido e glicoso, eventualmente sfuggiti alla digestione e/o all'assorbimento nell'intestino tenue.

I principali prodotti della fermentazione dei carboidrati sono: acetato, propionato, butirrato e gas quali CO_2 , H_2 e CH_4 . Il rapporto molare tra acetato, propionato e butirrato riscontrato nelle feci umane è 74:18:8; $[56 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 74 \text{ acetato} + 18 \text{ propionato} + 8 \text{ butirrato} + 55 \text{ CO}_2 + 38 \text{ CH}_4 + 17 \text{ H}_2\text{O}]$. Il metano è prodotto soltanto in ca. 1/3 della popolazione umana adulta, i rimanenti 2/3 producono H_2 . La ragione di questa differenza non è conosciuta; si ritiene, tuttavia, che esista una correlazione tra velocità di transito nel colon del *pabulum* e produzione di CH_4 . Un transito accelerato nel colon tende infatti ad inibire l'insediamento della flora batterica metanifera che è a lenta crescita.

Circa il 75% dei carboidrati del colon è trasformato in VFA, il rimanente 25% è utilizzato come *pabulum* dalla flora batterica o eliminato come H_2 o CH_4 .

La concentrazione di VFA è più alta nel cieco e diminuisce distalmente. La composizione della dieta e la velocità di transito nel colon sono importanti fattori che influenzano l'entità della produzione di VFA. La dieta può inoltre mo-

dificare l'attività metabolica dei microrganismi con l'apporto di nuovi o differenti substrati e quindi può influenzare sia la quantità che la natura dei prodotti terminali.

La quantità totale di VFA nell'intestino crasso ha valori oscillanti tra 70 e 120 mmol, ma la concentrazione può variare notevolmente con la dieta. Una dieta ricca di fibre fa aumentare in modo considerevole sia la produzione che l'eliminazione fecale di VFA. Con una dieta bilanciata «nord europea» vengono degradati ogni giorno nel colon 15 g di fibre e 35-50 g di zuccheri e amido, con una produzione giornaliera di 0,5-0,6 mol di VFA (140-180 kcal/die) che corrisponde a circa il 10% dell'apporto energetico quotidiano. Si deve sottolineare, tuttavia, che nel *terzo mondo* l'apporto dietetico di fibre è ca. 7 volte superiore a quello di una dieta consumata nel nord Europa. È quindi probabile che aumenti di pari grado anche l'apporto energetico derivante dalla fermentazione batterica del colon.

Assorbimento degli acidi grassi volatili

Gli VFA sono prontamente assorbiti lungo tutto il colon con un meccanismo simile a quello che si verifica nel *ruminante*. L'assorbimento degli VFA sembra essere prevalentemente passivo ed aumenta in modo lineare con l'aumento

della concentrazione e con la riduzione del pH. La velocità di assorbimento dei singoli VFA non è uguale; essa varia in ordine ascendente nel seguente modo: acetato < propionato < butirrato.

Gli VFA nel colon possono essere assorbiti con due differenti modalità: 1) assorbimento nella forma non ionizzata, che è copulato con la secrezione endoluminale di bicarbonato e che induce quindi aumento del pH; 2) assorbimento nella forma ionizzata, che è copulato con l'assorbimento del sodio.

Quindi, oltre che per il valore energetico, l'assorbimento degli VFA può svolgere un ruolo significativo anche nel mantenimento dell'equilibrio idrosalino del corpo.

Nel colon prossimale si verificano in uguali proporzioni entrambi questi meccanismi, mentre nel colon distale sembra predominare l'assorbimento nella forma ionizzata.

L'assorbimento degli VFA nei loro siti di produzione è rapido ed una grande quantità di alcuni di essi viene metabolizzata dall'epitelio della mucosa durante i processi di assorbimento prima che venga raggiunto il circolo portale.

La maggior parte del butirrato assorbito è convertito nell'epitelio della mucosa del colon in corpi chetonici o in CO_2 e costituisce un'importante fonte energetica per questo tessuto. Questi processi ossidativi sono notevolmente accelerati dall'aldosterone. Si ritiene inoltre che il butirrato stimoli la crescita delle cellule mucose normali ed inibisca quella delle cellule neoplastiche. Studi epidemiologici hanno dimostrato, infatti, una correlazione tra dieta ad elevato contenuto di fibre e riduzione dell'incidenza dei carcinomi del colon. Una piccola quota di butirrato entra nel circolo portale e viene rimossa dal fegato.

Il propionato viene metabolizzato in minor misura dalle cellule della mucosa del colon e la quota immessa nel circolo portale è convertita dal fegato in glicoso. La conversione epatica del propionato in glicoso esercita un effetto inibitore sulla sintesi del colesterolo.

L'acetato viene viceversa in massima parte utilizzato in periferia dai tessuti muscolare ed adiposo.

GAS INTESTINALI

Nei soggetti normali, l'intestino contiene ca. 200 ml di gas, sia durante il digiuno che dopo un pasto; un volume analogo è stato riscontrato nei soggetti con disturbi addominali attribuiti ad un eccesso di gas. L'emissione giornaliera di gas attraverso l'ano varia da 200 a 2000 ml al giorno. Mediamente un individuo sano emette 14 flatulenze al giorno. Una dieta ricca di cellulosa fa incrementare le emissioni di gas da 15 a 176 ml/h.

Il gas presente nell'intestino è una miscela costituita per il 99% da N_2 , O_2 , CO_2 , H_2 e CH_4 presenti in quantità tra di loro molto variabili. L' N_2 può variare dall'11% al 92%, l' O_2 dallo 0% all'11%, il CO_2 dal 3% al 56%, l' H_2 dallo 0% al 69%, il CH_4 dallo 0% al 56%. Nei periodi di frequenti flatulenze si riscontrano alte concentrazioni di H_2 e CH_4 .

I gas intestinali possono derivare da: 1) aria deglutita, 2) produzione intestinale, 3) diffusione ematica.

1) Durante una singola deglutizione vengono inghiottiti circa 3 ml di aria. L'aria deglutita è la sorgente principale della bolla gastrica. La maggior parte dell'aria contenuta nello stomaco viene eliminata per via orale con le eruttazioni e solo una piccola quota passa nell'intestino dove viene in parte assorbita ed in parte espulsa per via anale. Dei molti litri di N_2 inghiottiti ogni giorno, solo circa 400 ml sono emessi per via anale.

2) Nel lume intestinale vengono prodotti principalmente CO_2 , H_2 e CH_4 . Nella parte prossimale dell'intestino, la CO_2 deriva dalla reazione degli H^+ di origine sia gastrica (HCl) che intestinale (acidi grassi provenienti dalla dige-

stione dei trigliceridi) col HCO_3^- presente nelle secrezioni intestinali. La CO_2 così prodotta viene quasi del tutto assorbita durante il transito intestinale e solo una minima parte viene emessa con le flatulenze. La maggior parte della CO_2 presente nelle flatulenze deriva viceversa dalla fermentazione batterica.

L' H_2 che deriva dalla fermentazione dei carboidrati nel colon viene in parte emesso con le flatulenze ed in parte assorbito ed eliminato attraverso i polmoni. In caso di malassorbimento o di ingestione di carboidrati non assorbibili o non digeribili, la produzione di H_2 aumenta.

Anche il metano viene prodotto dalla flora batterica del colon utilizzando l' H_2 prodotto dalla fermentazione dei carboidrati. Con le flatulenze vengono emessi anche indolo, scatolo e composti sulfurei, come metan-tiolo e dimetil-solfato, che pur in tracce sono responsabili dell'odore putrefattivo delle feci e delle flatulenze.

3) Essendo la maggior parte dei gas intestinali sia idroche liposolubili, si verificano continui scambi tra il lume intestinale ed il compartimento ematico. I gas diffondono passivamente seguendo il gradiente pressorio. L' H_2 ed il CH_4 , la cui pressione parziale è molto più elevata nel lume intestinale, passano dall'intestino al sangue e vengono eliminati attraverso i polmoni. Gli altri gas diffondono in un senso o nell'altro a seconda delle zone. Nella bolla gastrica, ad es., essendo la $p\text{CO}_2$ molto bassa si avrà una diffusione della CO_2 dal sangue verso lo stomaco. Viceversa, nel duodeno, dove la $p\text{CO}_2$ è maggiore di quella ematica, si avrà diffusione di CO_2 dal lume intestinale verso il compartimento ematico. L' N_2 e l' O_2 a livello gastrico diffondono verso il compartimento ematico, nel tenue e nel crasso verso il lume intestinale.

Bibliografia

MOTILITÀ INTESTINALE

- Almy T. P. et al., *Gastroenterology*, 1949, **12**, 425.
Christensen J., Anuras S., Hauser R. L., *Gastroenterology*, 1974, **66**, 240.
Coremans G., Janssens J., Vantroppen G. et al., *Dig. Dis. Sci.*, 1985, **30**, 765.
Coutourier D., Roze C., Coutourier-Turpin N., Debray L., *Gastroenterology*, 1969, **56**, 323-327.
Frexinos J., Bueno L., Fioramonti J., *J. Gastroenterology*, 1985, **88**, 1104.
Gill R. C., Cote K. R., Bower K. L., Kingma Y. J., *Gut*, 1986, **27**, 1006.
Gorard D. A., Libby G. W., Forthing M. J., *Gut*, 1994, **35**, 496.
Johnson L. R. ed., *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2 ed., 1987, Raven Press, New York.
Krevsky B., Melmed L. S., D'Ercole F., Maurer A. H., *Gastroenterology*, 1986, **91**, 1102.
Magee D. F., Dalley II A. F., *Digestion and the structure and function of the gut*, 1986, Karger, Basel.
Massi P., Giagnoni G., Basilico L. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, **253**, 269.
Patton J. S., Carey M. C., *Science*, 1979, **204**, 145.
Sarna S. K., *Gastroenterology*, 1985, **89**, 894.
Schang J. C., Devroede G., *Gastroenterology*, 1983, **85**, 1048.
Snape W., Cohen S., *Am. J. Physiol.*, 1980, **238**, G228.
Van Trappen G., Janssen S. L., Ghous Y., *J. Clin. Invest.*, 1977, **59**, 1158.
Wright S., Snape W., Cohen S., *Am. J. Physiol.*, 1980, **238**, G228.

TRASPORTO IDROSALINO

- Bearteschi A. J., Pence R. A., *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, R236.
Schafer J. A., Andreoli T. E., *Principles of water and electrolyte transport across membranes*, in Andreoli T. E., Hoffman J. F., Fanestil D. D., Schultz S. G. eds., *Physiology of membrane disorders*, 2 ed., 1986, Plenum Medical Book Company, New York.

ASSORBIMENTO DEL CALCIO

- Colston K. W., MacKay A. G., Finlayson C. et al., *Gut*, 1994, **35**, 1219.
Karbach U., *Z-Gastroenterol.*, 1994, **32**, 500.
Kenny A. D., *Intestinal calcium absorption and its regulation*, 1981, Boca Raton, Florida, CRC Press.
Nemere I., Norman A. W., *Transport of calcium*, in Schultz S. G.

INTESTINO TENUE E CRASSO

ed., *Handbook of physiology*, IV, 1991, American Physiological Society, Bethesda, p. 337.
Wasserman R. H., Fullmer G. S., Shimura F., *Calcium absorption and the molecular effects of vitamin D₃*, in Kumar R. ed., *Vitamin D: basic and clinical aspects*, 1984, The Hague Martinus Nijhoff.

ASSORBIMENTO DEL FERRO

Bomford A. B., Munro H. N., *Hepatology*, 1985, **5**, 870.
Conrad M. E., Umbreit J. N., Moore E. G., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994, **356**, 69.
Cox T. M., Peters T. J., *Br. J. Hematol.*, 1980, **44**, 75.
Dallmann P. R., *Ann. Rev. Nutr.*, 1986, **6**, 13.
Finch C., *Blood*, 1994, **84**, 1697.
Muir A., Hopfer U., *Am. J. Physiol.*, 1985, **248**, G376.
Refsum S. B., Schreiner B. B.-I., *Scand. J. Gastroenterol.*, 1984, **19**, 867.
Tallkvist J., Tjalve H., *Farmacol. Toxicol.*, 1994, **75**, 233.

ASSORBIMENTO DI VITAMINE

VIT. A
Hicks V. A., Gunning D. B., Olson J. A., *J. Nutr.*, 1984, **114**, 1326.
Ong D. E., *Nutr. Rev.*, 1985, **8**, 225.
Sporn M. B., Robert A. B., Goodman D. S. eds., *The Retinoids*, II, 1984, Academy Press, Orlando, Florida.
Van-Vliet T., Schreurs W. H., Van-Den-Berg H., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, **62**, 110.
Vieira A. V., Schneider W. S., Vieira P. M., *J. Endocrinol.*, 1995, **146**, 201.

AC. FOLICO

Davis R. E., *Adv. Clin. Chem.*, 1986, **25**, 233.
Reisenhauer A. M., Krumdieck C. L., Halsted C. H., *Science*, 1977, **198**, 196.
Rose R. C., *Intestinal absorption of water soluble vitamins*, in Johnson L. R. ed., *Physiology of the gastrointestinal tract*, 1987, Raven Press, New York.
Rosenberg I. H., *New Engl. J. Med.*, 1975, **193**, 1303.
Weir D. G., McGing P. G., Scott J. M., *Biochem. Pharmacol.*, 1985, **34**, 1.

FUNZIONI SECRETORIE E DI ASSORBIMENTO CONNESSE CON L'IMMUNITÀ INTESTINALE

MacDermott R. P., Elson C. O. eds., *Mucosal immunology. I. Basic principles*, in *Gastroenterology clinics of North America*, 1991, W. B. Saunders, Philadelphia.
Targan S. R., Shanahan F., *Immunology and immunopathology of the liver and gastrointestinal tract*, 1990, Igaku-shoin Medical, New York.
Walker W. A., *Clin. Gastroenterology*, 1986, **15**, 1.

DIGESTIONE BATTERICA NEL COLON. ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI

Bergman E. N., *Physiol. Rev.*, 1990, **70**, 567.

GAS INTESTINALI

Levit M. D., Bond J. H., *Intestinal gas*, in Sleisenger M. H., Fordtran J. S. eds., *Gastrointestinal disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management*, 4 ed., 1989, W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 257.

SALVATORE CONDORELLI E LUIGI CONDORELLI

CANCRO DEL COLON-RETTO

SUMMARY

Screening del carcinoma colon-rettale (col. 2823). - **Dieta e chemioprevenzione del cancro del colon-retto** (col. 2826). - **Genetica e biologia molecolare dei tumori del colon-retto** (col. 2827). - **Carcinoma del colon-retto non ereditario (CCR sporadico)**. - **Poliposi adenomatosa familiare (PAF)**. - **Sindrome ereditaria del carcinoma colon-rettale non poliposico (HNPCC)**. - **Screening delle sindromi poliposiche e delle sindromi non poliposiche** (col. 2829). - **Cenni sulla terapia adiuvante del cancro del colon e del retto** (col. 2829). - **Chemioterapia del carcinoma del colon-retto in fase avanzata metastatica** (col. 2829). - **Cancro colon-rettale ereditario non poliposico (HNPCC)** (col. 2833). - **Introduzione e caratteristiche cliniche. Genetica**. - **Identificazione e prevenzione**. - **Trattamento profilattico**. - **Terapia integrata e adiuvante dei tumori colon-rettali localmente avanzati** (col. 2836). - **Introduzione**. - **Cancro del colon**. - **Cancro del retto**.

Screening del carcinoma colon-rettale

In relazione all'elevata incidenza e mortalità del carcinoma del colon-retto [CCR] nei paesi industrializzati, un partico-

lare interesse è stato rivolto ai programmi di *screening*. Ogni anno questa neoplasia causa 50.000 morti negli U.S.A. (40.000 per il colon e 10.000 per il retto) ed 11.000 (7.400 e 3.700) in Italia.

Gli esami diagnostici più utilizzati per la diagnosi precoce del CCR sono: l'esplorazione rettale (ER), la ricerca del sangue occulto (RSO) nelle feci e l'endoscopia.

L'ER è un esame che permette di esplorare solo l'ultima parte del retto e dovrebbe essere sempre incluso nell'esame obiettivo dei soggetti con età > 50 anni per il controllo della prostata e del retto. L'ER trova indicazione nella diagnostica iniziale di soggetti sintomatici con sospetto cancro dell'ultima parte del retto, ma non può essere inserito nei programmi di *screening*.

La RSO è stata molto utilizzata nei programmi di *screening* per il basso costo, facilità di ottenere il campione e buona *compliance* dei pazienti. L'esame può essere eseguito a domicilio dal paziente con il test Hemoccult[®], dopo adeguata dieta ricca di scorie e senza carne per almeno 4 giorni. Il problema principale dell'Hemoccult[®] sono i falsi negativi che comportano un ritardo diagnostico. Le cause possono essere la mancata osservanza della dieta, l'assunzione di vitamina C, errori nell'allestimento del campione ed il ridotto numero di preparati esaminati, meno di 3 per controllo.

Uno studio condotto dal Colon Cancer Control Study del Minnesota (U.S.A.) ha valutato l'impatto della RSO in una popolazione di 46.551 soggetti nei confronti di una popolazione di controllo per un periodo di 13 anni. I dati dello studio dimostravano una riduzione di mortalità del 33%, con una minore incidenza di stadi avanzati. La mortalità annuale era di 5,88/1000 casi rispetto al 8,43/1000 del gruppo di controllo, sebbene nella valutazione biennale i dati erano sovrapponibili (8,33/1000). Per alcuni AA. la riduzione della mortalità rilevata nello studio del Minnesota è forse da imputare più all'impatto dell'endoscopia, eseguita nei casi positivi, che all'Hemoccult[®]. Infatti il 30% dei soggetti sottoposti a *screening* ogni anno aveva ricevuto un esame endoscopico. Nello studio del Minnesota i vetrini erano stati reidratati con acqua deionizzata, questo ha portato i risultati dell'Hemoccult[®] dal 2% al 10%, di conseguenza il 38% della popolazione dello studio era sottoposta a pancolonoscopia.

Attualmente in Europa sono in corso tre studi di *screening* in Inghilterra, Danimarca e Svezia. In quest'ultimo sono entrati 27.000 casi suddivisi tra Hemoccult[®] e controllo. Dopo due anni di *follow-up* le diagnosi di neoplasie maligne ed adenomi sono sovrapponibili in entrambi i bracci dello studio. Anche gli altri studi europei dimostrano un aumento delle diagnosi in fase precoce, ma non un vantaggio in termini di mortalità.

Una caratteristica dello studio danese ed inglese è quella di utilizzare Hemoccult[®] non idratato a differenza dello studio del Minnesota.

Le nuove tecniche di RSO con metodi immunochimici (Hemeselect[®]) sembrano dare migliori risultati dell'Hemoccult[®]. La sensibilità di questi test è dell'83%, la specificità del 96% e la predittività positiva del 7,5%.

In uno studio inglese che confronta in 1489 soggetti l'Hemoccult[®] e l'Hemeselect[®], quest'ultimo risulta più sensibile nella diagnostica delle neoplasie, ma meno specifico (95%) al confronto con Hemoccult[®] (99%). Ulteriori studi dovranno chiarire il valore dell'Hemeselect[®] rispetto ai costi, alla sensibilità e specificità.

L'endoscopia ha due vantaggi sulla RSO, una migliore sensibilità per le lesioni anche piccole e la possibilità di asportarle. Due studi hanno valutato la colonoscopia dopo iniziale negatività dell'esame: in uno la ripetizione dell'esame dopo un anno ha comportato 101 casi positivi per patologia, nell'altro, in 259 soggetti asintomatici riesaminati dopo 2 anni dal primo controllo è emerso che il 15% presentava adenomi, nessuno neoplasie o adenomi con displa-

TAB. V. SCREENING CLINICO E GENETICO DELLA POLIPOSIS E DELLA HNPCC

Malattia	Screening clinico	Screening genetico
Poliposi adenomatose familiari e sindrome di Gardner	Esame del fondo dell'occhio per ipertrofia congenita dell'epitelio pigmentato retinico; radiologia del cranio e dei denti (osteomi; malformazioni dentali); endoscopia alta e sigmoidoscopia	Analisi del gene APC e della relativa proteina nei leucociti del sangue periferico
Sindrome di Turcot	Sigmoidoscopia, TC o RMN del capo per la ricerca di tumori cerebrali (frequente il glioblastoma multiforme)	Analisi del gene APC e della relativa proteina nei leucociti del sangue periferico
Sindrome di Peutz-Jeghers	Colonscopia e radiologia gastrointestinale	Non disponibile
Poliposi giovanile	Colonscopia	Non disponibile
HNPCC	Colonscopia; ecografia pelvica e biopsia endometriale nei casi sospetti	Analisi dei geni hMSH2, hMLH1, hPMS1 e hPMS2 nei leucociti del sangue periferico. Ricerca di eventuali mutazioni della linea germinale dei geni MLH1 e MSH2 (v. sotto col. **2835)

sia. In generale la *compliance* agli studi di *screening* è buona: uno studio inglese riporta una *compliance* del 79% tra soggetti con elevato rischio. In Australia i medici generici preferiscono arruolare in questi studi i soggetti che ne fanno espressa richiesta. Globalmente sono pochi gli studi che dimostrano una riduzione di mortalità nei soggetti sottoposti a *screening* endoscopico.

L'American Cancer Society (ACS) mette in relazione la riduzione della mortalità (-29% per le donne e -7% per gli uomini) che si è riscontrata negli ultimi 30 anni nel Nord America con i programmi di *screening*, mentre per il National Cancer Institute Canadese essa potrebbe essere in relazione alla modificazione della dieta. I recenti dati sulla riduzione dei tumori del colon-retto correlati con l'assunzione dell'Aspirina® potrebbero meglio di altre speculazioni spiegare la riduzione di mortalità, soprattutto negli U.S.A., ove si fa largo consumo di Aspirina® per la prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Mentre negli *screening* per il carcinoma della cervice uterina e della mammella nelle donne con età tra i 50 e i 74 anni è stato dimostrato un vantaggio in termini di riduzione della mortalità, nel CCR i dati pubblicati non dimostrano ancora in modo certo che lo *screening* possa ridurre la mortalità del CCR.

In un futuro non molto lontano è possibile che la biologia molecolare ci consentirà di individuare *marker* fecali quali indicatori della presenza di adenomi o tumori in fase iniziale.

L'ACS consiglia per una diagnosi precoce, al di fuori dei programmi di *screening*, una ER una volta all'anno dopo i 40 anni, la RSO ogni anno dopo i 50 anni e la colonscopia ogni 3-5 anni dopo i 50 anni.

Per lo *screening* delle sindromi poliposiche familiari e della sindrome ereditaria del carcinoma colon-rettale senza poliposi (HNPCC) v. coll. **2833-2836 e tab. V.

Bibliografia

- Caffarey S. M., Broughton C. L., Marks C. G., *Br. J. Surg.*, 1993, **80**, 1399-1400.
 Howe G. R., Benito E., Castello R. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1992, **84**, 1887-1896.
 Kewenter J., Breuinger H., Fugaras B. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1994, **37**, 115-119.
 Mandel J. S., Bond J. H., Church T. R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 1365-1371.
 Mary R. A. M., Vaughan T. L., Davis S., Thomas D. B., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1995, **4**, 29-36.
 Potter J. D., *JAMA*, 1992, **268**, 1573-1577.
 Potter J. D., Slattery M. L., Bostick R. M., Gapstur S. M., *Epidemiol. Rev.*, 1993, **15**, 499-545.
 Weinstein B., *Cancer Rev.*, 1991, **51**, 5080-5085.

- Weller D., Heller J., Beilby J., Woodward A., *Med. J. Aust.*, 1994, **160**, 620-624.
 Weller D., Thomas D., Heller J., Woodward A., Edwards J., *Aust. N. Z. J. Surg.*, 1994, **64**, 464-469.
 Winawer S. J., Flehinger B. J., Schottenfeld D., Mitter D. G., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 1311-1318.

FRANCESCO DI CUSANZO

Dieta e chemioprevenzione del cancro del colon-retto

La patogenesi del cancro del colon retto è attribuibile a fattori genetici ed ambientali, in particolare la *dieta*. Una dieta ricca di vegetali è sicuramente protettiva, comunità vegetariane (*Avventisti del Settimo Giorno*) hanno una bassissima incidenza di neoplasie del colon-retto. Le fibre hanno un importante ruolo nel ridurre il rischio di adenomi del colon. Howe *et al.* (1992) hanno analizzato 13 studi caso-controllo ed hanno evidenziato una riduzione di neoplasie del colon-retto nelle popolazioni ad elevato consumo di fibre. Una dieta ricca di fibre può avere un importante impatto nel ridurre gli acidi biliari (desossicolico e litocolico) che sono stati trovati in elevate concentrazioni nei soggetti a rischio per cancro del colon-retto, che assumono una bassa quantità di fibre ed elevate quantità di grassi.

Recentemente in alcune neoplasie l'attenzione dei ricercatori si è rivolta a sostanze in grado di contrastare o sopprimere il meccanismo della cancerogenesi e prevenire lo sviluppo delle neoplasie (chemioprevenzione).

Il calcio, la vitamina D, il selenio sembrano ridurre il rischio di cancro del colon-retto. Il meccanismo potrebbe essere quello di inibitori della crescita precancerosa.

Le vitamine C, E, β -carotene sono indicate come in grado di proteggere i soggetti con storia di adenomi del colon-retto da una possibile recidiva. Tuttavia in uno studio condotto in 864 soggetti con adenomi e trattati con β -carotene, vitamina C e vitamina E, singolarmente e in combinazione, non si è riscontrata una riduzione degli adenomi.

Il sulindac è un farmaco antinfiammatorio non steroideo che è in grado di ottenere una regressione di adenomi rettali e colici in pazienti con poliposi familiare. In modelli animali il sulindac ed altri antinfiammatori non steroidei sono in grado di ridurre la formazione di lesioni maligne e premaligne del colon-retto. Giardiello *et al.* (1993) hanno dimostrato che il sulindac (150 mg $\times$ due volte al dì) induce una riduzione media dei polipi del 44% e del loro diametro del 33%. Tuttavia due studi del National Cancer Institute (U.S.A.), su una popolazione con adenomi sporadici, non dimostrano alcun effetto protettivo del farmaco.

L'Aspirina® è stata recentemente studiata per valutare se è in grado di ridurre il rischio del cancro del colon-retto.

Il Male Health Professional Study ha dimostrato in una casistica di 47.000 individui che assumono regolarmente Aspirina® (> = 2 volte alla settimana) una riduzione del rischio di cancro del colon-retto così come della malattia in fase avanzata o metastatica. Giovannucci *et al.* (1995) hanno valutato l'impatto dell'Aspirina® in 121.701 infermiere tra i 30 e 55 anni che hanno assunto il farmaco due o più volte alla settimana. Il rischio relativo di sviluppare un CCR dopo 4 anni di assunzione dell'Aspirina® era di 1,06, tra 5 e 9 anni di 0,84, tra 10 e 19 anni di 0,70 e il massimo beneficio si otteneva dopo 20 anni (RR 0,56, $p = 0,008$) e in soggetti che assumevano tra le 4 e 6 compresse di aspirina alla settimana. Questo studio apre una interessante strada alla chemioprevenzione del CCR, in particolare per l'associato beneficio dell'Aspirina® sulle malattie cardiovascolari. Gann *et al.* (1993) non hanno trovato alcuno effetto delle basse dosi di Aspirina® nel ridurre l'incidenza del CCR.

Il meccanismo con cui l'Aspirina® potrebbe ridurre il rischio di carcinoma del colon-retto non è noto, tuttavia un Editoriale sul *New England Journal of Medicine* (Aron, 1995) ipotizza alcuni meccanismi di azione sulle prostaglandine che potrebbero essere alla base della riduzione degli adenomi e consiglia l'assunzione di 325 mg di Aspirina® a giorni alterni come prevenzione del CCR.

In particolare si apre la possibilità che i dati ottenuti possano essere migliorati con i nuovi inibitori delle prostaglandine.

La strada della chemioprevenzione potrebbe dare risultati molto interessanti e forse inaspettati. È necessario che alla base di tutte le ricerche ci sia un valido metodo statistico ed una corretta valutazione dei fattori che possono influenzare i risultati.

Bibliografia

- Aron A. J., *N. Engl. J. Med.* (Editorial), 1995, **333**, 656-657.
 Gann P. H. *et al.*, *B. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 1220-1224.
 Giardiello F. M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 1313-1316.
 Giovannucci E., Egan K. M., Hunter D. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 609-614.
 Greenberg E. R., Baron J. A., Tosteser T. D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 141-147.
 Howe G. R. *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 1992, **81**, 1887-1896.
 Labayle D., Fisher D., Vielh P. *et al.*, *Gastroenterology*, 1991, **101**, 635-639.
 Lippman S. M., Hong W. K., Benner S. E., *The chemoprevention of cancer*, in Grenwald P., Kramer B. S., Weed D. L. eds., *Cancer Prevention and Control*, 1994, New York, p. 329.

FRANCESCO DI COSTANZO

Genetica e biologia molecolare dei tumori del colon-retto

Il carcinoma del colon-retto [CCR] può presentarsi con caratteristiche patogenetiche non ereditarie ma si sviluppa, nella maggior parte dei casi, su un adenoma benigno. I soggetti portatori di un adenoma benigno hanno una probabilità del 40-50% di essere portatori di altri analoghi tumori in altre sedi del colon e dopo l'asportazione il 30% dei casi presenta una ricaduta.

L'ereditarietà del CCR può essere collegata alla presenza di due sindromi cliniche: la poliposi adenomatosa familiare (PAF) e la sindrome ereditaria del CCR senza poliposi (HNPCC). Circa il 10% dei CCR si sviluppa in soggetti geneticamente predisposti (v. POLIPO E POLIPOSII**).

Carcinoma del colon-retto non ereditario (CCR sporadico)

L'evoluzione della normale mucosa del colon e del retto dà prima verso un polipo benigno, quindi verso un polipo canceroso e poi in un CCR invasivo viene associata ad una serie di eventi genetici (risccariati (non ereditari), che includono:

a) la mutazione del protooncogene *K-ras* sul cromosoma 12p (sia nell'adenoma che nel carcinoma);

b) la ipometilazione del DNA (consistente perdita di gruppi metilici del DNA) che dà luogo ad instabilità e quindi a perdite alleliche;

c) deficit del DNA di un gene tumore-soppressore sul cromosoma 5(5p21) (sia nell'adenoma che nel carcinoma);

d) perdita allelica nel sito di un gene tumore-soppressore posto nel cromosoma 18q (gene *DCC*) (sia nei polipi sia soprattutto nei carcinomi);

e) infine perdita allelica sul cromosoma 17p che è associata con mutazioni del gene tumore-soppressore *p53* (avviene soprattutto nei carcinomi e non nei polipi).

È stato dimostrato che le metastasi a distanza del CCR sono associate a delezione allelica nei cromosomi 17p e 18q. La perdita nei cromosomi 17p e 18q assume un valore prognostico di grande rilevanza, tanto che pazienti in stadio II, che presentano una perdita allelica sul cromosoma 18q, debbono essere considerati con prognosi simile al III stadio (Jen *et al.*, 1994).

Poliposi adenomatosa familiare (PAF)

La PAF (in inglese FAP: *familial adenomatous polyposis*) causa circa l'1% di tutti i casi di CCR ed è caratterizzata dalla presenza di centinaia di polipi del colon. I polipi insorgono durante l'infanzia e si sviluppano progressivamente fino a virare verso un cancro del colon al quinto decennio, se non si interviene prima con l'asportazione del colon. L'incidenza della PAF è di 1/800 neonati e si può associare anche a carcinomi periampollari del duodeno, glioblastomi multiformi, medulloblastomi (*sindrome di Turcot*), denti soprannumerari, ipertrofia dell'epitelio pigmentato della retina (*sindrome di Gardner*).

L'80% dei soggetti con PAF presentano una delezione del braccio lungo del cromosoma 5q21. Nelle cellule neoplastiche di tumori del colon il gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*) è somaticamente mutato nel 60% dei pazienti.

La localizzazione e isolamento del gene *APC* ha permesso di chiarire molti aspetti della PAF. Sebbene l'esatta funzione del gene rimane ancora non del tutto chiara, la sua funzione sembra quella di produrre una proteina che interagisce con le alfa- e beta- catenine, implicate nel citoscheletro cellulare e nell'adesione cellulare (v. ADESIONE, MOLECOLE DI**), che sono molto importanti nel meccanismo del ciclo cellulare e nella progressione neoplastica. La mutazione del gene *APC* è stata riscontrata nell'80% dei pazienti con PAF e nel 60% dei CCR sporadici.

Sindrome ereditaria del carcinoma colon-rettale non poliposico (HNPCC)

Il cancro colon-rettale ereditario non poliposico (HNPCC: *hereditary non polyposis colorectal cancer*) comprende le sindromi di Lynch I e II. La Lynch I è caratterizzata da una suscettibilità autosomica dominante a sviluppare un CCR prevalentemente nel colon prossimale (70%) in età precoce (media 44 anni) e con una elevata percentuale di neoplasie sincrone e metacrone. La Lynch II è una variante della I per la presenza di concomitanti neoplasie dell'endometrio e dell'ovaio.

Dal punto di vista genetico sono stati identificati una serie di geni coinvolti nella HNPCC, tutti omologhi del gene procariotico *mutS*: il gene *hMSH2* (cromosoma 2p), il gene *hMLH1* (cromosoma 3), il gene *hPMS1* (cromosoma 2q31-33) e il gene *hPMS2* (cromosoma 7q22). Per più ampie informazioni, v. sotto coll. **2833-2836 dell'apposito capitolo dedicato al cancro colon-rettale ereditario non poliposico (HNPCC).

V. anche: GENETICA MEDICA E UMANA**.

Screening delle sindromi poliposiche e delle sindromi non poliposiche

Nella tab. V riportiamo le tecniche di screening clinico e genetico delle poliposi (v. POLIPO E POLIPOSIS**) e della HNPCC (v. anche tab. VI, a col. **2835).

Bibliografia

- Giardiello F. M., Hamilton S. R., Krush A. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 1313-1316.
 Hixon L. J., Earnest D. L., Fennerty M. B., Sampliner R. E., *Am. J. Gastroenterol.*, 1993, **10**, 1647-1649.
 Houlston R. S., Collins A., Slack J., Morton N. E., *Ann. Hum. Genet.*, 1992, **56**, 99-103.
 Jen J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331** (4), 213-221.
 Kelloff G. J., Boone C. W., Steele V. E. et al., *J. Cell. Biochem.*, 1995, in corso di stampa.
 Lanspa S. J., Jenkins J. X., Watson P., Smyrk T. C., Cavalieri R. J., Lynch H. T., *Nebr. Med. J.*, 1992, **77**, 310-313.
 Lynch H. T., *Gastroenterology*, 1986, **90**, 486-496.
 Lynch H. T., Lanspa S., Smyrk T. et al., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1991, **53**, 143-160.
 Lynch H. T., Smyrk T. C., Watson P. et al., *Gastroenterology*, 1996, in corso di stampa.
 Lynch H. T., Watson P., Smyrk T. C. et al., *Cancer*, 1992, **70** (suppl.), 1300-1312.
 Mayer R. J., *Medicine*, 1996, **12**, VIII, 8-22, Scientific American, New York.
 Mecklin J. P., Jarvinen H. J., Peltokallio P., *Gastroenterology*, 1986, **90**, 328-333.
 Peltoniaki P. et al., *Cancer Res.*, 1993, **53**, 5853.
 Rustgi A. K., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331** (25), 1694-1702.

FRANCESCO DI COSTANZO

Cenni sulla terapia adiuvante del cancro del colon e del retto

Per terapia adiuvante si intende l'impiego di chemioterapia-immunoterapia e radioterapia dopo completa resezione di un CCR allo stadio B2 e allo stadio C al fine di eliminare le micrometastasi e migliorare la sopravvivenza.

La terapia adiuvante non è giustificata negli stadi A e B1 di Dukes perché la sopravvivenza a 5 anni è superiore al 90%. Per la terapia adiuvante negli stadi B2 la discussione è ancora aperta, tuttavia recenti dati del gruppo americano NSABP (*National Surgery Adjuvant Breast and Bowel Project*) depongono per un vantaggio statisticamente significativo anche per lo stadio B2 trattato con chemioterapia post-chirurgica.

Nel cancro del retto stadio B2-C viene utilizzata la combinazione di radioterapia e chemioterapia. Recenti studi indicano che la radioterapia pre-operatoria seguita da intervento chirurgico radicale con eventuale ulteriore radioterapia e chemioterapia adiuvante è in grado di aumentare la sopravvivenza e ridurre le recidive locali e a distanza.

Anticipiamo che trovano largo impiego nella terapia adiuvante le associazioni di 5-fluorouracile (5-FU) con levamisolo e con ac. folinico (leucovorin); rimandiamo per una più ampia ed esauriente trattazione al capitolo *Terapia integrata e adiuvante dei tumori colon-rettali localmente avanzati* (col. **2836-2840).

Bibliografia

- Moertel C. G., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1136-1142.
 Moertel C. G., Fleming T. R., Macdonald J. S. et al., *Ann. Intern. Med.*, 1995, **122**, 321.
 O'Connell M. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 502.

FRANCESCO DI COSTANZO

Chemioterapia del carcinoma del colon-retto in fase avanzata metastatica

Nel carcinoma del colon-retto (CCR) metastatico il trattamento di scelta è la chemioterapia (CT) con l'aggiunta, in casi selezionati, della chirurgia e radioterapia; nelle localizzazioni solo epatiche il trattamento può essere chirurgico o chemioterapico loco-regionale.

Spesso i medici sono scettici sul reale valore della CT nel CCR avanzato, poiché ritengono che questa possa ridurre la qualità di vita (QdV) senza dare un vantaggio in termini di sopravvivenza. Uno studio condotto dal Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group (NGTATG, 1992) ha valutato la sopravvivenza in pazienti asintomatici randomizzando tra CT alla progressione e CT alla comparsa dei sintomi. La sopravvivenza era statisticamente migliore nel braccio di CT intrapresa subito alla progressione ($p < 0,2$); in particolare il periodo senza sintomi ed il tempo mediano alla progressione (TMP) era significativamente più lungo ($p < 0,001$).

Scheithauer et al. (1993) hanno confermato questi risultati dimostrando che la CT incrementa la sopravvivenza ed il TMP rispetto alla terapia di supporto. Questi ed altri studi hanno dimostrato come la CT ha un importante ruolo nel migliorare la sopravvivenza dei pazienti con CCR avanzato. Anche l'impatto sulla QdV si è dimostrato a favore della CT rispetto al non trattamento.

Il 5-fluorouracile (5-FU) rimane il farmaco più utilizzato nel trattamento del CCR avanzato, con tassi di risposta intorno al 10-18%. Due trial randomizzati pubblicati nel '95 hanno riportato elevate percentuali di risposta con solo 5-FU per bolo endovenoso: 29% e 30%. Tuttavia, l'infusione continua (IC) è sicuramente la via migliore di somministrazione del 5-FU in termini di risposta e sopravvivenza (tasso di risposte obiettive 30%; sopravvivenza mediana 14 mesi).

In due studi randomizzati Lokich (1991) ha dimostrato la superiorità dell'infusione continua (IC) rispetto al *bolus*. In un trial, essa è stata in grado di indurre un 33% di risposta obiettiva verso un 7% con solo 5-FU in *bolus*. La tossicità più comune riportata nei pazienti trattati con l'infusione continua è stata la *hand-foot syndrome*, caratterizzata da dolore, gonfiore ed eritema palmoplantare (24%).

Altri studi finora condotti non mostrano differenze statisticamente significative tra infusione continua e *bolus* per quanto riguarda la sopravvivenza. In uno studio del South West Oncology Group (SWOG) l'aggiunta dell'ac. folinico (AF) all'infusione continua di 5-FU sembra incrementare lievemente la sopravvivenza.

I risultati riportati con l'infusione continua sono simili a quelli della combinazione 5-FU + AF. La massima dose tollerata (MDT) di 5-FU varia in relazione allo schema utilizzato: nella somministrazione mensile per 5 giorni è di 500-600 mg/m²/die, in quella settimanale è di 700-800 mg/m², nell'infusione continua la MDT può arrivare a 2500 mg/m²/settimana.

Recentemente alcuni AA. hanno dimostrato una particolare attività della crono-infusione circadiana (crono-IC) di 5-FU in combinazione con AF e oxaliplatino (L-OHP). Il gruppo francese di Lévi (1992) ha riportato un 58% di risposta obiettiva in 93 pazienti con CCR avanzato. Uno studio randomizzato tra crono-IC di 5-FU/AF/L-OHP vs. IC «piatta» ha dimostrato la superiorità della crono-IC (risposta obiettiva: 53 vs. 32%) ed una minor tossicità. La crono-IC è un interessante tecnica di somministrazione del 5-FU in combinazione con altri farmaci, tuttavia i costi dei sistemi di crono-IC ne hanno limitato la diffusione e la sperimentazione in casistiche più ampie.

L'attività del 5-FU può essere potenziata attraverso l'associazione con altri farmaci come: ac. folinico (AF o leucovorin), metotrexato (MTX), cisplatino (DDP), idrossiurea (HU), interferone (IFN), PALA (N-[fosfonacetil]-L-aspartico acido) ed allopurinolo.

Studi *in vitro* dimostrano che un eccesso di AF a livello intracellulare è in grado di potenziare il legame covalente terziario tra timidilato sintetasi (TS) e 5-FU, aumentando

l'effetto citotossico. Una meta analisi condotta da Piedbois *et al.* (1992) ha dimostrato un vantaggio in termini di risposte obbiettive (RO) della combinazione rispetto al solo 5-FU. Nei *trial* che hanno utilizzato lo schema settimanale la risposta era del 28%, mentre con la schema mensile di Machover *et al.* (1986) la risposta obbiettiva era del 22%. La sopravvivenza globale è sovrapponibile con entrambi i trattamenti. La tossicità è caratterizzata principalmente da diarrea, stomatite-mucosite e leucopenia. La diarrea può arrivare ad un 70% e può essere letale per i pazienti con più di 65 anni. Il Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) riporta 7 decessi su 115 pazienti trattati con 5-FU e AF ad alte dosi e 4/115 con AF a basse dosi rispetto a nessuna morte tossica nel braccio con 5-FU (113 pazienti). Stein *et al.* (1995) hanno valutato in un *pool* di pazienti inclusi in *trial* di fase III alcuni fattori predittivi della tossicità. I più importanti sono risultati l'età (> 70) ed il sesso (donne), mentre il *performance status* (PS) non sembra avere alcun impatto. Di fondamentale importanza, per limitare le complicanze della tossicità, è l'informazione del paziente ed una tempestiva terapia di supporto. La terapia della diarrea deve essere tempestiva soprattutto per i pazienti con età superiore ai 65 anni e prevedere l'idratazione, sintomatici quali loperamide e difenossilato ed in alternativa octreotide (v.*).

Il MTX è in grado di potenziare l'attività del 5-FU attraverso l'accumulo del 5-fosforibosil-pirofosfato (PRPP). Non è ancora definito quale sia il dosaggio ottimale di MTX per la modulazione del 5-FU, anche se le dosi medio-alte (100-300 mg) sembrano le più attive considerando anche la tossicità. Una meta analisi comprendente 9 *trial* (J. Clin. Oncol., 1994) che confrontano 5-FU/MTX verso 5-FU, dimostra che le RO sono 19% nel 5-FU + MTX e 10% nel 5-FU da solo ($p < 0,0001$) con una sopravvivenza di 10,7 e 9,1 mesi, che raggiunge la significatività statistica ($p = 0,024$). Le risposte oscillano tra 4 e 27% e le risposte complete sono il 2-3%. La principale tossicità di questa combinazione è la mucosite e la leucopenia.

L'IFN svolge un effetto sinergico potenziando l'azione del 5-FU con un meccanismo che non è ancora del tutto chiaro. L'IFN può produrre un cambiamento della farmacocinetica del 5-FU, incrementando la concentrazione intracellulare, riducendo la clearance, aumentando l'eliminazione, riducendo l'*uptake* cellulare della timidina e l'attività della timidina-kinasi. Le risposte obbiettive oscillano tra il 10-40% e ulteriori studi sono necessari per meglio valutare l'importanza della combinazione.

Il cisplatino (DDP) in associazione con il 5-FU ottiene un 14-35% di risposte obbiettive. L'idrossiurea (HU) combinata con 5-FU ed AF induce un 25-30% di risposte, senza incrementare la tossicità. Il dipiridamolo ed allopurinolo sono stati utilizzati in combinazione con il 5-FU senza dare risultati particolarmente interessanti. L'allopurinolo si è dimostrato di qualche utilità nel ridurre la stomatite da 5-FU, anche se la sua utilizzazione per via sistemica potrebbe interferire con il metabolismo del 5-FU riducendone l'attività.

Nei casi di localizzazione metastatica solo epatica si può utilizzare la CT locoregionale arteriosa con 5-fluorodesossisuridina (FUdR) che ottiene un 40-45% di risposte obbiettive senza tuttavia permettere una sopravvivenza superiore alla terapia sistemica. La tossicità è caratterizzata principalmente da colangiti sclerosanti e dal rialzo degli enzimi epatici.

Tra i nuovi farmaci che hanno superato le fasi I e II di sperimentazione clinica sono in primo luogo particolarmente attivi il Tomudex® e gli inibitori della topoisomerasi I (CPT-11 e Irinotecan). Il Tomudex® (ralitrexed) è un diretto e selettivo inibitore della timidilato sintetasi, che deriva dalla quinazolina. Il Tomudex® è dotato di un interessante profilo

terapeutico e di una attività preclinica superiore ai classici antifolici e fluoropirimidine. In fase I ha dimostrato prevalentemente una tossicità caratterizzata da leucopenia seguita da mucosite, diarrea, *rash* cutaneo, astenia e transitoria elevazione delle transaminasi. La massima dose tollerata è di 3,5 mg/m². Studi di fase II sono stati condotti in pazienti con cancro colon-rettale (CCR), con tumore del pancreas, della mammella, microcitoma del polmone e tumore del polmone non-SCLC (carcinoma polmonare non a piccole cellule) e dello stomaco; nei pazienti con CCR le risposte oscillano intorno al 29% (3 mg/m² ogni 3 settimane). Uno studio randomizzato ha dimostrato un 20% di risposte con il Tomudex® e 13% con il 5-FU + AF con una riduzione della mucosite, stomatite e di neutropenie nel braccio con Tomudex®. Ulteriori studi di fase III sono attualmente in corso in Europa.

L'Irinotecan è un potente inibitore della topoisomerasi-I (topo-I) che svolge la sua azione attraverso un legame covalente con la topo-I, impedendo il corretto svolgimento della doppia elica del DNA. Somministrato con schema settimanale o bisettimanale è in grado di indurre risposte obbiettive nel 25% (*range* 14-33%) dei pazienti pretrattati con CT o RT e nel 36% dei soggetti non pretrattati. In particolare la sua attività è presente anche in pazienti resistenti al 5-FU. La principale tossicità è la leucopenia ed anemia, mentre il vomito, la diarrea, *flushing* cutanei ed i dolori addominali rappresentano i principali effetti tossici non ematologici.

In conclusione, la biomodulazione del 5-FU, in particolare con AF e MTX, è in grado di ottenere risultati migliori rispetto al solo 5-FU. Le risposte sono infatti superiori, con un raddoppiamento delle risposte complete ed un vantaggio statisticamente significativo in termini di sopravvivenza con la combinazione 5-FU-MTX. Il 5-FU somministrato ad alte dosi od in infusione continua è in grado di indurre la stessa percentuale di risposte della biomodulazione. Tra i nuovi farmaci il Tomudex® è sicuramente il più promettente insieme al CPT-11.

Bibliografia

- Advanced colorectal cancer. Meta analysis Project, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 960-969.
 Conti J. A., Kemeny N., Saltz L. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1994, **13**, 195 Abstract.
 Di Costanzo F., *Ann. Oncol.*, 1992, **3**, 245.
 Di Costanzo F., Bartolucci R., Calabresi F. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1992, **3**, 371-376.
 Di Costanzo F., Malacarne P., Zironi S. *et al.*, *J. Surg. Oncol. Suppl.*, 1991, **2**, 137-140.
 Glimelius B., Hoffman K., Olafsdottir M. *et al.*, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1989, **25** (5), 829-835.
 Graf W., Phalman L., Bergstrom and Glimelius B., *Br. J. Cancer*, 1994, **70**, 559-563.
 Hamilton J. M., *Ann. Oncol.*, 1992, **3**, 245-246.
 Leichman C. G. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1993, **12**, 583.
 Lévi F., Misset J. L., Brienza S. *et al.*, *Cancer*, 1992, **69**, 893-900.
 Lokich J., Ahlgren J., Cantrell J. *et al.*, *Cancer*, 1991, **67**, 14-19.
 Machover D. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1986, **4**, 685-696.
 Moertel C. G., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1136-1142.
 Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group, *J. Clin. Oncol.*, 1992, **10**, 904-911.
 Piedbois P. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1992, **10**, 896-903.
 Scheithauer W., Rosen H., Kornek G. V. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1993, **306**, 752-755.
 Schmoll H. J., *Ann. Oncol.*, 1994, **5** (Suppl. 3), 115.
 Stein B. N. *et al.*, *Cancer*, 1995, **75**, 11-17.
 Wadler S., Schwartz E. L., Goldman M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1989, **7**, 1769-1775.
 Ward W. H. J., Kimbell R., Jackman A. L., *Biochemical Pharmacology*, 1992, **43**, 2029-31.
 York M., Greco F. A., Figlin R. A. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1993, p. 210, p. 590 Abstract.
 Zalcberg J., Cunningham D., Green M. *et al.*, *Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1995, 494 (abstr.).

FRANCESCO DI COSTANZO

Cancro colon-rettale ereditario non poliposico (HNPCC)

Introduzione e caratteristiche cliniche

Già nel 1895 Warthin descrisse una famiglia nella quale notò una incidenza insolitamente elevata di cancro colon-rettale. Queste osservazioni non ebbero il giusto rilievo finché nel 1966 non furono identificate due famiglie affette da cancro colon-rettale non poliposico associato di frequente a cancro dell'endometrio, trasmesso con caratteri autosomici dominanti (Lynch *et al.*, 1966). Questa condizione fu inizialmente identificata come *cancer family syndrome* ed in seguito ribattezzata *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC) per distinguerla dalla PAF o poliposi adenomatosa familiare (Lynch *et al.*, 1971; Lynch *et al.*, 1978). Successivamente, nella medesima sindrome sono state individuate da Lynch due varietà che sono oggi note rispettivamente come *sindrome di Lynch I* e *sindrome di Lynch II* (Lynch *et al.*, 1985). Ambedue si caratterizzano da un punto di vista morfologico per la presenza di adenomi multipli, localizzati prevalentemente nel colon prossimale, più piccoli di quelli tipici della poliposi adenomatosa familiare e spesso con i caratteri dell'adenoma piano (*flat adenoma*) (Lynch *et al.*, 1993); tali polipi, intorno ai 45 anni, presentano una spiccata predisposizione a trasformarsi in carcinomi, spesso poco differenziati e di tipo mucinoso, con localizzazione nel colon prossimale, spesso sincroni e con tendenza a ripresentarsi in maniera metacrona anche nei tratti più distali del grosso intestino (Lynch *et al.*, 1991). Questo complesso sindromico viene comunemente conosciuto come *sindrome di Lynch I*.

In alcuni ceppi familiari si associano cancri extracolici (endometrio, ovaio, uretere, pelvi renale, stomaco, pancreas, vie biliari, midollo, cute e laringe) a configurare una variante nota come *sindrome di Lynch II* (Law *et al.*, 1977; Mecklin *et al.*, 1992).

Genetica

Da un punto di vista genetico è patognomonica la trasmissione ereditaria con modalità autosomica dominante (Ponz de Leon, 1994) che è stata dimostrata attraverso studi di *linkage* dei geni *MS* e *ML* con la clonazione degli stessi. Recentemente sono stati mappati e clonati due geni, rispettivamente nel braccio corto del cromosoma 2p (*MSH2*) e del cromosoma 3p (*MLH1*) (Lynch e Lynch, 1994; Vasen, 1994; Mecklin *et al.*, 1995). Questi geni codificano gli omologhi umani di un gene procariotico (batterico) *mutS*, che fa parte di un sistema deputato a riparare i *mismatches* che avvengono nel corso delle duplicazioni del DNA (Leach *et al.*, 1993; Fishel *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Smith, 1994). Le mutazioni di questi geni conducono, in definitiva, ad una instabilità del DNA per meccanismi difettivi di riparazione e sono caratteristicamente presenti con frequenza variabile sia nella linea germinale dei pazienti affetti da HNPCC, sia nelle neoplasie extracoliche della sindrome di Lynch II (Peltomäki *et al.*, 1993).

Del tutto recentemente sono stati identificati ulteriori omologhi del gene procariotico *mutL*: *hMLH1* nel cromosoma 3, *hPMS1* nel cromosoma 2q31-33, *hPMS2* nel cromosoma 7p22 (Papadopoulos *et al.*, 1994; Bronner *et al.*, 1994; Nicolaides *et al.*, 1994).

Identificazione e prevenzione

L'identificazione di pazienti affetti da HNPCC, che rappresentano circa il 6% rispetto all'incidenza totale annua di cancro colon-rettale (Ponz de Leon, 1994; Benatti *et al.*, 1993) rende possibile l'attuazione di una prevenzione secondaria di sicuro rilievo nel ridurre, se non la morbidità, sicuramente la mortalità. Peraltro, la mancanza di stigmati

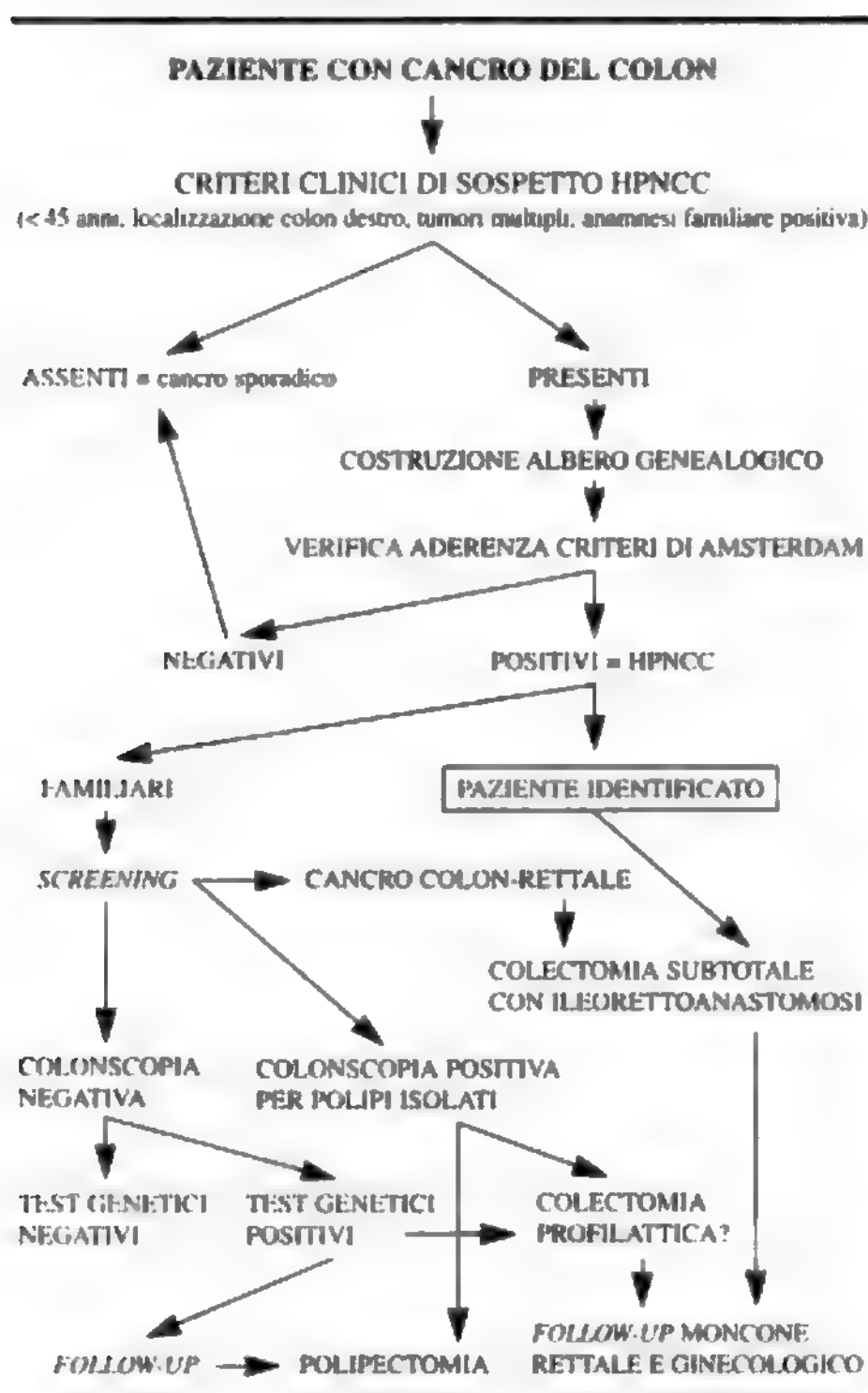
fisiche premonitrici, l'assenza di biomarcatori e l'elevata frequenza di cancro colon-rettale sporadico, rendono particolarmente difficile il riconoscimento di questa sindrome. Pertanto nel 1990, durante il suo secondo *meeting* ad Amsterdam, il Gruppo Collaborativo Internazionale per l'HNPCC formulò criteri rigorosi a cui riferirsi per includere un paziente affetto da cancro colon-rettale nella sindrome in questione: a) presenza di tre o più congiunti con carcinoma colon-rettale istologicamente accertato, uno dei quali parente di primo grado degli altri due; b) presenza di cancro colon-rettale in almeno due generazioni successive; c) uno o più cancri colon-rettali diagnosticati ad una età inferiore a 50 anni (Vasen *et al.*, 1991). Tali criteri, però, si sono dimostrati eccessivamente restrittivi quando applicati su «piccole» famiglie, per cui si sono moltiplicati gli studi per individuare criteri diagnostici predittivi se non di certezza, almeno di alta probabilità (Ponz de Leon, 1994).

A questo punto è di particolare rilievo (970 pazienti indagati) lo studio del 1994 di Percesepe *et al.*, che hanno analizzato il valore predittivo di sei variabili clinico-patologiche: trasmissione del cancro in maniera «verticale» (altamente predittivo), aggregazione familiare, comparsa precoce del cancro (< 50 anni), localizzazione della neoplasia nel colon prossimale (tutti e tre i parametri sono da considerarsi predittivi), presenza di tumori multipli, presenza di tumori mucinosi. Gli AA. hanno concluso che il rilievo della presenza di cancro del colon in due generazioni successive, è sufficiente a porre un fondato sospetto di HNPCC anche se non sono soddisfatti tutti i criteri di Amsterdam. Nella pratica, una volta identificato il probando è possibile attuare una prevenzione secondaria attraverso uno *screening* accurato dei consanguinei (Lynch H. T. e Lynch J. F., 1994). Tale *screening* è stato standardizzato e prevede che vengano sottoposti ad una colonscopia totale tutti i consanguinei del paziente «indice», dall'età di 25 anni, o almeno quelli che hanno un'età di 5 anni inferiore allo stesso, ripetuta poi ogni due anni per tutta la vita (alcune istituzioni peraltro sono meno rigide e consentono di interrompere la sorveglianza fra i 60 e i 75 anni) (Vasen *et al.*, 1993; Jablonska *et al.*, 1993).

Nelle donne, inoltre, è opportuno eseguire ad intervalli, attualmente non standardizzati, ecografia pelvica e biopsia dell'endometrio (Lynch H. T. e Lynch J. F., 1994). Seguendo questo protocollo è possibile ottenere risultati di indiscutibile interesse. Jablonska *et al.* (1993), in un arco di tempo di dieci anni dal 1982 al 1992, su 339 pazienti indagati hanno evidenziato al primo esame colonscopico un cancro colon-rettale nel 16,2% ed adenomi nel 32,1% dei casi con una età media dei pazienti risultati positivi di 46,6 anni e con una variante Lynch I nel 34% e Lynch II nel 66%; nei controlli successivi sono poi stati identificati altri 7 cancri, ma, quel che più conta è che tutti i cancri sono risultati reseccabili essendo per la maggior parte in stadio A o B della classificazione di Dukes (v. INTESTINO TENUE E CRASSO, VII, 2349-2351, fig. 129).

Lo stesso tipo di esperienza positiva viene riferito da Jarvinen *et al.* (1995), che hanno sottoposto a *screening* 133 pazienti asintomatici appartenenti a 22 famiglie affette da HNPCC, confrontandoli con 118 pazienti non sottoposti a *screening*: nell'arco di 10 anni la diagnosi di cancro è stata fatta in 6 pazienti del primo gruppo (4,5%) ed in 14 dei controlli (11,9%) probabilmente per il significato profilattico esercitato dalla polipectomia eseguita durante i controlli endoscopici, con mortalità nulla nei pazienti sottoposti a *screening* rispetto al 35,7% nel gruppo di controllo. In conclusione, secondo lo studio in questione, *screening* e *follow-up* dimezzerebbero il rischio di cancro in membri a rischio in famiglie con HNPCC e prevenirebbero la mortalità ad esso collegata.

TAB. VI. DIAGRAMMA DI FLUSSO DELL'HPNCC



Lo screening clinico così come il preciso inquadramento diagnostico costituiscono, comunque, ancora oggi un problema piuttosto complesso che richiede una buona disponibilità da parte dei soggetti a rischio a sottoporsi a controlli ripetuti per periodi assai lunghi se non per tutta la vita. Peraltro, come per la poliposi familiare, sarà presto possibile riservarlo ai soli soggetti a rischio selezionati da test genetici effettuati sul DNA estratto da leucociti del sangue periferico in grado di identificare l'instabilità del DNA caratteristica della sindrome determinata dalle mutazioni dei geni *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* e *PMS2* di cui abbiamo precedentemente parlato (Rustgi, 1994). Aaltonen *et al.* (1998) segnalano l'importanza di scoprire, nei pazienti con cancro coloretale mediante l'analisi del DNA tumorale, la presenza di eventuali mutazioni della linea germinale dei geni di riparazione *MLH1* e *MSH2*, che consentono l'individuazione dell'HPNCC.

Trattamento profilattico

Una volta individuati i soggetti a rischio, quando si reperisce poliposi nel corso dei routinari accertamenti, potrà essere sufficiente procedere a polipectomia che potrà anche essere ripetuta nel tempo finché sarà possibile mantenere con sicurezza un «clean colon». Quando invece ci si trova di fronte ad una o più neoplasie conclamate, anche se il più delle volte confinate nel colon prossimale, sarà op-

portuno non limitarsi ad interventi resettivi circoscritti ma, secondo la maggioranza degli AA., si dovrà procedere ad una colectomia subtotale con ileorettoanastomosi proseguendo poi il follow-up endoscopico del moncone rettale ed accentuando i controlli ginecologici (Mecklin *et al.*, 1995), quando non si voglia, in donne in menopausa, prendere in considerazione una isteroannessiectomia profilattica (Lynch e Lynch, 1994). Ovviamente quando i test genetici saranno completamente affidabili si potrà considerare anche la colectomia profilattica nei soggetti non disponibili ad un follow-up protratto per tutta la vita (Lynch e Lynch, 1994).

La tab. V, posta a col. **2825 e la tab. VI illustrano in dettaglio le fasi di screening dell'identificazione dell'HPNCC e del trattamento.

Bibliografia

- Aaltonen L. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, 1481.
 Benatti P. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1993, 54, 371.
 Bodmer W. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, 6, 117-119.
 Bronner C. E. *et al.*, *Nature*, 1994, 368, 258-261.
 Fishel R. *et al.*, *Cell*, 1993, 71, 167.
 Jablonska M. *et al.*, *Bratisl. Lek. Listy*, 1993, 94, 302.
 Jass J. R. *et al.*, *Mutat. Res.*, 1994, 310, 125.
 Lanspa S. J. *et al.*, *Anticancer Res.*, 1993, 13, 1793.
 Law J. *et al.*, *Cancer*, 1977, 39, 1229.
 Leach F. S. *et al.*, *Cell*, 1993, 75, 1215.
 Lynch H. T. *et al.*, *Cancer*, 1985, 56, 934-938; 939-951.
 Lynch H. T., Krush A. J., *Cancer*, 1971, 27, 1505.
 Lynch H. T., Lynch J. F., *Anticancer Res.*, 1994, 14, 1631.
 Lynch H. T. *et al.*, *Surg.*, 1978, 83, 104.
 Lynch H. T. *et al.*, *Arch. Intern. Med.*, 1966, 117, 210.
 Lynch H. T. *et al.*, *Cancer*, 1985, 56, 939.
 Lynch H. T. *et al.*, *Semin. Oncol.*, 1991, 18, 337.
 Lynch H. T. *et al.*, *Cancer*, 1993, 71, 2709-2714.
 Liu B. *et al.*, *Cancer Res.*, 1994, 54, 4590.
 Mecklin J.-P. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1995, 38, 588.
 Mecklin J.-P. *et al.*, *Cancer*, 1992, 69, 1112.
 Nicolaides N. C. *et al.*, *Nature*, 1994, 371, 75-80.
 Papadopoulos N. *et al.*, *Science*, 1994, 263, 1625.
 Peltomäki P. *et al.*, *Cancer Res.*, 1993, 53, 5853.
 Percesepe A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1994, 58, 799.
 Ponz De Leon M., *Ann. Med.*, 1994, 26, 209.
 Rustgi A. K., *N. Engl. J. Med.*, 1994, 331, 1694-1702.
 Smith R. G., *Am. J. Med. Sci.*, 1994, 308, 295.
 Vasen H. F., *Anticancer Res.*, 1994, 14, 1613.
 Vasen H. F. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1993, 36, 1.
 Vasen H. F. *et al.* (International Collaborative Group, Amsterdam), *Dis. Colon Rectum*, 1991, 34, 424.
 Warthin A. S., *Arch. Intern. Med.*, 1913, 12, 546.
 Young J. *et al.*, *Hum. Mutat.*, 1993, 2, 351.

GAETANO NETRI, EMILIO RUMI E CLAUDIO COLO

Terapia integrata e adiuvante dei tumori colon-rettali localmente avanzati

Introduzione

Il cancro colon-rettale (CCR) costituisce ancora oggi un problema aperto da un punto di vista del trattamento. Infatti nonostante gli indubbi progressi nel campo diagnostico e nel trattamento chirurgico, la sopravvivenza a 5 anni dal momento della diagnosi e della terapia resta attualmente attorno a valori del 50% (Cerdan *et al.*, 1994). Tenuto conto degli ottimi risultati ottenibili nelle forme precoci è facile attribuire l'evoluzione insoddisfacente degli altri casi al ritardo con cui essi giungono all'osservazione. Infatti, al momento della diagnosi, nel 40-50% dei pazienti ci si trova di fronte a forme avanzate (Mazzeo, 1995).

Ricordiamo, per chiarezza di esposizione, cosa si intende per cancro colon-rettale avanzato. Facendo riferimento alla classificazione di Dukes (v. INTESTINO TENUE E CRASSO, VII, 2349-2351, fig. 129), dovremmo parlare di cancro avanzato in alcuni casi B, in tutti i C ed in presenza di metastasi a distanza. Con più precisione, però, facendo riferimento alla classificazione ASC (basata sul TNM) definiamo localmente avanzate le forme T3, T4, con o senza coinvolgimento linfonodale ma in assenza di metastasi a distanza, mentre lasceremo il solo termine di avanzato ai casi in cui sia presente

diffusione metastatica sistemica. Si segnala che la presenza di micrometastasi linfonodali rilevate con la tecnica PCR *reverse-transcriptase* è indice prognostico negativo anche nello stadio II di cancro colon-rettale (Liefers *et al.*, 1998).

Per quanto attiene al *cancro del colon*, il coinvolgimento a tutto spessore della parete del viscere, così come l'eventuale infiltrazione degli organi adiacenti, quando sia comunque possibile eseguire un intervento resettivo, eventualmente allargato, con intento radicale, non incide in maniera decisiva sulla prognosi che viene, invece, fortemente condizionata dalla presenza di metastasi linfonodali.

Per il *retto* vale lo stesso discorso generale ma con alcune varianti: la progressione della malattia attraverso la parete o, peggio, il superamento della stessa con infiltrazione dei tessuti perirettali anche in assenza di localizzazioni linfonodali, condiziona da una parte la possibilità di reseccabilità radicale e, dall'altra, una elevata incidenza di recidive locali (20-40%) (Lopez e Monafò, 1993; Mazzeo, 1995). Date queste premesse l'interesse degli oncologi si è indirizzato verso la ricerca di terapie complementari (*terapia adiuvante*) alla chirurgia che potessero influire positivamente nella evoluzione ed in definitiva nella prognosi delle *forme neoplastiche localmente avanzate* ma comunque suscettibili di resezione.

Cancro del colon

Le terapie complementari (*terapia adiuvante*) al trattamento chirurgico che possono oggi essere considerate sono la *radioterapia* e la *chemioterapia*. La prima, nel caso del grosso intestino intraperitoneale, non è mai stata particolarmente considerata in quanto la diffusione extraviscerale (tale da pregiudicare l'operabilità) e l'incidenza di ripresa locale di malattia per insufficiente radicalità non sono molto significative né i vantaggi ipotizzabili tali da bilanciare i problemi relativi ad una massiccia irradiazione del piccolo intestino (Mazzeo, 1995). Pertanto si è tentato di migliorare i risultati con la chemioterapia. La sperimentazione clinica è stata diretta verso l'identificazione del farmaco o della associazione di farmaci più efficace, del momento più adatto alla somministrazione degli stessi, del dosaggio ideale (massimo risultato terapeutico con minimi effetti collaterali), della via di somministrazione. Diciamo subito che si è ampiamente dimostrata l'inutilità se non addirittura la nocività di trattamenti preoperatori (Blijham, 1991).

Restano, quindi, da considerare i trattamenti intraoperatori e quelli, più diffusi, postoperatori. Per quanto riguarda i primi, attuati incannulando la porta peroperatoriamente nell'intento di colpire cellule neoplastiche circolanti mobilitate nel corso delle manovre chirurgiche, dopo un periodo di grande entusiasmo e di grandi speranze (Rousselot *et al.*, 1972), sono stati ridimensionati e, solo negli ultimi anni, come vedremo in seguito, sono stati ripresi in considerazione in associazione con il più classico *trattamento adiuvante postoperatorio* (Schmoll, 1994). Per quanto attiene quest'ultimo c'è da dire che la sperimentazione condotta senza sosta negli ultimi 30 anni si è rivelata del tutto deludente sino agli inizi degli anni '90 (Kraus *et al.*, 1994; Wirth *et al.*, 1991). Nel 1991 i risultati di moltissimi *trial* portarono alle seguenti conclusioni: il cancro del colon ha una notevolissima chemioresistenza; l'agente citotossico dotato di maggiore efficacia è il 5-fluorouracile (5-FU) con una percentuale di risposta del 15%, ma senza chiari vantaggi nella sopravvivenza globale; le associazioni polichemioterapiche sono inefficaci (Blijham, 1991). Sempre nel 1991, peraltro, è emerso un concetto che si è rivelato poi fondamentale: a causa del suo complesso metabolismo il rapporto efficacia/tossicità del 5-FU può essere influenzato positivamente attraverso una modulazione biochimica con

agenti capaci di ridurre la disponibilità di substrati competitivi e di aumentare quella di co-substrati o di indurre interazioni più efficienti con le sostanze bersaglio (Codacci-Pisanelli *et al.*, 1994). Sono così stati avviati vari *trial* nei quali, di volta in volta, al 5-FU sono stati associati l'ac. folinico (leucovorin), il levamisolo, e l'interferone alfa (Blijham, 1991; Hesketh e Bulger, 1991; Piedbois *et al.*, 1993).

Oggi si può dire che le associazioni più efficaci sono quella con l'ac. folinico e con il levamisolo che, nello stadio III (con interessamento linfonodale), ridurrebbero l'incidenza di recidiva locale di oltre il 30% ed inciderebbero in maniera significativa nella sopravvivenza globale a 5 anni (Steele e Posner, 1993; Lopez, 1994; Kraus *et al.*, 1994; Rea *et al.*, 1993). Attualmente è ancora aperto un *trial* dell'EORTC (40911) che mira a valutare gli eventuali vantaggi di una chemioterapia (5-FU + ac. folinico + levamisolo) combinata per via sistemica e per via intraperitoneale o intraportale (Rougier e Nordlinger, 1993; Schmoll, 1994). Infine per quanto concerne l'immunoterapia si rinvia alla voce TUMORI*, *immunoterapia dei tumori*.

Cancro del retto

Per molti anni si è puntato decisamente sulla *radioterapia* con il duplice intento di rendere reseccabili tumori avanzati apparentemente inoperabili o di «radicalizzare» interventi per tumori localmente avanzati pesantemente gravati da recidive locali (30% secondo Gunderson, 1986). I primi tentativi di integrazione radiochirurgica si debbono ai ricercatori del Memorial Hospital di New York agli inizi degli anni '60 (Leaming *et al.*, 1961). Per molti AA. il momento più idoneo per instaurare una terapia adiuvante è quello *post-operatorio*; infatti, in tale fase, essa può essere applicata con criteri certamente selettivi, in base alla precisa conoscenza dello stadio della neoplasia ed alla reale valutazione del rischio di recidiva locoregionale, con la finalità principale di radicalizzare un intervento probabilmente incompleto. La dose comunemente somministrata varia tra i 40-50 Gy in 5-6 settimane ed il risultato più eclatante è quello di ridurre le recidive pelviche attorno al 10% senza però un sicuro impatto sulla sopravvivenza globale (Balslev *et al.*, 1982; Localio *et al.*, 1983; Thomas e Linblad, 1988).

La radioterapia preoperatoria peraltro presenta alcuni non trascurabili vantaggi sul piano concettuale: le cellule neoplastiche la cui vascolarizzazione e la conseguente ossigenazione non sono state ancora alterate dall'intervento sono più radiosensibili; le cellule neoplastiche più periferiche della massa tumorale e quelle affioranti alle vie di drenaggio linfatico e venoso sono più esposte all'azione citocida dell'irradiazione con conseguente perdita di vitalità e della possibilità di attecchimento *in loco* ed a distanza a seguito delle manipolazioni chirurgiche; infine, nei casi responsivi, la riduzione del tumore primitivo può portare ad una retrostadiazione dello stesso aumentando il tasso di reseccabilità locale di forme localmente avanzate. D'altra parte l'accettazione da parte dei chirurghi di questa modalità di trattamento è stata piuttosto lenta per il timore che l'irradiazione preoperatoria, con dosi dai 40 ai 60 Gy, potesse far lievitare le complicanze postoperatorie specie nella resezione anteriore. In realtà i risultati di *trial* molto consistenti (EORTC 1978; VASAG 1 e 2 1982; MRC 1984) hanno dimostrato chiaramente la possibilità di retrostadiazione della neoplasia con conseguente aumento della percentuale di reseccabilità radicale ed una riduzione apprezzabile delle recidive locoregionali, senza incidere significativamente sulla morbosità operatoria.

Infine, nell'intento di unire i vantaggi della radioterapia preoperatoria e di quella postoperatoria, tentando di evitare i lati negativi di entrambe, sono state largamente spe-

rimentate le potenzialità di una *terapia combinata* «sandwich» in cui l'intervento chirurgico viene a collocarsi fra due cicli di irradiazioni (Bjerkset e Dahl, 1980; Gunderson *et al.*, 1983; Mella *et al.*, 1984; Mohiuddin *et al.*, 1985; Puglionisi *et al.*, 1985; Cosimelli *et al.*, 1981). I risultati sarebbero migliori rispetto alla terapia postoperatoria e sovrapponibili a quelli della preoperatoria con il vantaggio di non dover dilazionare troppo l'intervento chirurgico.

Proprio per incidere in maniera più sicura sulla sopravvivenza globale negli anni più recenti si è provato a completare l'integrazione radiochirurgica con la chemioterapia. In realtà si tratta di una rivisitazione di esperienze ormai datate che, inspiegabilmente, non erano state sufficientemente valutate: nel 1969 Moertel *et al.* riferivano risultati soddisfacenti nel trattamento di neoplasie gastrointestinali avanzate con radioterapia associata a 5-FU; Vietti *et al.* nel 1971 avevano dimostrato un meccanismo citocida sinergico del 5-FU e della radioterapia e nel 1988 Haghbin *et al.* avevano confermato quelle asserzioni. Lo standard attuale di trattamento associato del cancro del retto localmente avanzato prevede per le neoplasie al II e III stadio l'impiego di una terapia neoadiuvante fondata sull'associazione di chemioterapia (5-FU o 5-FU con ac. folinico o 5-FU con MeCCNU o cisplatino o 5-FU e mitomicina C) in bolo o in infusione continua e radioterapia (40-50 Gy). I risultati sembrano molto promettenti. La tolleranza al trattamento è buona, la riduzione della massa neoplastica è pressoché costante, le difficoltà tecniche all'intervento così come la morbosità postoperatoria non aumentano, sicuramente diminuiscono le recidive locoregionali, aumenta l'intervallo libero da malattia e sembra decisamente migliorata anche la sopravvivenza globale a 5 anni, benché quest'ultimo dato aspetti ulteriori conferme dal completamento di trial tuttora aperti (Cummings, 1992; Frykholm *et al.*, 1993; Steele e Posner, 1993; Kraus *et al.*, 1994; Schmoll, 1994; Picciocchi *et al.*, 1994).

Per completare la rassegna delle terapie integrate ci sembra opportuno fare il punto sulla IORT (*radioterapia intraoperatoria* [v.*]). Questa metodica prevede l'irradiazione di un focolaio neoplastico attraverso una via d'accesso chirurgica. Questo approccio consente l'esposizione del focolaio neoplastico, l'esclusione dei tessuti sani dal fascio di irradiazione, la circoscrizione dell'area di irradiazione alla sede tumorale ottenuta per mezzo di collimatori appropriati per forma e dimensione, la circoscrizione del volume di irradiazione ottenuta mediante una selezione dell'energia del fascio di elettroni. Le sorgenti usate sono generalmente acceleratori lineari di cui si utilizza il fascio di elettroni di energia da 6 a 20 meV in rapporto allo spessore del volume tumorale (Casciani *et al.*, 1989). La IORT è stata impiegata fondamentalmente in due situazioni: nelle forme localmente avanzate, al limite della inoperabilità, con verosimile persistenza di residui tumorali dopo la resezione chirurgica, e sulla chirurgia iterativa delle recidive pelviche. Nella esperienza del Massachusetts General Hospital la radioterapia esterna + chirurgia è stata messa a confronto con la radioterapia esterna + chirurgia + IORT in un gruppo di pazienti resecati con evidenza di residui macro- o microscopici ed i risultati riguardo alla ripresa locale di malattia sembrano essere migliori quando viene associata la IORT (Noyer *et al.*, 1984). Uno studio recente di Abuchaibe *et al.* (1993) ha evidenziato un aumento dell'intervallo libero da recidiva particolarmente spiccato, però, quando la IORT è stata eseguita in presenza di residui neoplastici minimi. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti in un trial clinico multicentrico di fase I e II (Lanciano *et al.*, 1993) condotto dal RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) sul cancro del retto localmente avanzato o recidivo. Dall'ottobre 1985

al dicembre 1989 sono stati immessi in questo studio 87 pazienti da 14 istituzioni: il controllo locale della malattia è risultato del 77% a due anni se l'intervento era apparso macroscopicamente radicale, a fronte del 10% se erano residuati tessuti neoplastici in sede, con analoghi riflessi nella sopravvivenza a due anni che era rispettivamente 88% e 48%. Come si evince dai dati soprariportati il numero dei casi trattati è ancora esiguo per poter esprimere un parere definitivo sulla giustificazione della IORT (che fra l'altro è un trattamento costoso che richiede tecnologie ed ambienti adeguati) come trattamento integrato da inserire nella routine (Noyes *et al.*, 1992). Peraltro, al momento attuale, il problema merita ulteriori approfondimenti in quanto le potenzialità della IORT sembrerebbero almeno promettenti, in casi di neoplasie particolarmente avanzate (nelle quali esistono concreti dubbi sulla possibilità di eseguire un intervento chirurgico radicale) o nella chirurgia reiterativa per recidive locoregionali (che andrebbe comunque considerata palliativa), quantomeno nell'aumentare l'intervallo libero da malattia e forse nell'allungare la sopravvivenza di pazienti a prognosi comunque infausta.

Bibliografia

- Abe M., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1984, **10**, 197.
 Abuchaibe O. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1993, **26**, 859.
 Balslev I. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1982, **46**, 551.
 Bjerkset T., Dahl O., *Dis. Colon Rectum*, 1980, **23**, 298.
 Blijham G. H., *Anticancer Drugs*, 1991, **2**, 233.
 Casciani C. U. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1989, **vol. 1**, 13.
 Cerdan F. J. *et al.*, *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 1994, **85**, 435.
 Codacci Pisanelli G. *et al.*, *Ital. J. Gastroenterol.*, 1994, **26**, 369.
 Cosimelli M. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1981, **vol. 4**, 227.
 Cummings B. J., *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 332.
 Cummings B. J., *Cancer*, 1992, **70**, 1372.
 Cummings B. J., *Surg. Clin. North Am.*, 1993, **73**, 167.
 Daneke G. W. *et al.*, *Arch. Surg.*, 1991, **126**, 1348.
 DeVita V. T. jr., Hellman S., Rosenberg S. H., *Cancer*, 1997, 5 ediz., Lippincott - Raven, Philadelphia-New York.
 EORTC, *Clinical trial on rectal cancer*, 1978.
 Frykholm G. J. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1993, **36**, 564.
 Gerard A. *et al.*, *Ann. Surg.*, 1988, **208**, 606.
 Gunderson L. L. *et al.*, *Cancer*, 1983, **52**, 446.
 Gunderson L. L., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1986, **12**, 283.
 Haghbin M. *et al.*, *Radiother. Oncol.*, 1988, **13**, 75.
 Hardy T. G. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1985, **28**, 484.
 Hesketh P. J., Bulger K. N., *Adv. Intern. Med.*, 1991, **36**, 219.
 Higgins G. A., *Controversies in cancer*, 1982, **17**, 145.
 Hind R. *et al.*, *Ann. R. Surg. Engl.*, 1992, **74**, 63.
 Jansen A. *et al.*, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1981, **153**, 537.
 Kraus T. W. *et al.*, *Langebecks Arch. Chir.*, 1994, **379**, 353.
 Krook J. *et al.*, *Proc. Ann. Soc. Clin. Oncol.*, 1986, **318**, 82.
 Lanciano R. M. *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 1993, **53**, 20.
 Leaming R. H. *et al.*, *Radiology*, 1961, **77**, 257.
 Liefers G. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339** (4), 223-228.
 Localio A. S. *et al.*, *Ann. Surg.*, 1983, **198**, 18.
 Lopez M., *Dis. Colon Rectum*, 1994, **37** (Suppl. 2), S86.
 Lopez M. J., Monafio W. W., *Surgery*, 1993, **53** (1), 30.
 MRC, *Br. J. Surg.*, 1984, **71**, 21.
 Mathus-Vliegen E. M. H. *et al.*, *Cancer*, 1986, **57**, 2212.
 Mazzeo F., *Il Gastroenterologo*, 1995, **11-12**, 149.
 McCue J. L., Phillips R. K. S., *Br. J. Surg.*, 1991, **78**, 1291.
 Mella O. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1984, **27**, 663.
 Milsom J. W., *Current Opinion in Gastroenterology*, 1993, **9**, 42.
 Moertel C. G. *et al.*, *Lancet*, 1969, **2**, 865.
 Moertel C. G. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1136-1144.
 Moertel C. G. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1995, **122**, 321.
 Mohiuddin H. *et al.*, *Cancer*, 1985, **55**, 350.
 Noyes R. D. *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 1992, **50**, 209.
 Ota D. M., *Int. J. Surg. Sciences*, 1994, **1**, 56.
 Pelissier E. P. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1992, **35**, 843.
 Picciocchi A. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1994, **37**, S69.
 Piedbois P., Buyse M., *Ann. Oncol.*, 1993, **4** (Suppl. 2), S15.
 Puglionisi A., Netri G. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1985, **lettura**, 526.
 Rea S. *et al.*, *Ann. Ital. Chir.*, 1993, **64**, 207.
 Robles Campos R. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1992, **79**, 29.
 Rousselot L. M. *et al.*, *Proc. 7 Intern. Cong. Chemoter.*, 1972, **2**, 579.
 Schmoll H. J., *Ann. Oncol.*, 1994, **5** (Suppl. 3), 115.
 Shumate C. R. *et al.*, *Cancer*, 1993, **71**, 3690.
 Siple W. U. *et al.*, *Ann. Surg.*, 1984, **200**, 289.
 Steele G. Jr., Posner M. R., *Curr. Probl. Cancer*, 1993, **17** (4), 223.

Stockholm Rectal Cancer Study Group, *Cancer*, 1990, **66**, 49.
 Thomas P. R., Linblad A. S., *Radiother. Oncol.*, 1988, **13**, 245.
 Vietti T. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, **47**, 865.
 Wirth A. et al., *Aust. N. Z. J. Surg.*, 1991, **61**, 13.

GAETANO NETRI, EMILIO RUMI E CLAUDIO COCO

CHIRURGIA DEL CRASSO E DEL RETTO

SOMMARIO

Recenti progressi nella chirurgia del crasso con o senza conservazione degli sfinteri (col. 2841): *Introduzione*. - *Preparazione intestinale e tecniche di anastomosi*. - *Tecniche della chirurgia del retto*. - *Chirurgia oncologica del retto*. - *Chirurgia radioimmunoguidata*. - *Malattie infiammatorie del crasso*. - *Chirurgia laparoscopica del grosso intestino*. - *Trattamento con microchirurgia endoscopica transanale (TEM) delle neoplasie del retto* (col. 2847): *Introduzione*. - *Strumentario e tecnica*. - *Indicazioni*. - *Risultati*. - *Trattamento dei polipi con il laser per via endoscopica* (col. 2851): *Introduzione*. - *Indicazioni*. - *Tecnica*. - *Complicanze e mortalità*. - *Risultati*.

Recenti progressi nella chirurgia del crasso con o senza conservazione degli sfinteri

Introduzione

La chirurgia colon-rettale è ancora oggi da considerarsi problematica: essa infatti è diretta ad un viscere per definizione inquinato; con notevole frequenza viene praticata in pazienti anziani e spesso in urgenza; può comportare il sacrificio dell'apparato sfinteriale o l'abolizione della funzione di serbatoio, peculiare del retto; può interessare strutture nervose con riflessi sulla funzionalità vescicale e/o sessuale; deve il più delle volte confrontarsi con una patologia di tipo neoplastico o con gravi patologie infiammatorie quali il morbo di Crohn o la rettocolite ulcerosa. Per tutti i motivi suddetti, la morbosità postoperatoria, gli esiti compromettenti la qualità di vita, la mortalità, sono ancora presenti in maniera elevata così come non possono essere considerati soddisfacenti i risultati da un punto di vista oncologico. Pertanto la ricerca di progressi in questo campo è stata sempre molto attiva e si è sviluppata secondo varie direttrici: da una parte si è mirato a ridurre la morbosità operatoria migliorando la tecnica delle suture e combattendo l'inquinamento, dall'altra si è cercato attraverso tecniche sempre migliori di ridurre al minimo gli interventi con sacrificio dell'apparato sfinteriale o con grave alterazione della funzione defecatoria; ed ancora, in campo oncologico si è inseguita una radicalità sempre maggiore per cercare di ridurre l'incidenza di recidive locali ancora causa troppo frequente di insuccesso della chirurgia rettale; si è poi molto speculato sull'approccio alle malattie infiammatorie sia per quanto riguarda le indicazioni all'intervento sia nella ricerca di interventi risolutivi ma funzionalmente accettabili; infine, nell'intento di ridurre il «peso» della chirurgia e di favorire la reimmissione più rapida dei pazienti nella vita attiva si stanno verificando le potenzialità della laparoscopia operatoria in questo settore della chirurgia.

Preparazione intestinale e tecniche di anastomosi

Il problema dell'inquinamento è stato, nel corso degli anni, affrontato nelle maniere più varie ma attualmente possiamo dire che sono entrate nella routine, come le metodiche più efficaci, la drastica pulizia dell'intestino (in molti centri viene praticata, in assenza di controindicazioni, la *whole gut irrigation*) e la terapia antibiotica somministrata con lo schema *short-term*.

Il campo delle *anastomosi* è stato a lungo terreno di controversia tra le varie scuole chirurgiche che hanno di volta in volta cercato di dimostrare la superiorità delle varie tec-

niche via via proposte (anastomosi termino-terminali, latero-laterali, latero-terminali e termino-laterali, in mono e doppio strato, in continua e a punti staccati, a tutto spessore o extramucosa) senza, peraltro, giungere a conclusioni univoche che vadano oltre la ormai comune opinione sul materiale di sutura che deve essere sottile 3/0 o 4/0 e sufficientemente inerte (Prolene® o monofili a lungo riassorbimento).

L'innovazione vera peraltro deve essere considerata l'impiego sempre più diffuso delle *suturatrici meccaniche* ed in particolare dei cosiddetti *staplers* (v. STRUMENTARIO CHIRURGICO; SUTURE CHIRURGICHE) nelle loro varie versioni, lineari o circolari, che permettono di eseguire anastomosi latero-laterali o, più comunemente, termino-terminali. In realtà l'incidenza di deiscenze anastomotiche non è sostanzialmente influenzata dalla tecnica di sutura ma gli *staplers* consentono fondamentalmente di eseguire con notevole affidabilità anastomosi, particolarmente nella chirurgia rettale, in sedi (piccolo bacino) nelle quali la convenzionale sutura manuale risulterebbe particolarmente indagginosa e di conseguenza rischiosa. Il progresso tecnologico, comunque, non si è fermato agli *staplers* e, seppure ancora non molto diffuse, sono entrate in uso le cosiddette anastomosi senza sutura il prototipo delle quali è l'*anello bioframmentabile di Valtrac* (Hardy et al., 1985) (trattasi di un anello composto di due segmenti, composti di acido poliglicolico e solfato di bario, che, introdotti nei due capi da anastomizzare e poi incastrati insieme, realizzano una anastomosi introflessa sierio-sierosa termino-terminale, per poi autoframmentarsi spontaneamente ed essere eliminati con le feci entro 2-3 settimane, a coalescenza anastomotica già consolidata).

Sempre in tema di «protezione» dell'anastomosi, specie in corso di chirurgia d'urgenza, quando il colon risulta pieno di feci, è stata da alcuni AA. segnalata l'utilità di una protesi intraluminali, in alternativa ad una colostomia derivativa: tale dispositivo (*coloshield*) consiste in un tubo di latex che viene fissato con punti riassorbibili all'interno del lume colico, a monte dell'anastomosi, ed attraverso la stessa portato all'esterno dell'ano ed inserito in una sacca per essere rimosso dopo 15-20 giorni (Ravo e Ger, 1985); tale metodica, per la verità, non ha riscosso molto credito ma recenti lavori sperimentali di Krivokapic et al., 1991) e Serra et al. (1992) ne confermerebbero l'efficacia e ne suggerirebbero l'impiego nei casi a rischio.

Tecniche della chirurgia del retto

Il problema centrale della chirurgia del retto è sempre stato quello inerente alla possibilità ed alla opportunità di eseguire interventi con demolizione dell'apparato sfinteriale o con conservazione dello stesso. In questa ottica a lungo la scelta ha previsto due sole opzioni: da una parte l'amputazione addomino-perineale secondo Miles e dall'altra la resezione anteriore del retto con anastomosi colon-rettale, essendo la prima riservata a patologie, per lo più neoplastiche, del «retto basso» (convenzionalmente 8-10 cm dall'ano) e la seconda a localizzazioni del «retto alto».

Questa schematizzazione, peraltro, non ha mai del tutto soddisfatto i chirurghi in quanto in molti casi difficoltà tecniche legate alla conformazione del bacino o alla presenza di obesità vanificano l'aspirazione a realizzare interventi conservativi anche in caso di localizzazioni relativamente «alte»; inoltre la necessità tecnica di eseguire interventi mutilanti per patologie relativamente benigne (polipi adenomatosi) ha continuamente stimolato i cultori della materia a ricercare altre soluzioni.

Negli ultimi anni, con l'acquisizione nella pratica comune delle cucitrici automatiche, la situazione si è nuovamente

modificata. Al giorno d'oggi è possibile eseguire *resezioni anteriori ultrabasse* (fino alla linea pettinata) per cui la percentuale di *intervento di Miles* si è ultimamente attestata su valori del 10% (Prete, 1993); resta inoltre da considerare l'*approccio transanale* per patologia benigna o a scopo di palliazione (Killingback, 1992; Nivatvongs e Wolff, 1992).

Nel campo della *resezione anteriore* le ricerche più recenti sono indirizzate a migliorare i risultati funzionali della stessa che, in caso di anastomosi a livello della giunzione anorettale, non sono del tutto soddisfacenti; sulla scorta dell'esperienza maturata con la confezione di *pouch* ileali nella rettocolite ulcerosa diversi AA., già alla fine degli anni '80 (Lazorthes *et al.*, 1986; Parc *et al.*, 1986), hanno confezionato una *pouch* colica a J da anastomizzare al canale anale con alterni risultati; ma, del tutto recentemente, altri AA. (Pelissier *et al.*, 1992; Landi *et al.*, 1993; Leo *et al.*, 1993; Hultén, 1994) hanno sostenuto la validità della tecnica in questione che andrebbe comunque presa in considerazione, specie quando la funzionalità sfinteriale valutata preoperatoriamente non sia risultata ottimale. Per quanto attiene l'intervento di Miles, ancora oggi resta controverso il trattamento della ferita perineale fra i sostenitori (peraltro attualmente scarsi) del *packing* dello spazio presacrale, con guarigione per seconda intenzione, quelli della sutura diretta del peritoneo pelvico e della ferita perineale su drenaggi aspirativi, e coloro che rinunciano alla ricostruzione del peritoneo pelvico e procedono a semplice sutura del piano perineale. Robles Campos e Hind (1992), dopo un accurato studio comparativo delle tre metodiche suddette, concludono per la superiorità della terza. Sempre a questo proposito John e Buchmann (1991) suggeriscono di «occupare» la pelvi con un lembo pedunculato di omento: questo da una parte faciliterebbe la guarigione e dall'altra manterrebbe il piccolo intestino al di fuori della pelvi nel caso di una radioterapia postoperatoria.

Ancora, per completezza, vogliamo ricordare la possibilità di ricreare un apparato sfinteriale attorno ad una colostomia perineale dopo intervento di Miles (Cavina *et al.*, 1985). I risultati permangono controversi ma le ricerche procedono alacremente, di pari passo con il progresso tecnologico, verso una ottimizzazione dei sistemi di elettrostimolazione del «neofintere» (Williams *et al.*, 1990).

Infine, progressi di grande rilievo sono stati fatti del tutto recentemente nell'ambito della chirurgia transanale. La diffusione della TEM (*transanal endoscopic microsurgery*) e la provata bontà dei risultati conseguibili consentono un approccio efficace e razionale alla patologia benigna o di limitata malignità del retto medio-basso (v. sotto col. **2847), così come la *fotocoagulazione laser per via transendoscopica* (v. sotto col. **2851) si sta dimostrando una preziosa alternativa nella palliazione delle neoplasie colon-rettali inoperabili (Mathus-Vliegen e Tytgat, 1986; Daneker *et al.*, 1991) e nel trattamento degli adenomi colo-rettali.

Chirurgia oncologica del retto

Da un punto di vista oncologico la situazione attuale della chirurgia del retto non può essere ancora considerata soddisfacente; infatti se è notevolmente aumentata la percentuale, nelle varie casistiche, di resezioni almeno apparentemente curative (50-70%; Abulafi e Williams, 1994) con una conseguente riduzione della mortalità peroperatoria, la sopravvivenza a cinque anni (considerando globalmente tutti gli stadi) non supera il 50-60% e rimane ancora decisamente troppo elevata l'incidenza di recidive locali (10-25%; Abulafi e Williams, 1994; Doss, Arbmann *et al.*, 1995).

Su quest'ultimo problema si è dibattuto a lungo fra i sostenitori degli interventi conservativi (*resezione anteriore*) e demolitivi (*resezione addomino-perineale*) in

quanto si attribuiva una grande importanza alla distanza del tumore dal margine di sezione inferiore: una *distal clearance* inferiore a 5 cm veniva giudicata molto rischiosa per la possibilità di diffusione intramurale di cellule neoplastiche e, di conseguenza, l'indicazione alla *resezione anteriore* per neoplasia del retto medio veniva considerata almeno imprudente. Oggi si possono affermare due cose: la diffusione distale del cancro del retto, nell'ambito della parete del viscere, supera solo eccezionalmente i 2 cm (Di Matteo *et al.*, 1991; Miholic *et al.*, 1991); a parità di stadio non esistono sostanziali differenze di risultati tra pazienti trattati con interventi conservativi o demolitivi (Pollet e Nicholls, 1983). Di conseguenza ha preso sempre maggior consistenza l'ipotesi che le recidive locali siano per lo più da considerare come residui neoplastici extraparietali di una *exeresi* chirurgica incompleta (Schardey, 1991). Sulla base di queste osservazioni, negli anni più recenti, la chirurgia del retto è diventata più radicale nel senso che si è rivalutata positivamente l'opportunità se non l'esigenza (già suggerita negli anni '80 da Heald *et al.*, 1982 e da Hojo *et al.*, 1982) di estendere la demolizione alle strutture celluloadipose e linfatiche regionali. In particolare, da un punto di vista tecnico, si è ora concordi nel comprendere nella *resezione* quella struttura (presente in modo evidente nei due terzi superiori e posterolaterali del retto extraperitoneale, che comprende i rami terminali dell'arteria mesenterica inferiore, tessuto cellulare grasso e linfonodi) che va sotto il nome di mesoretto. Tale struttura, delimitata da una fascia propria, è isolabile su «punta di forbici» dalla fascia presacrale e, lateralmente, dalla fascia pelvica e va asportata in blocco con il retto che, in queste resezioni sottomesorettali, sarà sempre sezionato in prossimità del piano dei muscoli elevatori dell'ano. I risultati riportati da Heald (1982; 1986), con percentuale di recidiva locale del 3,7%, hanno trovato conferma da parte di altri AA. più recentemente (Cawthorn *et al.*, 1990; Mc Anena *et al.*, 1990; Di Matteo *et al.*, 1991).

Sempre nell'intento di incrementare la radicalità chirurgica è diventato nuovamente attuale il problema della linfadenectomia pelvica più o meno estesa già sollevato negli anni '80 dalla scuola giapponese. Uno studio recentemente condotto da Mascagni e Di Matteo in collaborazione col National Cancer Center Hospital di Tokio (Mascagni *et al.*, 1992) ha evidenziato la presenza di linfonodi metastatici lungo l'arteria iliaca comune, l'arteria iliaca esterna e l'otturatoria nel 19,9% di 201 pazienti operati per cancro del retto extraperitoneale e, quel che è più interessante, l'80% di questi non aveva segni di ulteriore diffusione linfatica o ematogena.

Questi dati, insieme ai brillanti risultati riferiti da Moriya *et al.* (1989), hanno portato ad estendere la linfadenectomia ai linfonodi pelvici «laterali», specie in corso di neoplasie avanzate (T3) e con *grading* sfavorevole (G3). D'altra parte le linfadenectomie estese comportano una elevata incidenza di complicanze vescico-sessuali (Hojo *et al.*, 1989); la bontà dei risultati da un punto di vista oncologico sta però spingendo attualmente molti chirurghi (Enker, 1992; Di Matteo e Mascagni, 1993; Baba *et al.*, 1994) a riprendere ed a diffondere la tecnica di linfadenectomia «nerve sparing» messa a punto dalla scuola giapponese (Hojo *et al.*, 1989) che consentirebbe di contenere entro termini accettabili le suddette sequele funzionali.

Chirurgia radioimmunoguidata

Sempre in tema di radicalità operatoria, nel 1985 Martin, della Ohio State University, ha messo a punto una nuova tecnica chirurgica definita *Chirurgia radioimmunoguidata* (v. CHIRURGIA RADIOIMMUNOGUIDATA**). Il presupposto è

l'utilizzazione di anticorpi monoclonali (MAbs) contro antigeni tumore associati (TAAs).

La tecnica prevede la somministrazione preoperatoria di un MAb radiomarcato, specifico per la neoplasia sulla quale si deve intervenire e nella quale lo stesso andrà a localizzarsi permettendo così, mediante una sonda manuale in grado di rilevare la radioattività legata al radiofarmaco, di localizzare foci neoplastici non sempre riconoscibili alla vista o al tatto, di valutare più esattamente i margini della neoplasia, del letto tumorale, dopo la sua eradicazione, e le stazioni linfonodali (Kim *et al.*, 1993; Davidson *et al.*, 1991). Nell'esperienza di Martin e del suo gruppo la metodica avrebbe indotto l'equipe chirurgica a modificare il programma originario nel 30% dei casi. In Italia sono decisamente positive le esperienze di Dionigi *et al.*, 1990 e di Badellino *et al.*, 1990.

I principali inconvenienti attribuiti alla metodica sono: il tempo di attesa medio tra la somministrazione del MAb e l'intervento chirurgico (circa tre settimane, necessarie per ottenere la eliminazione del radiofarmaco dal pool ematico e dai tessuti normali), e la bassa sensibilità dei MAbs attualmente in uso (Casciani *et al.*, 1991). Questi problemi, peraltro, sembrano superabili sia con la produzione di nuovi MAbs, eventualmente adoperati in combinazione, sia con l'uso di sostanze che faciliterebbero il legame antigene-anticorpo, accorciando i tempi d'attesa dell'intervento (secondo Stella *et al.*, 1994, l'impiego del sistema avidina-biotina porterebbe ad un decremento della radioattività circolante di oltre il 90% in 3-4 giorni, consentendo di portare il paziente all'intervento chirurgico dopo solo una settimana dalla somministrazione del radiofarmaco).

In conclusione, la chirurgia radioimmunoguidata (v.***) è una metodica già affidabile e suscettibile, per di più, di ulteriori progressi i cui limiti non siamo ancora in grado di definire. Attualmente, comunque, è uno strumento da non trascurare specie nella chirurgia iterativa per recidive loco-regionali (Di Carlo *et al.*, 1994).

Malattie infiammatorie del crasso

Per il trattamento chirurgico del morbo di Crohn e della rettocolite ulcerosa si rimanda alle voci CROHN MORBO DI** e COLITE ULCEROSA**.

Chirurgia laparoscopica del grosso intestino

L'enorme successo ottenuto con la colecistectomia laparoscopica ha spinto i cultori di questa nuova branca della chirurgia a verificarne la possibilità di impiego in campi sempre più numerosi. I primi casi di interventi sul crasso eseguiti con tecnica laparoscopica risalgono al 1991 (Jacobs *et al.*, 1991; Schlinkert, 1992; Fowler e White, 1991) ed attualmente circa il 10% dei cancri del colon vengono trattati con tale metodica (Ota, 1994). Un'oggettiva valutazione di una tecnica così giovane richiede l'esame di tre parametri: 1) la possibilità tecnica di realizzare i più comuni interventi in chirurgia colon-rettale; 2) il controllo del rapporto costo/efficacia; 3) il controllo del rapporto costo/utilità (Detsky e Naglie, 1990).

Per quanto riguarda il primo punto, è ormai dimostrata la possibilità di eseguire per via laparoscopica, con l'aiuto inderogabile delle suturatrici meccaniche, tutti gli interventi della chirurgia tradizionale tranne la resezione anteriore del retto quando il moncone rettale residuo sia più corto di 10-12 cm (non è ancora in produzione, infatti, una *endostapler* equivalente alla sutratrice lineare TA 55 che consentirebbe la sutura del suddetto moncone).

Passiamo a considerare il rapporto costo-efficacia che, per essere favorevole, dovrebbe dimostrare una superiorità della chirurgia laparoscopica su quella tradizionale nei termini di una miglior «cura» della malattia. In realtà su questo punto esistono le maggiori perplessità anche se alcune di esse sembrano destinate ad essere almeno ridimensionate. Sostanzialmente ci si chiede se il nuovo approccio offra la possibilità di eseguire un intervento oncologicamente corretto Cohen e Wexner, 1993; Bleday e Wong,

1993); in realtà mentre si accetta che sia possibile evitare la manipolazione del tumore, tranne che nella fase di estrazione del pezzo operatorio attraverso la laparotomia di servizio (sono segnalati casi di insemenza parietale), e che non esistono particolari problemi nell'ottenere adeguati margini di resezione, permangono notevoli riserve sulla qualità della linfadenectomia (Elftmann *et al.*, 1994) (peraltro alcuni studi condotti allo scopo di chiarire questo problema non dimostrerebbero differenze nel numero di linfonodi asportati rispetto alla tecnica tradizionale) (Phillips *et al.*, 1992; Gray *et al.*, 1994; Vara-Thorbeck *et al.*, 1994).

Il rapporto costo/utilità, infine, riguarda principalmente una analisi propria dei costi: tempo operatorio, degenza postoperatoria, tempi di ripresa dell'attività normale, costi dei materiali, etc. Questi, che dovrebbero essere i punti di forza della chirurgia laparoscopica, allo stato attuale non risultano vantaggiosi con l'evidenza che ci si aspetterebbe; infatti, se è vero che il decorso postoperatorio è sicuramente meno gravoso (minori complicanze per comorbidità, minore dolore postoperatorio, precoce riassunzione di alimenti *per os*, degenza postoperatoria più breve (Vara-Thorbeck *et al.*, 1994; Tate *et al.*, 1993), i costi operatori sono senza dubbio elevati (materiale operatorio, addestramento chirurgico alla nuova metodica; Croce *et al.*, 1993) ed i tempi di intervento restano comunque di gran lunga superiori a quelli della chirurgia tradizionale.

In conclusione la chirurgia laparoscopica del grosso intestino è una nuova metodica ricca di suggestioni e di prospettive, ma allo stato attuale ancora con molti problemi irrisolti (Wexner *et al.*, 1995). Essa rimane in attesa dei risultati di *trial* randomizzati ancora in corso perché si definisca il posto che essa dovrà occupare in un futuro più o meno prossimo rispetto alla chirurgia tradizionale.

V. anche CHIRURGIA LAPAROSCOPICA**, colectomia laparoscopica.

Bibliografia

- Abulafi A. M., Williams N. S., *Br. J. Surg.*, 1994, **81**, 7.
 Arbmann G. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1995, **38**, 645.
 Baba S. *et al.*, *Int. Surg.*, 1994, **79**, 23.
 Badellino F. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1990, vol. **7**, 1.
 Bleday R., Wong W. D., *Curr. Probl. Cancer*, 1993, **17**, 65.
 Casciani C. U. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1991, vol. **1**, 45.
 Cavina E. *et al.*, *Boll. Soc. It. Chir.*, 1985, **6**, 23.
 Cawthorn S. J. *et al.*, *Lancet*, 1990, **335**, 1055.
 Cohen S. M., Wexner S. D., *Surg. Oncol.*, 1993, **2** (Suppl. 1), 35.
 Croce E. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1993, vol. **2**, 113.
 Daneker G. W. *et al.*, *Arch. Surg.*, 1991, **126**, 1348.
 Davidson B. R. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1991, **78**, 664.
 Detsky A. S., Naglie L., *Ann. Int. Med.*, 1990, **113**, 147.
 Di Carlo V. *et al.*, *Surgery*, 1994, **115**, 190.
 Di Matteo G., Mascagni D., *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1993, vol. **2**, 105.
 Di Matteo G. *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 1991, **2**, 35.
 Dionigi R. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1990, vol. **1**, 65.
 Elftmann T. D. *et al.*, *Mayo Clin. Proc.*, 1994, **69**, 825.
 Enker W. E., *Arch. Surg.*, 1992, **127**, 1396.
 Fowler D. L., White S. A., *Surg. Laparosc. Endosc.*, 1991, **1**, 183.
 Gray D. *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 1994, **57**, 8.
 Hardy T. G. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1985, **28**, 484.
 Heald R. J. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1982, **69**, 613.
 Heald R. J., Ryall R. D. H., *Lancet*, 1986, **1**, 1479.
 Hind R. *et al.*, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 1992, **74**, 63.
 Hojo K. *et al.*, *Ann. J. Surg.*, 1982, **144**, 350.
 Hojo K. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1989, **32**, 128.
 Hojo K. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1991, **34**, 532.
 Hulten L., *Chir. Ital.*, 1994, **46**, 1.
 Jacobs M. *et al.*, *Surg. Laparosc. Endosc.*, 1991, **1**, 144.
 John H., Buchmann P., *Int. J. Colorectal Dis.*, 1991, **6**, 193.
 Killingback M., *World J. Surg.*, 1992, **16**, 437.
 Kim J. A. *et al.*, *Oncology*, 1993, **7**, 55.
 Krivokapic Z. *et al.*, *Int. J. Colorectal Dis.*, 1991, **6**, 197.
 Landi F. *et al.*, *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1993, vol. **1**, 83.
 Lazorthes F. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 136.
 Leo E. *et al.*, *Eur. J. Surg. Oncol.*, 1993, **19**, 283.
 Martin D. T. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1985, **150**, 672.
 Mascagni D. *et al.*, *ASCRS. Abstract Book Pb.*, S. Francisco, June 1992.
 Mathus-Vliegen E. M. H., Tytgat G. N. J., *Cancer*, 1986, **57**, 2212.
 Mc Anena O. J. *et al.*, *Surg. Gynecol. and Obstet.*, 1990, **170**, 517.
 Miholic J. *et al.*, *ACA Suppl.*, 1991, **93**, 22.
 Moriya Y. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1989, **32**, 307.
 Nivatvongs S., Wolff B. G., *World J. Surg.*, 1992, **16**, 447.
 Ota D. M., *Int. J. Surg. Sciences*, 1994, **1**, 56.

- Parc R. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 139.
 Pelissier E. P. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1992, **35**, 843.
 Phillips E. H., Franklin M., Carrol B. J. *et al.*, *Ann. Surg.*, 1992, **216**, 703.
 Pollet W. G., Nicholls R. J., *Ann. Surg.*, 1983, **198**, 159.
 Prete F., *Atti Soc. Ital. Chir.*, 1993, vol. 2°, 126.
 Ravo B., Gier R., *Dis. Colon Rectum*, 1985, **28**, 904.
 Schardey H. M., *ACA Suppl.*, 1991, **74**, 873.
 Schlinkert R. T., *Dis. Colon Rectum*, 1992, **35**, 843.
 Serra J. *et al.*, *Int. J. Colorectal Dis.*, 1992, **7**, 21.
 Stella M. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1994, **37**, 335.
 Tate J. J. T. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1993, **80**, 1396.
 Vara-Thorbeck C. *et al.*, *Surg. Laparosc. Endosc.*, 1994, **4**, 110.
 Wexner S. D. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1995, **38**, 723.
 Williams N. S. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1990, **33**, 561.

GAETANO NETRI, EMILIO RUMI E ALESSANDRO MARRA

Trattamento con microchirurgia endoscopica transanale (TEM) delle neoplasie del retto

Introduzione

Il trattamento chirurgico delle neoplasie del retto si avvale sostanzialmente di due tecniche operatorie: l'amputazione addomino-perineale e la resezione anteriore con anastomosi più o meno bassa. Si tratta di interventi codificati e di provata efficacia ma, ancora oggi, gravati da una non trascurabile morbosità e mortalità, specie in pazienti anziani e con patologie associate di rilievo (Colcock e Jarpa, 1958; Braun *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 1980). Per neoplasie del retto medio-basso, inoltre, può non essere evitabile il sacrificio della normale funzione defecatoria e l'istituzione di una colostomia permanente. Questi inconvenienti, peraltro, sono ritenuti il prezzo necessario da pagare per il trattamento del cancro conclamato, mentre vengono meno accettati in presenza di neoplasie benigne o di cancri limitati, specie se la localizzazione medio-bassa rende indispensabile una amputazione addomino-perineale.

Per tali motivi sono state prospettate negli ultimi anni soluzioni più «economiche», quali la radioterapia endocavitaria (Puthawala, 1982; Rich *et al.*, 1985), la criochirurgia (Bown, 1986; Hoenberger, 1986), la laserterapia transanale (Mathus-Wiegen *et al.*, 1991) o una chirurgia escissionale meno invasiva praticata attraverso differenti accessi (transacrale secondo Kraske [Kraske, 1985; Christiansen, 1980], transinterica secondo Mason [Mason, 1974], transanale secondo Parks [Parks e Stuart, 1973]). Peraltro, i trattamenti non chirurgici, sia pure dotati di indiscutibile efficacia, sono stati per lo più considerati nell'ambito della palliazione. D'altra parte le tecniche di escissione locale hanno anche esse dei limiti: le Kraske e le tecniche di Mason sono gravate da considerevole morbosità (10-15%) (Schildberg e Wenk, 1986; Mc Cready *et al.*, 1988), la tecnica di Parks è praticabile solo per le neoplasie situate negli ultimi 8 cm del retto (Nivatvongs e Wolff, 1992) ed è gravata da una incidenza elevata di recidive locali (18%) (Haering *et al.*, 1978; Schiessel *et al.*, 1986).

Pertanto nel 1980 Buess, in Germania, avviò un progetto di ricerca per mettere a punto una metodica alternativa che consentisse un efficace trattamento delle lesioni rettali per le quali la chirurgia maggiore convenzionale poteva essere considerata «sproporzionata». Nel 1983 (Buess *et al.*, 1983) la suddetta metodica fu introdotta nella pratica clinica presso l'università di Colonia con il nome di TEM (*Transanal Endoscopic Microsurgery*).

Strumentario e tecnica

La TEM necessita di un appropriato strumentario che consiste in:
 a) rettoscopio operatore di 12 o 20 cm di lunghezza e 4 cm di diametro, con un sistema di chiusura ermetica dotata di «porte» di accesso con guarnizioni a tenuta d'aria, che consentono l'introduzione dell'ottica e degli strumenti operatori (fino a 4 contemporaneamente).

b) un sistema endoscopico binoculare (Zobel 1993) che consente un ingrandimento sino a 6 volte del campo operatorio, nella quale è contenuto un canale di lavaggio, e che è collegabile ad un *teaching*

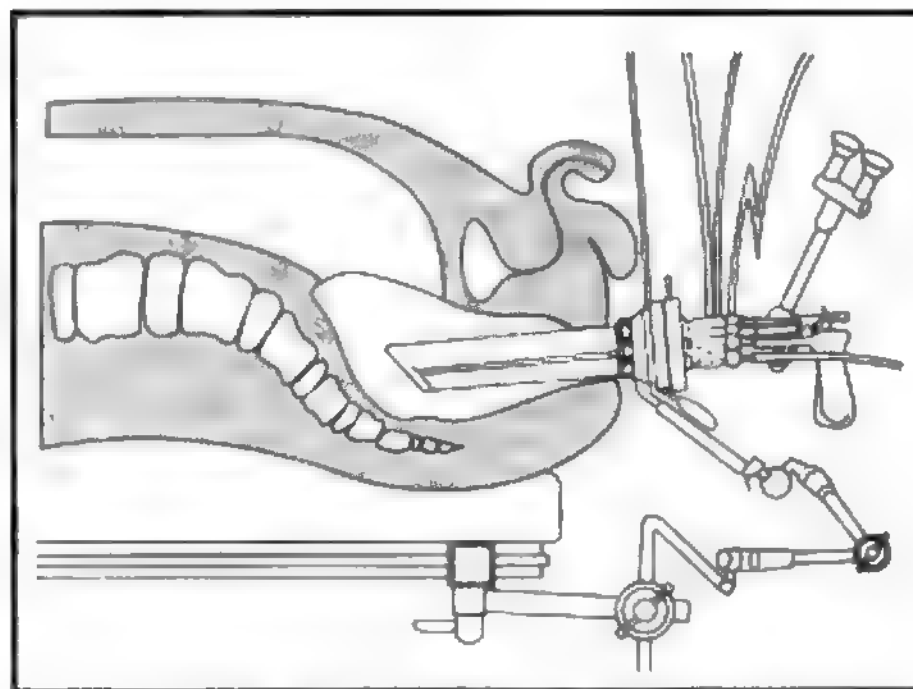


Fig. 8. Equipaggiamento per l'esecuzione della microchirurgia endoscopica transanale (TEM: *Transanal Endoscopic Microsurgery*).

che consente la proiezione delle immagini su di uno schermo video;

c) unità combinata endochirurgica in grado di insufflare CO₂ a pressione controllata, di controllare la pressione endorettale, di aspirare attraverso una pompa a rulli (che consente di aspirare rapidamente i liquidi senza inficiare la distensione gassosa del retto) e di irrigare l'ottica ed il campo operatorio;

d) sistema articolato di sostegno «braccio di Martin» che consente di fissare lo strumento al tavolo operatorio;

e) strumenti, specificamente disegnati, generalmente con estremità angolate che permettono di eseguire pressoché tutte le manovre della chirurgia convenzionale: forbici, pinze da presa, aspiratore, elettrobisturi, portaghi, portaclips. A questo proposito è interessante segnalare la recente introduzione nel mercato di un nuovo strumento elettrochirurgico nel quale sono integrate 4 funzioni: taglio bipolare, coagulazione monopolare, aspirazione ed irrigazione (Farin, 1993; Kanehira *et al.*, 1993).

Con questo equipaggiamento (fig. 8) è possibile ottenere una chiara visione tridimensionale di lesioni del retto fino a 20 cm dall'orifizio anale ed eseguire, dopo un adeguato periodo di addestramento, pressoché tutte le manualità della chirurgia convenzionale ed, in particolare, escissioni di lesioni comprendenti solo la mucosa (fig. 9) o approfondite fino alla muscolare propria (fig. 10) o a tutto spessore (fig. 11) (per il retto laterale e posteriore extra-peritoneale) o anche circonferenziali con ottimale controllo dell'emostasi e con la possibilità di ricostruire il gap tissutale con una sutura intraluminal. Quest'ultima viene eseguita in direzione trasversale, in continua, con un monofilamento 3/0 a lento riassorbimento e fissata alle due estremità non con nodi ma con *clips* d'argento. Alla fine dell'intervento il pezzo operatorio, asportato intero, viene fissato ed orientato prima di essere inviato per uno studio istologico seriato (Buess, 1993; Buess *et al.*, 1992).

Indicazioni

All'inizio della sua esperienza clinica Buess ha riservato la TEM a casi rigidamente selezionati: adenomi a larga base di impianto, con diagnosi certa all'esame istologico, non

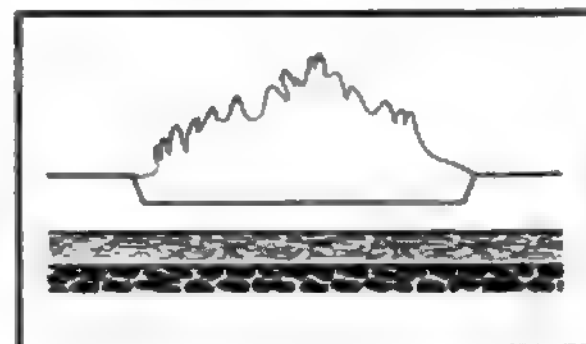


Fig. 9. Rappresentazione schematica dell'escissione limitata alla mucosa.

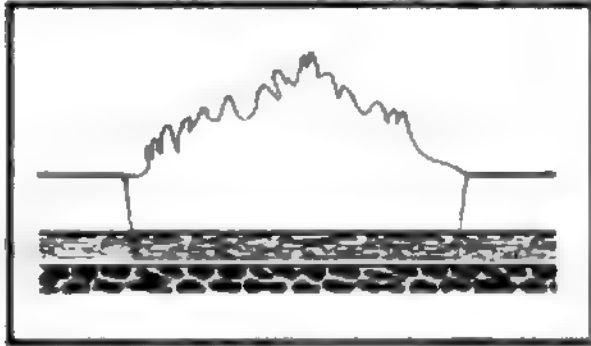


Fig. 10. Rappresentazione schematica di escissione comprendente la muscolare propria.

asportabili con l'ansa diatermica, situati sino a 20 cm dall'orifizio anale ma non troppo vicini allo stesso (la vicinanza della lesione alla regione sfinterica, infatti, ostacola una adeguata distensione locale e, pertanto, viene preferita l'escissione transanale secondo Parks) (Buess *et al.*, 1984). La tecnica era quella della mucosectomia nei piccoli polipi, dell'escissione parziale della parete (comprendente mucosa, sottomucosa e fibre superficiali della muscolare propria) nei grossi polipi localizzati nel retto intraperitoneale, della escissione totale della parete nelle localizzazioni del retto extraperitoneale.

Quando l'esame istologico seriato del pezzo operatorio evidenziava una lesione neoplastica di tipo invasivo veniva di principio eseguito un secondo intervento radicale. Successivamente, avendo constatato che in tutti i casi pT1 sottoposti a radicalizzazione non si era mai trovata neoplasia residua a livello locale né metastatizzazione linfonodale (Buess *et al.*, 1988a), dal 1987 l'indicazione alla TEM è stata estesa ai carcinomi a basso rischio secondo i criteri di Hermanek (Hermanek e Gall, 1986; Morson, 1985; Minsky *et al.*, 1989) (carcinomi bene o moderatamente differenziati con infiltrazione limitata alla sottomucosa), completando l'escissione totale della parete (nelle localizzazioni posteriori) con l'asportazione del grasso perirettale con i relativi linfonodi fino alla fascia di Waldeyer (fig. 12).

Attualmente queste indicazioni sono condivise dalla stragrande maggioranza degli AA. (Lawrence *et al.*, 1989; Buess *et al.*, 1988b; Said *et al.*, 1992; Said *et al.*, 1994; Khanduja *et al.*, 1995; Von Flue e Harder, 1994). Risulta comunque evidente che in questa ottica è fondamentale la valutazione preoperatoria dei pazienti che deve avvalersi di tutti i mezzi disponibili per formulare una diagnosi ed una stadiazione preoperatoria di grande affidabilità; a tale scopo saranno indispensabili una accurata definizione endoscopica della sede e delle dimensioni della lesione, un elevato numero di biopsie, una accurata ecografia transrettale (Mosnier *et al.*, 1990; Buess *et al.*, 1992; Hildebrandt *et al.*, 1994) e, nel caso di sospetto tumore invasivo, una TC addominale e pelvica. Accanto alle suddette indicazioni da considerare ormai codificate, l'affidabilità e la relativa «atraumaticità» della TEM stanno inducendo molti AA. (Buess *et al.*, 1991; Lezoche *et al.*, 1994; Stipa, 1993; Lirici *et al.*, 1994; Minsky *et al.*, 1991; Rosenthal *et al.*, 1992; Marks *et al.*, 1990) ad ampliare il suo campo di applicazione ai tumori pT2 bene o moderatamente differenziati, associata a radioterapia pre e/o postoperatoria, in pazienti a rischio o che rifiutino la

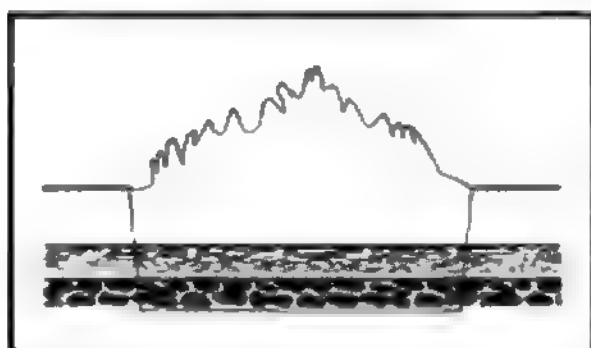
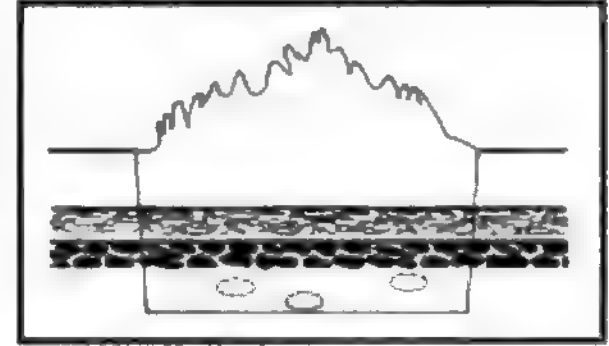


Fig. 11. Rappresentazione schematica di escissione comprendente tutta la parete.

Fig. 12. Rappresentazione schematica di escissione totale della parete estesa al grasso perirettale e ai relativi linfonodi fino alla fascia di Waldeyer.



chirurgia maggiore e, come trattamento palliativo, negli stadi più avanzati.

Risultati

Riportiamo le conclusioni di uno studio molto vasto eseguito in Germania da 57 istituzioni chirurgiche su 1900 casi operati (1411 adenomi e 433 carcinomi) (Salm *et al.*, 1994). Le complicanze si sono presentate in una percentuale del 6,3%. Il problema intraoperatorio più frequente è la perforazione intraperitoneale che avviene in circa il 2% dei casi e che può essere trattata con una sutura intraluminale o attraverso un approccio laparotomico. Le complicanze postoperatorie precoci sono la deiscenza della sutura, specie nei casi in cui la stessa sia stata eseguita sotto tensione dopo ampie escissioni, il sanguinamento, la fistola retto-vaginale, la disuria e l'iperpiressia transitoria. Peraltro solo il 2,3% dei casi complicati hanno richiesto un reintervento.

L'unica complicanza tardiva, comunque piuttosto rara, è un certo grado di stenosi dopo asportazione di neoplasie estese a più del 50% della circonferenza del retto. La mortalità globale risulta pressoché nulla (0,2%). L'incidenza di recidive locali per neoplasie benigne è compresa tra il 2,2% ed il 5% e per le neoplasie maligne pT1 tra il 3,4% ed il 5%.

In definitiva, ad oltre 10 anni dalla sua introduzione nella pratica clinica da parte di Buess, possiamo dire che la TEM si è dimostrata una tecnica valida con scarse complicanze, mortalità pressoché nulla ed eccellenti risultati a distanza quando eseguita da mani esperte e con appropriate indicazioni. Attualmente va considerata, dunque, una valida alternativa alla chirurgia maggiore nelle neoplasie pT1 e come il trattamento di elezione per gli adenomi sessili a larga base di impianto del retto medio-alto, lasciando uno spazio ancora valido alla resezione transanale secondo Parks per le «piccole» neoplasie del retto distale.

Bibliografia

- Bown F. G. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 949.
 Braun J. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1992, **163**, 407.
 Buess G. *et al.*, *Chirurg.*, 1984, **55**, 677.
 Buess G., *J. R. Coll. Surg. Edinb.*, 1993, **38**, 239.
 Buess G. *et al.*, *Surg. Endosc.*, 1988a, **2**, 71.
 Buess G. *et al.*, *Surg. Endosc.*, 1988b, **2**, 245.
 Buess G. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1992, **163**, 63.
 Buess G. *et al.*, *Int. J. Colorectal Dis.*, 1991, **6**, 77.
 Buess G. *et al.*, *Leber Magen Darm*, 1983, **13**, 73.
 Buess G. *et al.*, *Endoscopy*, 1992, **24**, 334.
 Christiansen J., *British J. Surg.*, 1980, **67**, 651.
 Colcock B. P., Jarpa S., *Dis. Colon Rectum*, 1958, **1**, 90.
 Farin G., *Endosc. Surg. Allied Technol.*, 1993, **1**, 97.
 Haering R. *et al.*, *Chirurg.*, 1978, **49**, 265.
 Hermanek P., Gall F. P., *Int. J. Colorectal Dis.*, 1986, **1**, 79.
 Hildebrandt U. *et al.*, *Endoscopy*, 1994, **26**, 810.
 Hoenberger W. *et al.*, *Endoscopy*, 1986, **10**, 47.
 Hughes E. S. R. *et al.*, *British J. Surg.*, 1980, **67**, 49.
 Kanehira E. *et al.*, *Endosc. Surg. Allied Technol.*, 1993, **1**, 102.
 Khanduja K. S., *Surg. Endosc.*, 1995, **9**, 56.
 Kraske P., *Verh. Dtsch. Ges. Chir.*, 1985, **14**, 464.
 Lawrence M. A. *et al.*, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 1989, **3**, 727.
 Lezoche E. *et al.*, *UCP News*, 1994, **1**, 20.
 Lirici M. M. *et al.*, *Endosc. Surg. Allied Technol.*, 1994, **2**, 255.
 Marks G. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1990, **23**, 735.
 Mason A. Y., *Progr. Surg.*, 1974, **13**, 66.

- Mathus-Vliegen F. M. H. *et al.*, *Gastrointestinal Endoscopy*, 1991, 37, 9.
- Mc Cready D. R. *et al.*, *Arch. Surg.*, 1988, 124, 67.
- Minsky B. *et al.*, *Cancer*, 1989, 26, 149.
- Minsky B. D. *et al.*, *Cancer*, 1991, 67, 908.
- Morson B. C., *British J. Surg.*, 1985, 72, S53.
- Mortensen N., Mayer J., *British J. Surg.*, 1995, 82, 435.
- Mosnier H. *et al.*, *Int. J. Colorectal Dis.*, 1990, 5, 90.
- Nivatvongs S., Wolff B. G., *World J. Surg.*, 1992, 16, 447.
- Parks A. G., Stuart A. E., *British J. Surg.*, 1973, 60, 688.
- Puthawala A. A. *et al.*, *Cancer*, 1982, 50, 2631.
- Rich I. A. *et al.*, *Radiology*, 1985, 156, 527.
- Rosenthal S. A. *et al.*, *Cancer*, 1992, 69, 335.
- Said S. *et al.*, *Minerva Chir.*, 1992, 47, 1055.
- Said S. *et al.*, *Ann Chir. Gynaecol.*, 1994, 83, 167.
- Salm R. *et al.*, *Endosc. Surg. Allied Technol.*, 1994, 2, 251.
- Schiessel R. *et al.*, *Chirurg.*, 1986, 57, 773.
- Schildberg F. W., Wenk H., *Chirurg.*, 1986, 57, 779.
- Von Flue M., Harder F., *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1994, 124, 1800.
- Zobel J., *Endosc. Surg. Allied Technol.*, 1993, 1, 324.

GATTANO NTIRI, EMILIO RUMI E ALESSANDRO MARRA

Trattamento dei polipi con il laser per via endoscopica

Introduzione

La sequenza polipo-cancro è ormai comunemente accettata come uno, se non come il principale, dei processi più comuni di cancerogenesi a livello colon-rettale (v. POLIPO E POLIPOSIS [v.; v.*; v.**]). L'asportazione di tutti i polipi adenomatosi sintomatici od incidentali del grosso intestino viene pertanto considerata una forma irrinunciabile di prevenzione secondaria del cancro colon-rettale (Morson, 1984a; Morson, 1984b). La *polipectomia endoscopica* rappresenta la metodica di elezione per ottenere un «clean colon» (Williams, 1986). Tuttavia la *polipectomia con ansa diatermica*, che è di sicura affidabilità nel caso di polipi peduncolati o nel caso di piccoli polipi sessili nei quali è possibile creare uno pseudopeduncolo con una modica trazione, non è altrettanto valida in presenza di polipi sessili o di polipi peduncolati con sospetta cancerizzazione del peduncolo o della mucosa circostante allo stesso. L'alternativa ad una resezione endoscopica difficile («piecemeal resection») o che non garantisca una convincente *clearance* della base dell'adenoma è stata considerata la chirurgia tradizionale (Forde, 1992; Haggit *et al.*, 1985) con tutti i problemi legati alla stessa: morbosità e mortalità operatoria, che assumono una rilevanza particolare in caso di pazienti a rischio per fattori generali, o per età, o in caso di localizzazioni al retto medio-basso che potrebbero richiedere soluzioni chirurgiche, almeno in apparenza, sproporzionate. Per cercare di risolvere i problemi suddetti, accanto a metodiche di chirurgia mininvasiva come la TEM (v. sopra, coll. **2847), da più parti si è cercato di verificare la possibilità e la validità dell'impiego del *laser per via endoscopica* nel trattamento degli adenomi non trattabili in maniera appropriata con la tradizionale resezione con ansa diatermica (Fleisher, 1986; Sanders e Poesl, 1986; Patrice *et al.*, 1987).

Rinviamo alla voce LASER* per quanto concerne i principi, i tipi di laser e gli aspetti biologici e tecnici dell'impiego di tale metodica. In questa sede ricordiamo che il raggio generato da una sorgente laser ha la capacità di interagire con i tessuti biologici, nei quali l'energia luminosa viene trasformata in energia termica di intensità proporzionale alla lunghezza d'onda della radiazione, alla potenza, alla durata di applicazione ed alle caratteristiche ottiche e termiche del tessuto (Fisher, 1985; Buess, 1990; Pellicchia e Antonello, 1992). Il risultato di questa interazione è la produzione di calore a livello del tessuto irradiato con effetti che vanno dall'edema, alla coagulazione, alla vaporizzazione. I trattamenti per altro possono essere programmati sia operando sulla durata di applicazione sia sulla potenza, correlate all'assorbimento che dipende dal colore, proprio del tessuto e dalle caratteristiche dello

stesso (Fruhmorgen *et al.*, 1974). A livello terapeutico e a livello intestinale è possibile realizzare una fotocoagulazione o una vaporizzazione tessutale, senza giungere alla necrosi, che non superi la sottomucosa. Infine, da un punto di vista fisico, la luce laser con lunghezza d'onda compresa tra 0,4 e 2 µm (come quella generata da un Nd-YAG, che è quella impiegata) può essere trasportata attraverso un conduttore ottico flessibile e sufficientemente sottile (Nath *et al.*, 1973; Fruhmorgen *et al.*, 1976), che può essere inserito nel canale operatore di un endoscopio, consentendo così il trattamento di lesioni sia a livello del tubo digerente che dell'apparato tracheo-bronchiale.

Indicazioni

Per quanto riguarda il trattamento laser endoscopico dei polipi del grosso intestino, esiste una pregiudiziale concettuale che fa preferire la classica polipectomia con ansa diatermica: la laserterapia, infatti, essendo una metodica «distruttiva» non consente l'esatta definizione istopatologica della lesione trattata. Per tale motivo le indicazioni a tale tipo di trattamento vanno considerate in maniera restrittiva (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991). Attualmente la laserterapia viene utilmente impiegata, in elezione, come completamento di una polipectomia convenzionale «incompleta» (specie nel caso di voluminosi adenomi villosi), dopo esame istologico seriato dell'adenoma rimosso che esclude la presenza di un cancro invasivo, per distruggere il tessuto residuo e per bonificare il letto dell'adenoma fino alla sottomucosa (Ponti *et al.*, 1993; Bowers, 1983; Sanders e Poesl, 1986). Altre indicazioni elettive sono il trattamento di recidive «non maligne» nel corso di *follow-up* dopo polipectomia (Mathus-Vliegen, 1986a) e la bonifica del moncone rettale di pazienti affetti da poliposi diffusa familiare non cancerizzata, dopo colectomia totale con ileorectostomia (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991). Infine la fotocoagulazione laser può essere impiegata in alternativa ad interventi chirurgici maggiori, anche quando non possa escludersi la presenza di cancerizzazione all'interno dell'adenoma, in pazienti ad alto rischio operatorio o che rifiutino un intervento demolitivo, con validissimi risultati sintomatici (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991; Spinelli e Dal Fante, 1987; Naveau e Chaput, 1991; Braga *et al.*, 1992).

Tecnica

Il trattamento viene eseguito con una sorgente laser a Nd-YAG (80-100 W di potenza erogata). Il raggio viene condotto attraverso una fibra di quarzo flessibile rivestita di teflon, che si adatta al canale operatore dell'endoscopio, raffreddata da un flusso coassiale di CO₂. La fibra viene fatta fuoriuscire per circa 1 cm dall'estremità distale dell'endoscopio e, poiché la luce Nd-YAG è invisibile, l'area da trattare viene visualizzata con un raggio laser pilota di elio-neon rosso. Viene impiegato il metodo «non contact» per cui l'estremità della fibra viene mantenuta ad una distanza di 5-10 mm dalla superficie da trattare. Nelle lesioni di cospicue dimensioni viene erogata una potenza di 80 W con impulsi di 0,5-1 sec. La lunghezza di ciascuna seduta dipende dal volume di tessuto da trattare e dal totale di energia applicata che non dovrebbe superare i 1500 joule a seduta. Il risultato da perseguire è la fotocoagulazione, che si traduce clinicamente in una scolorazione del tessuto che diventa biancastro mentre, nei limiti del possibile, va evitata la vaporizzazione con carbonizzazione. In presenza di lesioni circolari e preferibile aggredire in ciascuna seduta non più del 50% della lesione ed in presenza di tumori villosi estesi anche longitudinalmente per più di 4 cm è preferibile trattare ogni volta non più del 25% della neoplasia. Le sedute vanno distanziate l'una dall'altra di 2-4 settimane, il che consente di rilevare perfettamente i residui di tessuto tumorale: i frammenti neoplastici coagulati si sono distaccati, la conseguente lesione ulcerosa è parzialmente epitelizzata ed è nettamente differenziabile dalle parti residue di adenoma. A completamento dell'eradicazione è opportuno trattare in

un'ultima sessione ultrason 2-4 mm di tessuto circostante (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991; Mathus-Vliegen, 1993).

Complicanze e mortalità

Le complicanze maggiori del trattamento laser dei polipi colon-rettali sono la perforazione, l'emorragia consistente a 7-10 giorni dall'intervento, ascessi pararettali, fistole e stenosi tardive con una incidenza complessiva di circa il 7% (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991; Brunetaud *et al.*, 1985). Le perforazioni intraperitoneali richiedono il trattamento chirurgico ed incidono decisamente nella pur bassa mortalità complessiva (0-2%) (Mathus-Vliegen 1986b; Wodnicki *et al.*, 1988); le emorragie non richiedono che raramente un trattamento aggressivo che consiste in una coagulazione laser generalmente risolutiva. Le stenosi sintomatiche cedono nella maggior parte dei casi ad una o più dilatazioni endoscopiche (Bown *et al.*, 1986).

Le complicanze minori, quali una piccola perdita ematica entro 3 settimane dal trattamento, una iperpiressia transitoria ed una stenosi moderata asintomatica autorisolvibile, hanno una incidenza rilevante (30-35%) (Mathus-Vliegen *et al.*, 1991) ma devono considerarsi alla stregua di una conseguenza ordinaria della fotocoagulazione.

Risultati

Per quanto attiene al risultato locale, in assenza di complicanze maggiori e di recidiva, l'area trattata passa attraverso vari stadi: edema nell'immediato postoperatorio, caduta dell'escara ed ulcerazione dopo 1-2 settimane, guarigione dell'ulcerazione con il residuo di una cicatrice biancastra riconoscibile anche ad anni di distanza peraltro, senza retrazione né stenosi.

Per quanto riguarda i risultati oncologici, essi variano nelle casistiche riportate dai vari AA. in relazione alle indicazioni più o meno estensive poste alla laserterapia. Brunetaud *et al.* (1985), infatti, che si limitano a trattare adenomi del tratto retto-sigmoideo (tecnicamente meglio gestibili) e che escludono quelli estensivi riportano un 19% di recidive. Altri AA. (Patrice *et al.*, 1987; Lambert, 1984; Mathus-Vliegen *et al.*, 1991) che estendono il trattamento a tutto il grosso intestino e comprendono una discreta percentuale di adenomi di grosso volume (30-35%) riportano risultati meno soddisfacenti con recidive in circa il 20-25% dei casi.

Alla luce di questi dati si può concludere che è fondamentale una accurata selezione dei pazienti e delle lesioni da sottoporre a laserterapia: l'indicazione più appropriata è quella per polipi villosi di dimensioni piccole o intermedie con percentuali di guarigione completa a tre anni rispettivamente del 93% ed 85%; per i polipi «estensivi» la percentuale di eradicazione completa non supera il 50-60% per cui il trattamento deve essere considerato palliativo e quindi riservato a pazienti ad elevato rischio operatorio, con risultati comunque sicuramente positivi da un punto di vista sintomatico; infine, per quanto non sia stata ancora diffusamente applicata, la laserterapia sembra essere di grande efficacia nella bonifica del retto residuo dopo ileorectostomia per poliposi familiare, per la caratteristica, già sottolineata, di non generare una reazione fibrotica molto accentuata e di non interferire con una eventuale radicalizzazione chirurgica.

Bibliografia

- Bowers A., *Therapeutic laser endoscopy in gastrointestinal disease*, 1983, M. Nijhoff Publishers, p. 139.
Bown S. G. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1986, **73**, 949.
Braga M. *et al.*, *Riv. It. Colonproct.*, 1992, **11**, 131.
Brunetaud J. M. *et al.*, *Gastroenterology*, 1989, **97**, 272.
Brunetaud J. M. *et al.*, *Gastroenterology*, 1985, **89**, 832.

- Buess G., *Endoskopie*, 1990, Deutscher Artze Verlag GmbH, Köln.
Fisher J. C., *Principles of safety in laser surgery and therapy*, 1985, Appleton-Century Crafts, Norwalk.
Fleisher D., *Gastroenterology*, 1986, **90**, 2024.
Forde K. A., *World. J. Surg.*, 1992, **16**, 1048.
Fruhmorgen P. *et al.*, *Dtsch. Med. Wschr.*, 1976, **101**, 1301.
Fruhmorgen P. *et al.*, *Endoscopy*, 1974, **6**, 116.
Haggit R. C. *et al.*, *Gastroenterology*, 1985, **89**, 328.
Hohenberger W. *et al.*, *Endoscopy*, 1986, **18** (Suppl. 1), 47.
Lambert R., *European laser workshop*, Traunstein, 1984.
Mathus-Vliegen E. M., *Endoscopy*, 1986, **18** (Suppl. 1), 1986, 69.
Mathus-Vliegen E. M., *Endoscopy*, 1993, **25**, 462.
Mathus-Vliegen E. M. *et al.*, *Gastrointest Endosc.*, 1991, **37**, 9.
Mathus-Vliegen E. M. *et al.*, *Ann. Gastroenterol. Hepatol.*, 1986, **19**, 307.
Mathus-Vliegen E. M., Tytgat G. N., *Cancer*, 1986a, **57**, 2212.
Mathus-Vliegen E. M., Tytgat G. N., *Gastroenterology*, 1986b, **90**, 1865.
Morson B. C., *Postgrad. Med. J.*, 1984a, **60**, 820.
Morson B. C., *Clin. Radiol.*, 1984b, **35**, 425.
Nath G. *et al.*, *Endoscopy*, 1973, **5**, 208.
Naveau S., Chaput J. C., *Rev. Prat.*, 1991, **41**, 232.
Patrice T. *et al.*, *Dig. Dis. Sci.*, 1987, **32**, 109.
Pellecchia A., Antonacci R., *Gastroent. End. Dig.*, 1993, **1**, 46.
Ponti V. *et al.*, *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, 1993, **39**, 127.
Puthawala A. A. *et al.*, *Cancer*, 1982, **50**, 2631.
Sanders R., Poed H., *Endoscopy*, 1986, **18** (Suppl. 1), 57.
Spalls K. E., *Phy. Med. Biol.*, 1960, **5**, 139.
Spinelli P., Dal Fante M., *Acta Chir. Italica*, 1987, **1**, 43.
Williams C. B., *Colonoscopy*, 1986, **42**, 265.
Wodnicki H. *et al.*, *Am. Surg.*, 1988, **54**, 227.

GAFIANO NETRI, EMILIO RUMI E ALESSANDRO MARRA

INTESTINO TENUE E CRASSO, TRAPIANTO: V. TRAPIANTI MULTIORGANO**; V. anche FEGATO E VIE BILIARI* (coll. *3169-3170).

INTRONI ED ESONI: V. GENI DISCONTINUI**.

INVALIDITÀ [v. vol. VII, coll. 2443-2444; Agg. I, coll. *3934-3937]

Invalidità civile

La definizione di invalido civile, come dettata dall'art. 2 della legge 30 marzo 1971, n. 118, è stata così ampliata dal decreto legislativo 23 novembre 1988: «Agli effetti della presente legge, si considerano mutilati ed invalidi civili i cittadini affetti da minorazioni congenite o acquisite, anche a carattere progressivo, compresi gli irregolari psichici per oligofrenie di carattere organico o dismetabolico, insufficienze mentali derivanti da difetti sensoriali e funzionali, che abbiano subito una riduzione permanente della capacità lavorativa non inferiore a un terzo o, se minori di anni 18, che abbiano difficoltà persistenti a svolgere i compiti e le funzioni proprie della loro età. Ai soli fini dell'assistenza socio-sanitaria e della concessione dell'indennità di accompagnamento, si considerano mutilati ed invalidi i soggetti ultrasessantacinquenni che abbiano difficoltà persistenti a svolgere i compiti e le funzioni proprie della loro età. Sono esclusi gli invalidi per cause di guerra, di lavoro, di servizio, nonché i ciechi e i sordomuti per i quali provvedono altre leggi».

Strumento per la valutazione delle infermità è la *Tabella indicativa delle percentuali d'invalidità per le minorazioni e malattie invalidanti* (approvata con decreto del Ministro della Sanità del 5 febbraio 1992, in luogo della precedente *Tabella* introdotta con precedente decreto del 25 luglio 1980), che fa riferimento all'incidenza delle infermità stesse sulla capacità lavorativa secondo i criteri dettati dalla normativa vigente ed indica la misura percentuale di riduzione della capacità lavorativa determinata da ciascuna menomazione anatomofunzionale.

La tabella elenca, attribuendo a ciascuna di esse un nu-

mero di codice sulla base della classificazione internazionale redatta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, sia infermità alle quali è attribuita una determinata percentuale, cosiddetta fissa, sia infermità il cui correlato danno funzionale permanente viene riferito a fasce percentuali di perdita della capacità lavorativa, ciascuna delle quali comprende 10 procenti. Per le infermità non tabellate è indicato l'impiego del criterio analogico, ovvero sia l'attribuzione della percentuale prevista per infermità tabellate di pari natura o gravità.

Il danno funzionale permanente è riferito alla capacità lavorativa generica, con possibilità di variazioni in più o in meno rispetto al coefficiente base in misura non superiore a 5 procenti, con riguardo all'incidenza sulle occupazioni confacenti alle attitudini del soggetto (capacità lavorativa «relativa» o, meno correttamente, «semi-specifica») e/o sulla capacità lavorativa specifica.

Ulteriori criteri valutativi sono dettati per le due ipotesi della infermità singola («unica», secondo il decreto) ovvero delle infermità plurime.

Nella prima ipotesi (*infermità singola*) è prevista l'applicazione, in alternativa, di:

a) una percentuale «fissa» di i., quando l'infermità corrisponde, per natura e per grado, esattamente alla voce tabellare;

b) una percentuale di i. ricompresa tra il valore minimo e quello massimo indicati dalla «fascia», qualora si tratti di infermità ricompresa tra quelle elencate in fascia percentuale;

c) una percentuale desunta secondo il citato criterio analogico, se l'infermità non risulta elencata in tabella.

Nella seconda ipotesi (*infermità plurime*), rilevato ovviamente che la valutazione non può farsi per sommazione aritmetica delle percentuali già previste per ciascuna singola infermità, sono previsti procedimenti diversi per il caso che le infermità risultino tra loro in rapporto di concorso ovvero di coesistenza funzionale.

Alla lettera il decreto detta una nozione di «concorso» assai restrittiva, ritenendo in siffatto rapporto soltanto «le menomazioni che interessano lo stesso organo o lo stesso apparato» e, per conseguenza, escludendo il rapporto di concorso qualora si tratti di organi e apparati diversi ma egualmente in rapporto funzionale (per esempio: menomazione della vista e menomazione dell'udito; menomazione dell'organo dell'equilibrio e menomazione dell'apparato della deambulazione). Operata questa discutibile delimitazione del concetto di «concorso», è poi previsto che, qualora la valutazione complessiva non sia già stabilita dalla tabella (ed è questo il caso di numerose menomazioni a carico della funzione visiva, di quella uditiva, delle menomazioni segmentarie a carico degli arti, etc.), essa debba consistere nell'assegnazione di una percentuale proporzionale a quella tariffata per la perdita totale, anatomica o funzionale, dell'organo o dell'apparato.

Sono da considerare in rapporto di coesistenza «le menomazioni che interessano organi ed apparati funzionalmente distinti tra loro». In questi casi, dopo aver effettuato la valutazione percentuale di ciascuna menomazione secondo le indicazioni tabellari, si esegue un *calcolo riduzionistico* mediante la seguente formula espressa in decimali:

$$IT = IP_1 + IP_2 - (IP_1 \times IP_2)$$

dove IT (invalidità totale o complessiva) è eguale alla somma ($IP_1 + IP_2$) delle singole invalidità parziali, diminuita del loro prodotto ($IP_1 \times IP_2$).

Ad es., se la prima menomazione (IP_1) è valutata con il 20% e la seconda (IP_2) con il 15%, il risultato finale (IT) sarà $(0,20 + 0,15) - (0,20 \times 0,15) = 32$ e, quindi, 32%.

Nel caso in cui le menomazioni siano di numero superiore a due, il procedimento dovrà essere reiterato seguendo lo stesso metodo.

Nella valutazione complessiva dell'i. non si dovrà tener conto delle menomazioni tariffate percentualmente tra lo 0% ed il 10%, salvo che non siano in rapporto di concorso tra loro o con altre menomazioni tariffate con percentuale superiore al 10%.

Le competenti Commissioni dovranno, inoltre, esaminare la possibilità dell'applicazione di apparecchi protesici, in quanto le protesi vanno ritenute fattori di attenuazione della gravità del danno funzionale e, pertanto, la loro applicazione può comportare una riduzione della percentuale di invalidità relativa alla menomazione, sempre che esse siano ben tollerate e funzionalmente efficienti con riferimento alla capacità lavorativa generica, relativa e/o specifica.

In sede di visita valutativa, la Commissione ha l'obbligo di verbalizzare in modo tale che risultino i seguenti elementi: i dati anagrafici; la qualifica professionale, le attività lavorative eventualmente svolte in passato o al presente; l'anamnesi familiare, fisiologica, patologica remota e prossima; l'esame obiettivo completo; gli accertamenti di laboratorio e strumentali; la diagnosi clinica, corredata del numero di codice desunto dalla classificazione internazionale sopra citata; la prognosi, con particolare riguardo alla eventuale permanenza della infermità e del danno funzionale correlato; la percentuale assegnata a ciascuna menomazione in base alle indicazioni tabellari e, in caso di menomazioni plurime, la valutazione complessiva; la possibilità di applicazione di protesi e la eventuale variazione della percentuale di invalidità ad essa connessa.

Il verbale va completato con il giudizio motivato sulla ricorrenza dei requisiti per l'attribuzione dell'indennità di accompagnamento ai soggetti aventi diritto e, infine, con la determinazione delle potenzialità lavorative del soggetto.

Strettamente e motivatamente coeva all'approvazione del decreto ministeriale recante la nuova tabella indicativa delle percentuali di invalidità è stata quella della «Legge-quadro per l'assistenza, l'integrazione sociale e i diritti delle persone handicappate» (legge 5 febbraio 1992, n. 104), che ha definito l'handicappato come «colui che presenta una minorazione fisica, psichica o sensoriale, stabilizzata o progressiva, che è causa di difficoltà di apprendimento, di relazione o di integrazione lavorativa e tale da determinare un processo di svantaggio sociale o di emarginazione». Minorazione è qui sinonimo di menomazione e designa un *minus*, rispetto all'integrità anatomofunzionale dell'individuo, concernente indifferentemente la sfera somatica ovvero quella psichica o sensoriale e senza riguardo alcuno all'epoca di insorgenza o alla origine etiologica.

Alla qualifica di «persona handicappata» corrisponde il «diritto alle prestazioni stabilite in suo favore in relazione alla natura e alla consistenza della minorazione, alla capacità complessiva individuale residua e alla efficacia delle terapie riabilitative» e più analiticamente elencate e descritte dalla legge-quadro stessa.

Il riconoscimento della qualifica è demandato a Commissioni mediche, integrate da operatori sociali e da esperti, che hanno sede presso le Unità Sanitarie Locali e fisioterapia analoga a quelle deputate all'accertamento dell'i. civile.

Bibliografia

Gerin C., Antoniotti F., Merli S., *Medicina legale e delle assicurazioni*, 1993, SEU, Roma.
Puccini C., *Istituzioni di medicina legale*, 1993, Ambrosiana, Milano.

NATALE MARIO DI LUCA

SOMMARIO

Indicazioni della ossigenoterapia iperbarica (OTI) (col. 2857): *Malattia da decompressione*. - *Embolia gassosa arteriosa*. - *Intossicazione acuta da monossido di carbonio*. - *Gangrena gassosa*. - *Sindrome da schiacciamento (crush syndrome)*. - *Sordità improvvisa*. - *Radionecrosi*. - *Lesioni gangrenose del piede diabetico*. - *Patologie della Categoria 2*. - **Indicazioni alla terapia iperbarica (TI) con miscela atmosferica o miscela artificiale** (col. 2859): *Malattia da decompressione (MDD)*.

La terapia iperbarica comprende due tecniche di trattamento che si differenziano per i meccanismi d'azione: l'ossigenoterapia iperbarica (OTI) e la terapia iperbarica (TI) con miscela atmosferica o con miscela artificiale.

Indicazioni della ossigenoterapia iperbarica (OTI)

Il razionale terapeutico dell'OTI è rappresentato dalla possibilità di assicurare il fabbisogno metabolico di ossigeno in condizioni di grave compromissione del trasporto emoglobinico dell'O₂. Inoltre, l'incremento del contenuto ematico di ossigeno determina un innalzamento della pressione parziale dell'O₂ a livello tissutale anche in territori ove siano deficitarie le condizioni distrettuali di circolo.

Nel 1994 la S.I.A.A.R.T.I. (Società Italiana di Anestesia Analgesia Rianimazione e Terapia Intensiva) ha pubblicato le raccomandazioni per l'impiego clinico dell'OTI. Le patologie nelle quali l'OTI rappresenta un elemento importante e insostituibile del protocollo terapeutico sono state raggruppate nella Categoria 1 che comprende le patologie seguenti.

Malattia da decompressione

V. sotto, coll. **2859-2860.

Embolia gassosa arteriosa

Nell'attività subacquea o comunque in ambiente iperbarico, lesioni delle strutture alveolocapillari polmonari, spesso secondarie a sovradistensione gassosa per «air trapping», possono determinare l'immissione nel circolo arterioso sistemico di formazioni gassose di tipo bolloso a carattere embolizzante. Una genesi iatrogena dell'embolia gassosa arteriosa è stata descritta nel corso di interventi cardiocirurgici con l'impiego della circolazione extracorporea. L'OTI trova il suo razionale nella possibilità di ridurre, per effetto fisico dell'iperbarismo, il volume degli emboli gassosi e antagonizzare la *noxa* ipossica determinata dalla compromissione distrettuale del circolo.

Intossicazione acuta da monossido di carbonio

Questo gas (CO), che si sviluppa nel corso delle reazioni ossidoriduttive di sostanze carboniose in presenza di un basso tenore di ossigeno (combustione in ambienti poveri di O₂, motori a scoppio, etc.), ha un'affinità per l'emoglobina circa 300 volte maggiore dell'ossigeno. Legandosi ad essa, la rende indisponibile al trasporto dell'O₂ e determina condizioni di ipossia cellulare, aggravata dallo spostamento a sinistra della curva di dissociazione dell'ossi-emoglobina. Il monossido di carbonio si fissa anche alla mioglobina e alla citocromossidasi a₃ mitocondriale con conseguente compromissione dei sistemi cellulari di produzione energetica O₂-dipendenti. L'azione terapeutica dell'OTI è prodotta con i seguenti meccanismi:

- spiazzamento per effetto massa del CO dall'emoglobina, dalla mioglobina e dalla citocromossidasi a₃;
- correzione delle condizioni di ipossia cellulare;
- riduzione del tempo di emivita della carbossiemoglobina,

che si riduce da 320 min in aria a pressione atmosferica a 23 min in O₂ al 100% a 3 atmosfere;

spostamento a destra della curva di dissociazione dell'ossi-emoglobina con migliore utilizzazione cellulare dell'O₂;

riduzione delle condizioni edemigene a livello cerebrale e delle sofferenze neuronali con miglioramento degli esiti e delle sequele neurologiche (cefalea, turbe della memoria, etc.).

Gangrena gassosa

L'evento etiologico iniziale è identificabile con una contaminazione tissutale, spesso traumatica o chirurgica, ad opera di germi anaerobi del genere *Clostridium*. Nell'80% dei casi viene isolato il *Clostridium perfringens*, anaerobio grampositivo, sporigeno, comune saprofita dell'intestino dell'uomo e di molti mammiferi, facilmente rintracciabile negli strati superficiali del terreno.

L'azione patogena locale e sistemica del *Cl. perfringens* si realizza con la produzione di esotossine dotate di attività proteo-glico-lipolitica. La più importante è l'alfa-tossina, una lecitinasi emolitica e necrotizzante. Nel 1960 Boerema e Brummelkamp utilizzarono per la prima volta l'OTI nel trattamento della gangrena gassosa. L'incremento della tensione parziale di ossigeno a livello delle aree gangrenose produce una serie di effetti terapeutici:

innalzamento del potenziale *redox*: questa situazione risulta sfavorevole al metabolismo dei germi anaerobi;

blocco della produzione di alfa-tossina (nessuna azione su quella libera);

produzione di radicali liberi dell'ossigeno (RLO): i germi anaerobi sono sprovvisti di enzimi protettivi per i RLO che hanno su di essi azione battericida;

miglioramento dell'attività battericida dei polimorfonucleati (PMN): nei focolai di infezione batterica associati a condizioni di ipossia distrettuale, la ridotta disponibilità di O₂ può compromettere la normale attività dei PMN; infatti, quando questi svolgono attività fagocitica e battericida presentano un improvviso aumento del consumo di ossigeno (*respiratory burst*);

recupero potenziale di tessuti: quelli delle aree gangrenose non idrolizzati dalle tossine possono risentire positivamente dell'aumentata disponibilità di ossigeno, recuperando condizioni metabolico-trofiche che consentono di ridurre l'estensione delle escissioni e delle amputazioni.

Sindrome da schiacciamento (crush syndrome)

La patologia traumatica degli arti è spesso associata alla sofferenza vascolare distrettuale. Questa può realizzarsi sia per danno diretto dei vasi che per deficit di circolo secondario allo sviluppo di edema in strutture a ridotta *compliance* (sistema muscolo-fascia). Il protocollo terapeutico di questa condizione patologica vede associata l'ossigenoterapia iperbarica alla terapia chirurgica e antibiotica. L'applicazione tempestiva dell'OTI è diretta ad antagonizzare le condizioni di sofferenza compartimentale, essa infatti:

aumenta la tensione parziale di ossigeno nei territori ischemici;

antagonizza le condizioni edemigene distrettuali migliorando la perfusione tissutale;

demarca i tessuti vitali da quelli in necrosi;

previene l'insorgenza di infezioni nelle aree traumatizzate.

Sordità improvvisa

Questa indicazione è stata individuata sulla base delle recenti conoscenze di fisiologia cocleare. Questa struttura dell'orecchio interno richiede una costante ed elevata disponibilità di ossigeno. È stato dimostrato che un'onda di

IPERBARICA TERAPIA

pressione di elevata entità (ad es. colpo di arma da fuoco) può determinare una ipossia severa a livello cocleare, che si manifesta clinicamente con una ipoacusia improvvisa. Questa crisi ipossica cocleare può indurre un danno permanente. L'OTI viene raccomandata a condizione che possa essere praticata precocemente (entro 24 h dal trauma acustico).

Radionecrosi

Nelle lesioni dei tessuti molli o delle strutture ossee secondarie a terapia radiante, l'OTI può indurre neoangiogenesi con miglioramento del trofismo delle aree interessate.

Lesioni gangrenose del piede diabetico

L'OTI può migliorare il trofismo cutaneo e demarcare le aree gangrenose; ha inoltre effetti batteriostatici e battericidi nelle lesioni infette.

Patologie della Categoria 2

La Categoria 2 delle raccomandazioni S.I.A.A.R.T.I. comprende patologie per le quali l'OTI rappresenta un utile complemento terapeutico. Queste sono:

- a) osteomielite cronica refrattaria;
- b) trapianti cutanei con deficit di vascolarizzazione;
- c) insufficienze arteriose periferiche;
- d) osteoporosi post-traumatica (malattia di Sudek);
- e) trombosi dell'arteria o della vena centrale della retina.

A queste si aggiunge l'impiego dell'OTI nella *fascite necrotizzante* (v.**).

Indicazioni della terapia iperbarica (TI) con miscela atmosferica o miscela artificiale

Questa tecnica utilizza gli effetti terapeutici delle alte pressioni ambientali prodotte mediante l'immissione in camera iperbarica o di aria atmosferica deumidificata o di miscele costituite in proporzioni variabili da ossigeno e gas inerti (elio o azoto).

Malattia da decompressione (MDD)

La TI rappresenta un presidio insostituibile nel trattamento della *malattia da decompressione (MDD)*. Questa è una sindrome acuta che si manifesta da pochi minuti sino a 12 ore dopo una depressurizzazione (emersione subacquea) avvenuta in tempi relativamente brevi. Il momento patogenetico è rappresentato dall'inadeguata eliminazione di gas inerte (azoto) accumulato nell'organismo durante la respirazione di aria in ambiente iperbarico. La condizione di sovrassaturazione di azoto nella quale possono venire a trovarsi i tessuti al momento della inadeguata decompressione determina lo sviluppo di nuclei gassosi, che possono divenire formazioni bollose intra-tessutali ed intra-vasali con capacità embolizzante ed attivante la cascata dei fattori della flogosi e della coagulazione (v. SUBACQUEA MEDICINA).

Nonostante i diversi tentativi di classificazione, l'inquadramento clinico più semplice ed utile della MDD è ancora quello proposto dal Golding nel 1960 che comprende:

a) MDD tipo I: caratterizzata dalla prevalenza dei sintomi artromialgici a carico delle grosse articolazioni (*bends*; frequentemente colpita la scapolo-omerale), dalle manifestazioni cutanee (prurito, vasodilatazione, pelle a «buccia d'arancia»), dal senso di malessere generale, o di fatica. La MDD di tipo I è una forma spesso benigna, che adeguatamente trattata non determina sequele od esiti;

b) MDD tipo II: caratterizzata da sintomi neurologici che possono far seguito alla comparsa delle artromialgie e che sono frequentemente rappresentati da parestesie e deficit sensitivo-motori prevalenti negli arti inferiori. A volte viene riferito un dolore a cintura localizzato nella parte

inferiore del torace del tipo «a colpo di frusta». Questa forma di MDD richiede sempre un trattamento iperbarico che se praticato tempestivamente può migliorare la prognosi e ridurre gli esiti neurologici.

La ricompressione terapeutica in camera iperbarica ha il suo razionale nella riduzione del volume dei nuclei gassosi o delle bolle di gas inerte in base alle leggi fisiche dello stato gassoso di Boyle-Mariotte ed Henry. L'effetto terapeutico può essere ricondotto ai seguenti meccanismi:

riduzione del volume delle bolle: la riduzione dell'ostacolo meccanico al flusso ematico migliora la perfusione tissutale;

riduzione della superficie totale delle bolle: si riduce l'area della interfaccia sangue-bolla con riduzione della attivazione dei fattori della flogosi e della coagulazione;

solubilizzazione del gas contenuto nelle bolle: l'innalzamento della pressione ambientale consente la solubilizzazione nei tessuti dell'azoto presente nelle bolle in fase gassosa.

Attualmente vengono utilizzate tabelle per la ricompressione terapeutica che utilizzano:

— esposizione ad ambiente iperbarico pressurizzato con aria o miscela sintetica (N₂ 50% + O₂ 50%; He 60% + O₂ 40%): Van der Aue tables, in *U. S. Navy Diving Manual*, Vol. 1, Revision 3, 15 February 1993;

— somministrazione di ossigeno al 100% a pressione ambientale non superiore alle 2,8 atmosfere (limite tossico per l'OTI): Workman R. D., Goodman M. W., *Minimal recompression oxygen breathing approach to the treatment of the decompression sickness in divers and aviators. Research Report (U. S. Navy Experimental Diving Unit)*, Washington DC, pp. 5-65, 1965; Comex Medical Book, *Treatment of bends with oxygen at high pressure, Aerospace Medicine*, 1986, 39, 1076-1083.

Bibliografia

- Camporesi E. M., Braker A. C., *Hyperbaric Oxygen Therapy, A critical review*, Undersea and Hyperbaric Medical Society, 1991, Bethesda.
- S.I.A.A.R.T.I., *Raccomandazioni per l'impiego dell'ossigenoterapia iperbarica*, Notiziario della Società Italiana di Anestesia Analgesia Rianimazione e Terapia Intensiva, 1994.
- Thom S. T., *Hyperbaric Oxygen Therapy, A committee report*, Undersea and Hyperbaric Medical Society, Bethesda, publication number 30, 1992.
- Tibbles P. M., Edelsberg J. S., *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334 (25), 1642-1648.
- Wattel F., Mathieu D., *Oxygénothérapie hyperbare et réanimation*, Collection d'Anesthésiologie et de Réanimation, 1990, Masson, Paris.

(CORRADO MANNI E CIRO D'ALÒ)

IPEREKPLESSIA EREDITARIA

L'*iperekplessia* (anche *iperexplessia*) *ereditaria*, o *malattia «startle» familiare*, è una patologia del sistema motore geneticamente trasmessa con ereditarietà autosomica dominante. La caratterizzano un'eccessiva reazione da sussulto (*startle* in inglese) e dei fenomeni motori stereotipati. Fu per la prima volta descritta da Kirstein e Silfverskiold nel 1958 (Kirstein e Silfverskiold, 1958). Questi AA. studiarono alcuni componenti di una famiglia che presentavano improvvise e violente cadute precipitate da stress, paura o sorpresa e contrazioni muscolari notturne di tipo mioclonico. Il fenomeno fu interpretato come una forma atipica trasmessa geneticamente di «drop attacks».

Il disturbo è attribuito a un'aumento dell'eccitabilità dei circuiti sensori-motori localizzati nella formazione reticolare troncoencefalica e nel midollo spinale che normalmente danno luogo alla reazione *startle* (Brown *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1992). L'ipereccitabilità neuronale è do-

vuta a un'alterazione dei recettori della glicina con conseguente ridotta trasmissione di segnali rapidi inibitori (Floeter e Hallet, 1993). Il recettore della glicina è un complesso pentamerico costituito da tre subunità alfa 1 e due subunità beta. Ciascuna subunità è formata da una catena polipeptidica che comprende un'ampia porzione extracellulare N-terminale e quattro segmenti transmembrana costituenti un canale per lo ione cloro. La glicina si lega solo alla subunità alfa 1: la subunità beta serve a cementare la coesione tra le alfa 1 (Rajendra e Schofield, 1995). Nei pazienti affetti da i. e. la subunità alfa 1 del recettore presenta la sostituzione di un amminoacido in posizione 271 (leucina o glutamina con arginina; Tijssen *et al.*, 1995). Questo comporta una ridotta affinità del recettore per la glicina. Il gene anomalo è stato identificato nel braccio lungo del cromosoma 5 (Shiang *et al.*, 1993).

I primi segni della malattia sono evidenti nel periodo neonatale. I neonati appaiono irrigiditi in una postura in flessione che può mimare una tetraparesi spastica, spesso con i pugni stretti. La rigidità muscolare, che a volte è così severa da costringere le madri a porre la testa tra le gambe dei lattanti per cambiare il pannolino, si risolve durante il sonno e si attenua progressivamente nei primi mesi di vita. I lattanti colpiti in modo grave sussultano in modo eccessivo per stimoli improvvisi, quali movimenti della culla oppure forti rumori. Quando cominciano a camminare, i bambini presentano riflessi *startle* in seguito a rumori improvvisi o stimolazioni tattili. Il sussulto si accompagna a rigidità muscolare generalizzata, perdita del controllo posturale volontario e caduta a terra con incapacità a eseguire i movimenti protettivi delle braccia. Una volta al suolo, rigidità e controllo del tono muscolare ritornano alla norma. Le cadute spesso provocano ferite alla testa e traumi commotivi. Durante la caduta non vi è mai perdita di coscienza. Quando presente, questa è in relazione a commozione cerebrale. Non vi è neppure perdita di urine e l'incontinenza urinaria, a volte osservata, sembra essere in relazione all'aumento della pressione addominale per contrazione dei muscoli della parete addominale.

Spesso i pazienti presentano violente contrazioni muscolari alle gambe durante la notte e lamentano rigidità muscolare accentuata dal freddo. Frequente è il riscontro di lieve ritardo mentale e riduzione del quoziente intellettivo, segni di sofferenza cerebrale diffusa. Gli individui severamente colpiti hanno un'andatura incerta, a base allargata, con le braccia fisse in flessione al gomito e le spalle leggermente abdotte dovuta a incertezza nella marcia e alla paura di cadere.

All'esame neurologico il segno più tipico è il rapido irrigidimento del collo con retrazione della testa all'atto di picchiare il dorso del naso. I riflessi osteotendinei sono accentuati e si osserva clono e ipertonìa spastica agli arti inferiori (Andermann *et al.*, 1980).

Il decorso della malattia è variabile. I disturbi spesso peggiorano durante l'adolescenza e migliorano in diversa misura con l'età. La morte può verificarsi durante l'infanzia per apnea e arresto cardiorespiratorio dovuto a spasmo dei muscoli della parete toracica, oppure per complicanze di ernie. In età successiva la vita dei pazienti è complicata dalle ricorrenti fratture, soprattutto alla testa, dalle ferite ripetute e dalle commozioni cerebrali.

In una stessa famiglia alcuni componenti possono essere colpiti in modo lieve e presentare unicamente una reazione *startle* per stimoli uditivi, visivi o propriocettivi anche di intensità tale da non provocare alcuna reazione in persone normali. Il fenomeno può essere presente solo durante i periodi di stress emotivo o di malattia. L'esistenza di forme con diversa gravità nella stessa famiglia suggerisce una

espressività variabile del gene responsabile della malattia e rende a volte difficile il riconoscimento di una storia familiare che è indispensabile per la diagnosi (Andermann e Andermann, 1988). In alcuni soggetti il riflesso *startle* può innescare una manifestazione di tipo epilettico, dando luogo a condizioni patologiche diverse dall'i. e. Questo accade di solito in soggetti con segni di sofferenza cerebrale diffusa e deficit neurologici specifici. Nella cosiddetta «sincinesia *startle*» si osserva una contrazione tonica del lato affetto della durata di 5-10 sec. Nella «epilessia *startle*» si assiste a una vera manifestazione epilettica parziale o generalizzata documentata da segni clinici ed elettroencefalografici.

Nella *jumping syndrome* il riflesso *startle* si associa ad altri disturbi neurologici, quali ecolalia, ecoprassia, obbedienza automatica e tics. Questa è una rara malattia, geneticamente trasmessa, con ereditarietà autosomica dominante a espressività variabile.

Nell'i. e. l'attività elettroencefalografica associata al riflesso *startle* è registrata nelle regioni centroparietali dello scalpo e consiste in una punta seguita da una breve *bouffée* di onde lente, quindi da una desincronizzazione dell'attività di fondo della durata di 2-3 sec. Frequente è il riscontro di onde lente diffuse, segni di sofferenza cerebrale dovuta ai traumi cranici ricorrenti. Molti pazienti presentano un abbassamento della soglia convulsiva.

L'attività elettromiografica consiste in scariche isolate o raggruppate da 10 a 20 elementi con una latenza da 10 a 40 msec, con inizio nei muscoli frontali e diffusione ai muscoli delle gambe. In base al numero di unità motorie reclutate l'ampiezza varia da 1 a 10 mV e la durata da 20 a 60 msec. Segue attività elettromiografica di tipo interferenziale, a volte dopo un intervallo di circa 20 msec, di durata da una frazione di secondo a molti secondi. Questi potenziali muscolari sono generalizzati nei gruppi muscolari agonisti ed antagonisti (Andermann e Andermann, 1986).

Nel trattamento dell'i. e. il farmaco di scelta è il clonazepam. Questo sembra ridurre la severità del riflesso *startle* e la frequenza delle cadute e migliorare la rigidità muscolare e la capacità di eseguire movimenti rapidi. Comunque, anche quando vi è una buona risposta alla terapia il riflesso di rapida retrazione della testa persiste e rimane quindi uno dei segni più caratteristici della malattia.

Bibliografia

- Andermann F. *et al.*, *Brain*, 1980, **103**, 985-997.
Andermann F., Andermann E., *Myoclonus*, in *Advances in Neurology*, vol. 43, Fahn S. *et al.* eds., 1986, Raven Press, New York.
Andermann F., Andermann E., *Brain and Development*, 1988, **10**, 214-222.
Brown P. *et al.*, *Brain*, 1991, **114**, 1903-1928.
Floeter M. K., Hallett M., *Nature Genetics*, 1993, **5**, 319-320.
Kirstein L., Silfverskiöld B., *Acta Psychiatr. Scand.*, 1958, **33**, 471.
Matsumoto J. *et al.*, *Ann. Neur.*, 1992, **32**, 41-50.
Rajendra S., Schofield P.R., *TINS*, 1995, **18**, 80-82.
Shiang R. *et al.*, *Nature Genetics*, 1993, **5**, 351-357.
Tijssen M.A. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1995, **52**, 578-582.

GABRIELLA TURANO E ALBERTO PRIORI

IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE [v. vol. VIII, coll. 63-84; Agg. I, coll. *3954-3965]

SOMMARIO

AGGIORNAMENTO IN TEMA DI IPERLIPOPROTEINEMIE E MALATTIE CARDIOVASCOLARI col. 2863

Generalità: profilo lipidico di rischio vascolare (col. 2863): *Colesterolemia e suo significato*. - *Ipertrigliceridemia, lipemia post-prandiale e danno vascolare*. - *Triade lipidica, aterogenesi e livelli lipidici consigliati*. - *Terapia ipolipemizzante, prevenzione e regressione dell'aterosclerosi: implicazioni fisiopatologiche e cliniche* (col. 2865).

NUOVE ACQUISIZIONI SU SIGNIFICATO E PATOGENESI DELLE IPOCOLESTEROLEMIE col. 2868
 Forme acquisite (col. 2868). - Forme familiari (col. 2868).

AGGIORNAMENTO IN TEMA DI IPERLIPOPROTEINEMIE E MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Generalità: profilo lipidico di rischio vascolare

L'incidenza di cardiopatia ischemica varia notevolmente tra popolazioni di diverse aree geografiche in funzione dei livelli medi di colesterolemia; questi ultimi sembrano direttamente correlabili con il consumo alimentare di grassi saturi (v. ACIDI GRASSI**). L'assetto lipidico individuale, determinato da fattori genetici ed ambientali, deriva dalla combinazione in percentuali variabili di diverse classi lipoproteiche. Le lipoproteine a bassa, intermedia e alta densità (rispettivamente LDL, IDL e HDL), quelle a densità molto bassa (VLDL), le beta-VLDL, i *remnant* ed Lp(a), valutate nella pratica clinica mediante l'analisi delle componenti lipidiche e/o apolipoproteiche, hanno mostrato una stretta relazione con la patogenesi dell'aterosclerosi (v. LIPOPROTEINE*; IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE*).

Nel campo genetico e clinico, la mutazione *Arg 3500 Gln* nel gene della apolipoproteina B provoca ipercolesterolemia grave e aumento del rischio di cardiopatia ischemica (Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1998).

Colesterolemia e suo significato

Colesterolo totale, colesterolo-LDL (C-LDL) e apolipoproteina B (Apo B) sono tutti rappresentativi della classe lipoproteica a bassa densità (LDL) cosicché i loro livelli sierici e il significato predittivo sono strettamente correlati. Il dosaggio del colesterolo totale è stato il primo, in ordine di tempo, ad essere utilizzato ed è tuttora diffusissimo ed attuale. Non esistono valori di colesterolo totale a «rischio zero» per quanto concerne la cardiopatia ischemica. L'incidenza della malattia è sufficientemente bassa per valori al di sotto dei 180/200 mg/dl, ma aumenta rapidamente al di sopra di tali limiti. Il dosaggio di Apo B è rappresentativo della quantità circolante di Apo B-100, apolipoproteina quasi esclusivamente presente nelle LDL di cui costituisce il 25% in peso. Il significato predittivo del test è sovrapponibile a quello del dosaggio di colesterolo-LDL, e cioè capace di esprimere i livelli delle proteine «carrier». Il colesterolo-HDL, il colesterolo delle subfrizioni HDL₂ e HDL₃, e l'apolipoproteina A-I (Apo A-I) sono rappresentativi delle lipoproteine ad alta densità (HDL); queste sembrano svolgere nei confronti dell'aterosclerosi un ruolo opposto a quello delle LDL. Il legame tra elevati livelli di HDL e bassa incidenza di aterosclerosi sembra da ricondurre alla attività di rimozione del colesterolo depositato nei tessuti periferici compresa la parete arteriosa. Le HDL sono suddivisibili in più frazioni, delle quali le HDL₂ e le HDL₃ sono le meglio studiate. Le HDL₂ rispetto alle HDL₃ sono particelle di maggiori dimensioni, più ricche in lipidi e a più bassa densità. Le prime sembrano essere la subfrazione più rappresentativa dell'azione antiaterogena delle HDL a livello coronarico ed extra coronarico. Conformemente a questa interpretazione le HDL sono particolarmente elevate nei soggetti a basso rischio vascolare quali le donne in età fertile, i soggetti che svolgono intenso esercizio fisico e gli appartenenti a selezionate famiglie (iperalfalipoproteinemia familiare [v. *396!]) caratterizzate da particolare longevità.

ipertrigliceridemia, iperemia post-prandiale e danno vascolare

I livelli dei trigliceridi circolanti approssimano quelli di VLDL, che a digiuno rappresentano il loro «carrier» prin-

cipale. L'ipertrigliceridemia è stata a lungo considerata come fattore di rischio dipendente di aterosclerosi: la maggior incidenza di malattia, peraltro presente, era riferita al coesistere di altre condizioni spesso associate come obesità, sedentarietà, diabete, bassi valori di C-HDL. Il ruolo autonomo oggi riconosciute potrebbe essere correlato ad una condizione di trombofilia (si associa, infatti, ad un aumento dei livelli di PAI-1, fattore che interferisce con la fibrinolisi [v.*] attraverso una ridotta attivazione del plasminogeno) e all'abnorme accumulo di *remnant* e IDL conseguenza dell'alterato metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi. L'aterogenicità di elevati livelli di chilomicroni e VLDL sembra, inoltre, dovuta all'elevata capacità di assunzione di queste particelle da parte dei macrofagi (precursori delle «cellule schiumose» [*foam cells*]), al potenziale effetto tossico nei confronti dell'endotelio (v.***) e, indirettamente, alla formazione di LDL piccole e dense.

Le LDL si sono infatti dimostrate eterogenee, in differenti condizioni ed individui, quando analizzate tramite ultracentrifugazione in gradiente di densità o attraverso particolari metodiche gel-cromatografiche; le numerose sotto-classi ottenute sono state raggruppate in due profili principali: *pattern A* (LDL più grandi e meno dense) e *pattern B* (LDL piccole e dense) ed in un gruppo intermedio (*pattern C*). Il *pattern B* è stato posto in stretta relazione allo sviluppo di aterosclerosi, essendo stato osservato che quando aumentano i livelli di lipoproteine così costituite, per motivi genetici (ad es., ipertrigliceridemia, diabete) o acquisiti (ad es., obesità addominale), il danno vascolare aumenta in modo sproporzionato ai livelli circolanti di LDL totali.

Il metabolismo dei trigliceridi non è tuttavia sufficientemente caratterizzato da una misurazione «statica» a digiuno (che d'altronde rappresenta una situazione fisiologica dell'organismo, più frequentemente sottoposto al carico lipidico conseguente ai pasti assunti). Una associazione tra «lipemia post-prandiale» e coronaropatia, inizialmente osservata da numerosi gruppi di ricerca negli anni '50-'60, è stata più recentemente confermata da importanti studi. Secondo un'ipotesi (*ipotesi di Zilverman*) i chilomicroni ed i loro *remnant*, qualora arricchiti in colesterolo dietetico, possiedono la capacità di depositarlo a livello della parete arteriosa e risultano aterogeni in ogni soggetto; una seconda teoria (*ipotesi dell'intolleranza ai trigliceridi*) ritiene che lo stato post-prandiale rappresenti una fase critica, in grado di svelare un'alterazione del trasporto dei trigliceridi e del metabolismo delle lipoproteine che li veicolano; è anche possibile che una difettosa rimozione delle lipoproteine postprandiali ricche in trigliceridi determini modificazioni qualitative e quantitative di altre popolazioni lipoproteiche (LDL, HDL) dirette responsabili del danno vascolare.

Tra i fattori che regolano il metabolismo di chilomicroni e VLDL possono essere individuate alcune attività enzimatiche, in particolare gli enzimi lipasi lipoproteica (LPL, responsabile del metabolismo iniziale delle lipoproteine ricche in trigliceridi) e le proteine di scambio degli esteri di colesterolo (CETP [*Cholesterol Ester Transfer Protein*; v. LIPOPROTEINE*, col. *4680], responsabili dell'arricchimento in colesterolo esterificato delle lipoproteine ricche in trigliceridi e della formazione di LDL piccole e dense nei soggetti ipertrigliceridici). La rimozione tramite recettore può rappresentare un secondo importante determinante metabolico: il ruolo di questo meccanismo è stato oggi ridefinito. Un nuovo significato si è attribuito all'enzima LPL, il cui deficit omozigote è responsabile di iperchilomicronemia familiare (iperlipoproteinemia fenotipo I) e allo stato eterozigote risulta una frequente causa di ipertrigliceridemia fa-

miliare, come recentemente dimostrato. Vi sono indicazioni che l'LPL, presente a livello dell'endotelio capillare, si attacchi alle lipoproteine ricche in trigliceridi e agisca come ligando facilitandone l'endocitosi a livello epatocitario, dopo interazione con una proteina correlata al recettore LDL (LRP [*LDL-Receptor Related Protein*]). Un ulteriore recettore responsabile del catabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi è stato definito recettore VLDL ed appare particolarmente rappresentato nei tessuti muscolare ed adiposo. Infine, fattori endocrini, in particolare l'insulina, possono modulare livelli e composizione di tutte queste lipoproteine.

Triade lipidica, aterogenesi e livelli lipidici consigliati

L'importanza della «triade lipidica» (bassi livelli di colesterolo HDL ed elevati livelli di colesterolo LDL e trigliceridi) è stata sottolineata dalle «linee guida» recentemente proposte dalla Società Europea dell'Aterosclerosi. Esse sostengono che, ai fini dell'individuazione dei soggetti a rischio vascolare, è necessaria una valutazione integrata e ripetuta dei singoli fattori lipidici. Vengono indicati dei livelli auspicabili, oltre i quali proporre l'intervento dietetico o farmacologico. Tuttavia, tali parametri non appaiono fissi ma dipendono dalla presenza di altri fattori di rischio, tra cui alcuni modificabili (ipertensione, fumo, diabete mellito, obesità, iperfibrinogenemia) e altri non modificabili (anamnesi familiare o personale per malattie cardiovascolari, sesso maschile). In tab. I vengono riassunti questi criteri. Appare evidente lo scopo di attribuire un valore critico al concetto di iperlipemia, il cui significato è funzione del rischio vascolare complessivo.

Terapia ipolipemizzante, prevenzione e regressione dell'aterosclerosi: implicazioni fisiopatologiche e cliniche

La maggior parte dei pazienti che presentano aterosclerosi precoce non sono affetti da iperlipemie gravi: piuttosto manifestano aumenti di grado moderato di colesterolo LDL e trigliceridi o una riduzione di colesterolo HDL. Numerosi studi clinici controllati hanno valutato l'effetto di varie terapie ipolipemizzanti sul profilo dei lipidi plasmatici in que-

sti stessi soggetti, correlandone le modificazioni all'entità delle lesioni vascolari e alle caratteristiche degli eventi clinici. Negli anni '60 e '70 apparvero i primi *trial* sull'incidenza di infarto miocardico in soggetti dislipidemici trattati farmacologicamente. In tale periodo i farmaci disponibili erano scarsamente efficaci ed i gruppi studiati piuttosto esigui: i risultati apparvero complessivamente favorevoli ma non sempre in modo significativo. In seguito, l'ampliamento del concetto di iperlipemia ha consentito l'esame di ampi sottogruppi di popolazione. Tra gli studi di prevenzione primaria, lo studio delle *Lipid Clinics* e quello di Helsinki hanno indotto a considerare positivamente l'uso di colestiramina e gemfibrozil (v. IPOCOLESTEROLEMICI FARMACI, VIII, 318; *4053) nei soggetti dislipidemici. Nei due recenti *trial*: «Scandinavian Simvastatin Survival Study» (1994) e «West of Scotland Coronary Prevention Study» (1995), la somministrazione rispettivamente di simvastatina e pravastatina (v. *4059) ad oltre 11.000 soggetti ha fatto osservare una significativa diminuzione dei casi di infarto miocardico e mortalità cardiovascolare rispetto ai soggetti non trattati, sia negli individui asintomatici (prevenzione primaria, con riduzione di circa il 30%) che nei pazienti già affetti da cardiopatia ischemica (prevenzione secondaria, con riduzione del 35-40%).

Lo studio del «National Heart, Lung and Blood Institute» (NHLBI Type II, 1984) è stato il primo a stabilire la fattibilità di *trial* con controllo coronarografico, randomizzati ed a doppio cieco. In esso soggetti ipercolesterolemici furono seguiti per 5 anni durante trattamento con placebo o colestiramina; venne evidenziata una ridotta progressione delle lesioni nei pazienti in terapia ipolipemizzante ma non chiari segni di regressione.

Successive indagini hanno consentito di documentare anche la regressione terapeutica di lesioni ateromatose già presenti. Tra queste indagini una particolare menzione meritano gli studi CLAS («Cholesterol-Lowering Atherosclerosis Study», 1987 e 1990; in pazienti già sottoposti a *bypass* aorto-coronarico ed in terapia con colestipol e acido nicotico [v. *4053]), FATS («Familial Atherosclerosis Treatment Study», 1990; in soggetti con elevati livelli di

TAB. I. LINEE GUIDA DELLA SOCIETÀ EUROPEA DELL'ATEROSCLEROSI SU RISCHIO CORONARICO E LIVELLI LIPIDICI AUSPICABILI

Rischio coronarico	Colesterolo totale (mg/dl)	Colesterolo HDL (mg/dl)	Altro	Livelli desiderabili	
				Col. tot.	LDL-Col.
Lieve	200-300	> 58-61*	Assenza di altri F.R. non lipidici	195-230	155-175
Moderato	200-300	< 39-46 (donna)** < 31-39 (uomo)**	Assenza di altri F.R. non lipidici	195	135-155
	200-300	> 39-46 (donna)** > 31-39 (uomo)**	+ Altro F.R. non lipidico		
Elevato	...	...	+ CHD opp. PAD opp. iperlipemia familiare	175-195	115-135
	> 300	...	Assenza di altri F.R. non lipidici		
	200-300	...	+ Altro F.R. non lipidico grave		
	200-300	< 39-46 (donna)** < 31-39 (uomo)**	+ Altro F.R. non lipidico		
	200-300	...	+ Altri 2 F.R. non lipidici		

Legenda: F.R. (Fattori di Rischio) non lipidici: fumo, ipertensione, diabete, obesità, iperfibrinogenemia, sesso maschile, menopausa, storia familiare o personale di malattie cardiovascolari

* valori per cui il rischio coronarico è particolarmente lieve

** sono indicati 2 indicatori di rischio cardiovascolare (elevato e particolarmente elevato)

Trigliceridi: consigliati livelli < 200 mg/dl. Rapporto Col. Tot./HDL-Col. consigliato valore < 5

CHD = Coronary Heart Disease

PAD = Peripheral Artery Disease

apolipoproteina B e familiarità per malattia coronarica ed in terapia con colestipol, niacina, lovastatina) e POSCH («Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias», 1990; in pazienti ipercolesterolemici sopravvissuti ad un infarto miocardico e sottoposti a *by-pass* ileale volto ad indurre malassorbimento lipidico). D'altra parte, ulteriori studi condotti utilizzando inibitori dell'enzima HMG-CoA reduttasi (v. *4059) in soggetti ipercolesterolemici e con lesioni coronariche diffuse («Monitored Atherosclerosis Regression Study», MARS, 1993; «Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial», CCAIT, 1994; «Regression Growth Evaluation Statin Study», 1995) hanno evidenziato, accanto ad un minor numero di eventi cardiovascolari, una ridotta evolutività delle placche aterosclerotiche già instaurate ma non una loro significativa regressione. Va sottolineato che la modificazione delle stenosi arteriose ottenuta con provvedimenti dietetici e farmacologici appare minima rispetto al gruppo di controllo (spesso inferiore all'1-2%) e dunque solo parzialmente in grado di giustificare la documentata riduzione di mortalità e morbilità cardiovascolare osservata nei diversi trial.

Un concetto che è stato proposto per giustificare tale apparente contraddizione è quello di «stabilizzazione della placca». Le placche arteriose «soft», ricche in lipidi, appaiono più vulnerabili e suscettibili alla rottura rispetto alle placche «hard», ricche in collagene; la rottura della placca sembra responsabile della maggioranza degli eventi cardiovascolari in rapporto a trombosi. I componenti della placca associati alla vulnerabilità di quest'ultima (lipidi amorfi e macrofagi infarciti degli stessi) appaiono fortunatamente più facilmente mobilizzabili e responsivi alla terapia rispetto ad altri componenti (collagene, cristalli di colesterolo, miocellule). Di conseguenza la terapia ipolipemizzante può determinare una «modulazione» della placca, rimuovendone le componenti a rischio e stabilizzandola ancor prima di causare una sua significativa regressione.

In questo quadro che può essere definito «statico», si inseriscono vari elementi «dinamici» che sono stati identificati negli ultimi anni: in soggetti sottoposti a cateterismo cardiaco, l'infusione intracoronarica di acetilcolina, farmaco agonista dell'EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*), ad azione vasodilatante (v. VASCOLARI VASOATTIVI FATTORI [v.*; v.**]; v. anche: ENDOTELIO**), determina rilasciamento delle arterie coronarie angiograficamente indenni e una «costrizione paradossa» di quelle con lesioni aterosclerotiche ma anche delle coronarie indenni, o con minime alterazioni, di soggetti ipercolesterolemici. L'effetto in questione riflette probabilmente i ridotti livelli di EDRF sintetizzati dall'endotelio sovrastante i vasi alterati, ed una costrizione diretta incontrastata dell'acetilcolina sulle cellule muscolari lisce vascolari.

Se dunque ipercolesterolemia e aterosclerosi coronarica sono caratterizzate anche da una anomalia della funzione vasomotoria endoteliale, la terapia ipolipemizzante si propone sia di diminuire il contenuto lipidico della placca, contribuendo perciò a ridurne le dimensioni e a stabilizzarla, sia di ripristinare una corretta funzionalità endoteliale con ciò diminuendo il rischio di una sua rottura.

Nei vari studi condotti con terapia ipolipemizzante può darsi che si sia osservato stabilire se un quadro morfologico e fisiologico di «costrizione» o di «relasciamento» di una repressione «statica» della placca o di un rilasciamento vascolare dinamico, o di ripristinata funzione di quest'ultimo, entrambe le cose, o che sembrano concorrere a stabilizzare la probabile instaurata eventi ischemici.

NUOVE ACQUISIZIONI SU SIGNIFICATO E PATOGENESI DELLE IPOCOLESTEROLEMIE

Forme acquisite

È difficile determinare parametri di normalità per i valori di colesterolemia, anche verso il basso: esistono comunque dei livelli inferiori convenzionalmente posti al 5° percentile della curva di distribuzione. Vi è una variabilità legata all'età e alla popolazione di appartenenza: la colesterolemia sale rapidamente dopo la nascita, da circa 70 mg/dl (neonato) a oltre 130-140 mg/dl (bambino). Questi ultimi valori possono essere considerati, ad esempio, la soglia di «ipocolesterolemia» della popolazione adulta italiana. Bassi livelli possono anche essere in rapporto a condizioni o malattie genetiche. Tuttavia, una riduzione isolata del colesterolo totale non determina necessariamente delle conseguenze cliniche: concentrazioni plasmatiche intorno ai 50 mg/dl sembrano, infatti, sufficienti al metabolismo dei tessuti periferici. Alcuni grandi trial farmacologici sopra menzionati (studio di Helsinki e delle *Lipid Clinics*) ed altre indagini epidemiologiche osservazionali hanno tuttavia suscitato il problema se una riduzione della colesterolemia, o comunque bassi livelli della stessa, si associassero ad un aumento della mortalità nonvascolare, in particolar modo in rapporto a suicidi o incidenti ma anche ad altre patologie (soprattutto neoplasie e patologie gastroenteriche e respiratorie croniche). Un'accreciuta mortalità per neoplasia (ad es., del colon) è riscontrabile solo in alcuni studi e nel periodo immediatamente successivo alla rilevazione: essa perciò sembra attribuibile ad una riduzione della colesterolemia indotta dalla neoplasia in fase preclinica e non viceversa. Analoghe conclusioni possono essere raggiunte per altre patologie croniche.

Un lieve aumento del numero di suicidi e morti accidentali, nei sottogruppi di soggetti con più bassi livelli di colesterolo, sembra proporre un'associazione con la depressione, principale condizione psichiatrica predisponente. È stato difatti documentato un rapporto tra depressione e ipocolesterolemia, ed anche in tal caso appaiono possibili due spiegazioni: o bassi livelli di colesterolo causano depressione (e pertanto suicidi e/o condotte parasuicidarie e morti «accidentali») o essi sono una conseguenza della depressione. Quest'ultimo sembra il caso: indicazioni a sostegno derivano dal noto rapporto di ipo- o anoressia associate alla depressione (effetto alimentare) e dall'osservazione che la terapia dei disturbi dell'umore comporta un aumento della colesterolemia. In modo simile, anche l'alcolismo si associa a depressione e disturbi mentali, risultando causa diretta di suicidio o incidenti, nonché di epatopatie croniche e, conseguentemente, di ridotti livelli lipoproteici. I più recenti studi di intervento con farmaci ipocolesterolemizzanti, in cui maggiore rispetto al passato è stato il decremento dei livelli lipidici plasmatici e più elevata la numerosità, non hanno confermato l'aumento del numero di suicidi nei soggetti trattati, in cui è di converso risultata ridotta la mortalità totale.

Forme familiari

Nell'ambito delle forme ereditarie delle ipocolesterolemie sono stati recentemente chiariti alcuni aspetti patogenetici ed individuata una nuova forma.

L'*abetalipoproteinemia* (malattia di Bassen e Kornzweig) è una malattia rara con trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da alterazioni ematologiche, neurologiche e malassorbimento (v. IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE*). Le lipoproteine contenenti apo B (sia Apo B-48 che Apo B-100), e cioè VLDL, LDL e chilomicroni, sono indosabili, mentre a livello circolante sono presenti HDL

TAB. II. ESEMPI DI FORME TRONCHE DI APO B IN CORSO DI IPOBETALIPOPROTEINEMIA FAMILIARE

Forma tronca*	N. aminoacidi (aa.)	Lipoproteine in circolo contenenti apo B	Osservazioni
Apo B-2	proteina assente	nessuna	solo eterozigoti
Apo B-25	1085 aa.	nessuna	paziente omozigote
Apo B-52	2361 aa.	(Chilomicr.), VLDL, LDL	solo eterozigoti
Apo B-82	3733 aa.	(Chilomicr.), VLDL (IDL)	solo eterozigoti
Apo B-89	4039 aa.	(Chilomicr.), VLDL, LDL	eterozigote composito

* Le forme tronche sono definite da un numero che esprime il p. m. percentuale della lipoproteina anomala rispetto alla forma comune di 4536 aa.

anomale e altre lipoproteine contenenti Apo A-I. Il gene di Apo B è strutturalmente integro e normalmente tradotto nel nucleo di epatociti ed enterociti in mRNA specifico. È stata dimostrata l'anomalia di una proteina chiamata MTP (*Microsomal Triglyceride-Transfer Protein*), responsabile del trasporto lipidico attraverso le membrane delle cellule epatiche ed intestinali. La malattia è causata da una mutazione del gene codificante per una subunità della MTP, cui consegue una difettosa associazione intracellulare dei lipidi con Apo B e dunque la mancata secrezione di VLDL e chilomicroni.

La *ipobetalipoproteinemia* è una entità nosologica differente, ad ereditarietà autosomica dominante. Attualmente l'individuazione di numerose famiglie con tale malattia ha consentito di approfondire le conoscenze su questa forma. In tutti i casi è stata evidenziata una mancata sintesi di Apo B o, in alternativa, la sintesi di forme tronche funzionalmente deficitarie. Sono circa 30 le mutazioni descritte: in tab. II sono riportati alcuni significativi esempi. Le alterazioni della sequenza del DNA che causano una precoce interruzione della catena aminoacidica determinano la mancata produzione di Apo B funzionalmente attiva, e precludono la sintesi delle lipoproteine vettrici. Difetti che consentono la formazione di frammenti maggiori di Apo B mostrano un'alterazione variabile del profilo lipoproteico circolante. Se la mutazione consente la sintesi di Apo B-48, i chilomicroni possono formarsi normalmente mentre le lipoproteine contenenti Apo B-100 possiedono caratteristiche anomale e sono presenti nel plasma in concentrazione ridotta, a causa di una diminuita secrezione di VLDL.

La *sindrome di Smith-Lemli-Opitz* è una malattia autosomica recessiva (con prevalenza tra 1:20.000 e 1:40.000 nati, tra le più frequenti anomalie congenite nella popolazione di origine europea) caratterizzata da microcefalia, ipostaturismo, *facies* dismorfica, anomalie degli arti, urogenitali, endocrine, cardiache e ritardo mentale. Recentemente è stato riconosciuto che nel corso di tale sindrome sono presenti livelli estremamente bassi di colesterolo plasmatico ed accumulo di uno steroide precursore (7-deidrocolesterolo). È stato proposto che tale deficit sia in rapporto ad un difetto dell'enzima 3β -idrossisterolo $\Delta 7$ -reduttasi. In questa condizione, come nel corso di ipobetalipoproteinemia (omozigote) o abetalipoproteinemia, i disturbi a carico del sistema nervoso e di altri organi sarebbero da ricondurre ad un insufficiente apporto di colesterolo e di vitamine liposolubili (V. SMITH-LEMELI-OPITZ, SINDROME DI**).

Bibliografia

- Farmer J. A., Gotto A. M., *Dyslipidemia and Other Risk Factors for Coronary Artery Disease*, in Branwald E., *Heart Disease*, 1997, Saunders, Philadelphia, pp. 1126-1147.
 Gabelli C., *Curr Opin Lipidol*, 1992, 3, 208-214.
 La Rosa J. C., *Am. J. Cardiol*, 1993, 72, 776-786.

- Law M. R., Thompson S. G., Wald N. J., *Br. Med. J.*, 1994, 308, 373-379.
 Miesenböck G., Patsch J. R., *Curr. Opin. Lipidol*, 1992, 3, 196-201.
 Prevention of coronary heart disease. Scientific background and clinical guidelines 1993. Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. *Current Medical Literature*, 1993, London.
 Pyörälä K., De Backer G., Graham I. et al., *Eur. Heart J.*, 1994, 15, 1300-1331.
 Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, *Lancet*, 1994, 344, 1383-1389.
 Shepherd J., Stuart M., Cobbe S. M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 1301-1307.
 Tybjaer-Hansen A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338 (22), 1565-1571.
 Wetterau J. R., Aggerbeck L. P., Bouna M. E. et al., *Science*, 1992, 258, 999-1001.

RINATO FELLIN E GIOVANNI BATTISTA VIGNA

IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO [v. vol. VIII, coll. 105-127; Agg. I, coll. *3966-3969]

SOMMARIO

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO O PRIMITIVO col. 2870

Frequenza della malattia (col. 2870). - **Etiologia** (col. 2871). - **Diagnosi** (col. 2871). - **Terapia** (col. 2871).

IPOPARATIROIDISMO col. 2872

Classificazione e patogenesi (col. 2872): *Ipoparatiroidismo postchirurgico*. - *Ipoparatiroidismo idiopatico*. - *Ipoparatiroidismo associato a ipomagnesemia*. - *Ipoparatiroidismo da secrezione di PTH biologicamente inattivo*. - *Ipoparatiroidismo da altre cause*. - *Pseudoparatiroidismo*. - **Diagnosi** (col. 2874). - **Terapia** (col. 2875)

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO O PRIMITIVO

Frequenza della malattia

L'iperparatiroidismo primario, ritenuto un tempo patologia rara, è attualmente il terzo disordine ghiandolare più comunemente diagnosticato ed è la malattia più frequente delle ghiandole paratiroidi.

Nelle indagini di massa l'iperparatiroidismo ipercalcemico si rileva con un'incidenza di circa 1 a 1000 individui (anche maggiore, secondo altri rilievi, fino ad 1 a 400). L'incidenza è più elevata nell'età media, tra i 40 e i 60 anni, nelle donne rispetto agli uomini e nelle donne in menopausa rispetto a quelle fertili. La malattia è particolarmente frequente nell'anziano con una prevalenza stimata nelle donne nel sesto decennio di vita di almeno 1,8%.

Studi recenti hanno dimostrato che gran parte degli iperparatiroidi, circa il 40-60%, non presenta sintomi clinici rilevabili (*iperparatiroidismo biochimico asintomatico*): le indagini di follow-up indicano che buona parte di questi pazienti non va incontro ad una progressione della malattia. Pertanto, in relazione alla storia naturale relativamente benigna della patologia, esistono notevoli controversie riguardo al reale beneficio che questo gruppo di malati possa trarre dall'intervento chirurgico e a quali di essi debbano essere riservata la paratiroidectomia.

Etiologia

L'iperincretione di ormone paratiroideo (PTH = *Parathyroid Hormone*) è sostenuta nella maggior parte dei casi da un adenoma singolo, nel 15% dall'iperplasia di tutte le paratiroidi e raramente dal carcinoma paratiroideo. L'iperplasia può essere sporadica o frequentemente associata ad altre endocrinopatie su base ereditaria (MEN = *Multiple Endocrine Neoplasias* [v. NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE**]).

Studi recenti di biologia molecolare hanno chiaramente dimostrato l'origine monoclonale non solo dell'adenoma paratiroideo, ma anche della maggior parte dei casi sostenuti dall'iperplasia ghiandolare, sia isolata che associata a MEN; è stato inoltre dimostrato il coinvolgimento di specifiche mutazioni genomiche nella patogenesi della crescita cellulare neoplastica. Sono state, infatti, recentemente identificate delle anomalie strutturali all'interno del gene del PTH che interessano una regione del braccio lungo del cromosoma 11, banda q13; il riarrangiamento anomalo comporterebbe la formazione di un prodotto genico denominato *PRAD1*, un oncogene la cui attivazione sarebbe associata allo sviluppo di tumori paratiroidi. Il gene *PRAD1* codifica per una proteina, detta *ciclina D1*, che avrebbe un ruolo cruciale nel controllo e nella regolazione del ciclo cellulare e che, se superespressa o mutata, contribuirebbe all'abnorme replicazione cellulare tipica del fenotipo neoplastico. Sempre sul braccio lungo del cromosoma 11 sarebbe stato identificato il gene mutante responsabile della MEN di tipo 1; tale acquisizione è estremamente importante qualora si consideri la possibilità di identificare nell'ambito delle famiglie affette gli individui portatori del gene mutante, e quindi ad alto rischio di sviluppare la malattia, rispetto a quelli non portatori.

Infine, i tumori paratiroidi presenti nei pazienti con MEN di tipo 2 sarebbero associati nel 90% dei casi ad una mutazione puntiforme del protooncogene *RET* (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**) che codifica per un recettore transmembrana ad attività tirosinchinasica.

Diagnosi

A quanto già riferito nei precedenti articoli (v. VIII, 105; *3966), è opportuno aggiungere che per il dosaggio del PTH, oltre ai metodi immunoradiometrici, sono attualmente disponibili anche i *metodi immunochemiluminometrici* che presentano il vantaggio di utilizzare materiali non radioattivi, di accorciare i tempi dell'analisi e di avere reagenti stabili per un lungo periodo di tempo. È infatti attualmente possibile valutare i livelli sierici dell'ormone con tempi di incubazione brevissimi; ciò permette sia un'accurata diagnosi etiologica in pazienti con crisi ipercalcemica, che un'immediata valutazione dell'effetto del trattamento chirurgico (v. PARATORMONE**).

Terapia

A parte il ricorso all'intervento chirurgico qualora ne esistano le indicazioni, in alcuni casi selezionati la possibilità di localizzare le ghiandole affette con l'ultrasonografia ha consentito di utilizzare a scopo curativo l'iniezione percutanea di etanolo direttamente all'interno dell'adenoma. Mancano, tuttavia, a tutt'oggi dati definitivi concernenti le precise indicazioni ed il successo terapeutico di questa procedura.

Un cenno particolare per i problemi precedentemente trattati deve essere riservato alle indicazioni chirurgiche dell'*iperparatiroidismo asintomatico*. A causa delle incertezze e delle controversie esistenti al riguardo, nel 1990 il *National Institute of Health* (Bethesda) ha ravvisato la ne-

cessità di stabilire delle linee guida generali sull'argomento attraverso una *Consensus Development Conference*. Da questa conferenza sono emerse delle indicazioni precise, secondo le quali il paziente ipercalcemico asintomatico viene sottoposto ad intervento chirurgico nelle seguenti condizioni:

- calcemia maggiore di 1 mg rispetto al limite superiore di normalità, attualmente fissato intorno a 10,20-10,40 mg/dl;
- presenza nella storia del paziente di un episodio di ipercalcemia che ne abbia messo a repentaglio la vita;
- clearance della creatinina ridotta più del 30% rispetto ai soggetti normali dello stesso sesso ed età;
- presenza di litiasi renale anche se asintomatica;
- calciuria maggiore di 400 mg/24 ore;
- densità minerale ossea inferiore alla media -2 DS (deviazione standard) rispetto a soggetti sani dello stesso sesso ed età.

Esistono inoltre indicazioni all'intervento chirurgico nel paziente di età inferiore ai 50 anni, o che desideri essere operato, ovvero che non voglia essere sottoposto a controlli periodici.

Sebbene nei prossimi anni sarà possibile ottenere maggiori informazioni sulla storia naturale della malattia e sui benefici della chirurgia in questo gruppo di pazienti, la disponibilità di un eccellente chirurgo sarà sempre un elemento chiave nella decisione di sottoporre un malato alla paratiroidectomia.

Bibliografia

- Arnold A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, **77**, 1108.
 Bassett J. H. D., Thakker R. V., *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995, **3**, 581.
 Bilezikian J. P., *Primary hyperparathyroidism*, in Favus M. J. ed., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1996, 3. ed., Lippincott Raven Press, Philadelphia-New York.
 Consensus Development Conference on Diagnosis and Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism, *J. Bone Min. Res.*, 1991, **6** (Suppl. 2).
 Dempster D. W., Cosman F., Parisien M. et al., *Endocrine Rev.*, 1993, **14**, 690.
 Minisola S., Romagnoli E., Scarnecchia L. et al., *Bone*, 1993, **14**, 703.
 Minisola S., Rosso R., Romagnoli E. et al., *Bone and Min.*, 1993, **20**, 113.
 Minisola S., Scarnecchia L., Romagnoli E. et al., *J. Endocrinol. Invest.*, 1992, **15**, 483.
 Rizzoli R., Ammann P., *Acta Endocrinol.*, 1993, **129**, 375.
 Strewler G. J., *Surgical Clinics of North America*, 1995, **75**, 439.

SALVATORE MINISOLA ED ELISABETTA ROMAGNOLI

IPOPARATIROIDISMO

Classificazione e patogenesi

Ipoparatiroidismo postchirurgico

L'ipoparatiroidismo si sviluppa nell'1% dei pazienti operati per iperparatiroidismo primario. Nell'ipoparatiroidismo conseguente a tiroidectomia, in alcuni pazienti l'ipocalcemia è transitoria, il che sta ad indicare che una quantità residua sufficiente di tessuto paratiroideo è in grado di ripristinare la normale omeostasi calcemica.

Ipoparatiroidismo idiopatico

La malattia è rara e può essere sporadica o familiare. Il tipo di ereditarietà nella forma familiare è incerto, probabilmente perché esistono molte varianti della malattia. Sono stati descritti a tutt'oggi tre tipi di forme familiari: a) un tipo recessivo legato al sesso, b) una forma autosomica recessiva nella quale coesistono altre poliendocrinopatie, e c) una forma più comune, autosomica dominante, nella quale sono state descritte associazioni inusuali con anomalie del tratto genitourinario e del sistema uditivo.

Numerosi studi hanno dimostrato una considerevole eterogeneità genetica e molecolare dell'ipoparatiroidismo familiare. In una famiglia è stata, ad esempio, identificata un'anomalia strutturale del gene codificante il PTH; in un'altra famiglia una mutazione del primo introne del gene causerebbe uno *splicing* (v. *3360; v.**) difettoso con conseguente produzione di un RNA messaggero anormale. Tuttavia, nella maggior parte dei casi non sono state identificate alterazioni genetiche.

I sintomi iniziano spesso nell'infanzia, ma anche tardivamente, soprattutto nei casi sporadici. I pochi studi istologici effettuati dimostrano paratiroidi atrofiche con sostituzione adiposa. La presenza di anticorpi diretti contro il tessuto paratiroidale, l'associazione con altre malattie autoimmuni (diabete mellito, anemia perniciosa, ipotiroidismo e ipogonadismo primari), con l'alopecia areata, con la vitiligine, con la moniliasi cronica mucocutanea, sono a favore dell'ipotesi che la deficiente secrezione di PTH possa essere correlata ad un disordine del sistema immunitario.

L'ipoparatiroidismo idiopatico è raramente associato ad altre sindromi: la *sindrome di DiGeorge* (v. IMMUNODEFICIENZE**), nella quale coesistono un difettoso sviluppo del timo con conseguente compromissione dell'immunità cellulo-mediata, anomalie cardiovascolari e difetti di sviluppo; la *sindrome di Kearns-Sayre* (v. ORTALMOPIEGIA PLECS. X, 1526; v. KEARNS-SAYRE*, coll. *4239) (ortalmopiegia, degenerazione retinica, miopia ed atassia); la *sindrome di Kenney-Cuffey* (ritardo della crescita ed altre anomalie).

Ipoparatiroidismo associato a ipomagnesiemia

L'ipomagnesiemia severa si associa frequentemente ad un ipoparatiroidismo funzionale nel quale l'ipocalcemia viene corretta dalla somministrazione di magnesio. L'ipomagnesiemia probabilmente compromette il rilascio di PTH e induce una resistenza periferica all'ormone.

Ipoparatiroidismo da secrezione di PTH biologicamente inattivo

Teoricamente l'ipoparatiroidismo potrebbe essere causato da un difetto nella biosintesi dell'ormone con secrezione di una molecola biologicamente inattiva. I pazienti con questa forma dovrebbero rispondere normalmente al PTH esogeno e pertanto essere distinti dai pazienti con resistenza all'ormone. A tutt'oggi sono stati riportati in letteratura solo due casi presumibilmente, ma non certamente, causati dalla secrezione di un PTH inefficace.

Ipoparatiroidismo da altre cause

Ogni processo che distrugge o sostituisce una quantità sufficiente di tessuto paratiroidale normale può causare ipoparatiroidismo. Secondo rilievi autopsici circa il 12% dei pazienti che decedono per cancro ha metastasi paratiroidi, anche se l'ipoparatiroidismo è raramente causato dall'invasione neoplastica.

La *chemioterapia antitumorale* (doxorubicina [v.*] e citosin-arabinese [v. ANTIBLASTICI FARMACI*, col. *632]) può causare ipocalcemia e deficiente secrezione di PTH.

L'*emocromatosi idiopatica* e l'*accumulo sistemico di ferro* secondario ad emotrasfusioni ripetute sono una rara causa di ipoparatiroidismo, così come la *malattia di Wilson*.

Occasionalmente l'ipoparatiroidismo è una complicanza della *terapia con radioiodio*, specie nei pazienti con paratiroidi intratiroidi; l'esordio è in genere tardivo (5-18 mesi dopo la terapia) e per motivi non noti la maggior parte dei casi sono associati alla malattia di Graves piuttosto che al carcinoma tiroideo.

Pseudoipoparatiroidismo (PHP = Pseudo-Hypo-Parathyroidism) (v. anche XII, 1608)

È una sindrome eterogenea caratterizzata dal quadro biochimico dell'ipoparatiroidismo, aumento dei livelli plasmatici del PTH e resistenza degli organi bersaglio all'azione biologica dell'ormone. È la prima malattia umana descritta nella quale sia stata identificata una diminuita risposta periferica ad un ormone; lo PHP è pertanto caratterizzato da eccessiva secrezione di PTH e iperplasia delle paratiroidi. Gli individui e le famiglie affetti da questa sindrome dimostrano diverse anomalie nella risposta che segue alla formazione del complesso ormone-recettore. L'AMP ciclico media molte delle azioni del PTH sull'osso e sul rene. Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che il sistema adenil-

ciclico è molto più complesso di quanto originariamente ritenuto e che l'attività dell'adenilciclasi viene regolata, sia nel senso dell'inibizione che della stimolazione, da una proteina della famiglia delle *proteine G* (v.**), la proteina Gs. Questa è composta, come le altre proteine G, da tre subunità, *alfa*, *beta* e *gamma*. L'attivazione della subunità Gs stimola l'adenilciclasi determinando un'aumentata sintesi di AMP ciclico cui consegue, mediante una catena di reazioni successive, l'effetto biologico dell'ormone. Sulla base di queste conoscenze, lo PHP viene classificato in diversi tipi in relazione: 1) alla presenza dei segni biochimici dell'azione inefficace del PTH (ipocalcemia ed iperfosforemia), 2) alla risposta dell'AMP ciclico urinario all'infusione di PTH esogeno, 3) alla presenza o meno dell'*osteodistrofia ereditaria di Albright* (v. XII, 1609), 4) alla misurazione della concentrazione della subunità Gs.

Nello *PHP di tipo I* manca la risposta dell'AMP ciclico nefrogenico alla somministrazione di PTH esogeno; questo gruppo è suddiviso in tre sottotipi Ia, Ib e Ic.

Il *tipo Ia* è caratterizzato da una anomalia generalizzata che compromette la produzione di AMP ciclico in tutti i tessuti; in questi pazienti è possibile infatti dimostrare una riduzione del 50% dell'attività della subunità Gs nelle membrane plasmatiche di cellule appartenenti a linee cellulari differenti. Clinicamente questi malati possono dimostrare resistenza a molti ormoni che attivano l'adenilciclasi e presentano il caratteristico fenotipo dell'*osteodistrofia ereditaria di Albright* (obesità, bassa statura, faccia tonda, calcificazioni eterotopiche, brachidattilia). Nell'ambito di questo gruppo alcuni autori differenziano una variante normocalcémica, detta *pseudopseudoipoparatiroidismo (pseudoPHP)*, nella quale manca l'evidenza biochimica della resistenza all'ormone. Studi recenti dimostrano che questi pazienti hanno una deficienza funzionale della Gs equivalente a quella esistente negli *pseudoipoparatiroidi di tipo Ia* e che entrambe le categorie di malati possono essere presenti nella stessa famiglia. Sebbene siano state descritte mutazioni del gene che codifica per la Gs, resta ignoto il motivo per il quale nello *pseudoPHP* la deficienza della subunità non provoca resistenza al PTH.

I pazienti affetti dal *tipo Ib* hanno livelli normali della Gs, mancano degli aspetti fenotipici della sindrome di Albright e mostrano resistenza ormonale limitata al PTH; in questa categoria esiste probabilmente, anche se mai dimostrato, un difetto del recettore per il PTH.

Nel *tipo Ic*, esiste una resistenza a più ormoni in assenza di un difetto della subunità Gs.

Lo *PHP di tipo II* è un disordine clinico eterogeneo senza una chiara base genetica. In questi pazienti la somministrazione di PTH esogeno aumenta l'escrezione urinaria di AMP ciclico ma non quella del fosforo; pertanto si ipotizza che in questa variante l'anomalia risieda non nella generazione di AMP ciclico, ma a qualche livello nella catena degli eventi biochimici successivi, che coinvolgono probabilmente la via metabolica del calcio intracellulare. Recentemente l'esistenza di questa variante della sindrome è stata messa in discussione, poiché alcuni dei malati appartenenti a questa forma potrebbero avere in realtà solo un deficit occulto di vitamina D. È stato, infatti, dimostrato che pazienti ipocalcémici da deficienza di vitamina D rispondono alla somministrazione dell'ormone in modo del tutto analogo ai pazienti con *pseudoipoparatiroidismo tipo II*.

Diagnosi

La definitiva caratterizzazione delle forme della malattia richiede la misurazione dei livelli del PTH plasmatico e dell'AMP ciclico urinario. La valutazione della risposta del fosforo e dell'AMP ciclico urinario alla somministrazione di PTH esogeno (*test di Ellsworth-Howard*) è ancora utilizzata nella diagnosi differenziale degli *pseudoipoparatiroidismi*. Gli estratti di paratormone bovino impiegati in passato a tale scopo non sono più disponibili in commercio, e attualmente il test viene eseguito mediante infusione del frammento sintetico aminoterminal 1-34 del PTH umano.

IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO

I pazienti ipoparatiroidici veri hanno livelli plasmatici bassi o indosabili di PTH intatto e rispondono normalmente all'infusione dell'ormone. Livelli elevati di PTH con normale risposta all'infusione suggeriscono la secrezione di una molecola biologicamente inattiva. Livelli elevati di PTH in presenza di una risposta abnorme all'ormone esogeno indicano resistenza al PTH, che può essere ulteriormente classificata in accordo al sito del difetto. Nel sospetto dello PHP è importante escludere una ipomagnesiemia.

I dosaggi radioimmunologici convenzionali utilizzati in passato per la misurazione dei livelli plasmatici del PTH non erano in grado di stimare sufficientemente l'entità dell'insufficienza paratiroidea. Attualmente, lo sviluppo di dosaggi a due siti immunoradiometrici e immunochemiluminometrici per il PTH intatto (v. PARATORMONE**), altamente sensibili e specifici, ha reso possibile la determinazione di livelli circolanti ridotti dell'ormone, consentendo pertanto di distinguere gli ipoparatiroidismi dalle cause non paratiroidiche di ipocalcemia.

Terapia

Lo scopo della terapia è riportare la calcemia a livelli abbastanza elevati da prevenire le complicanze dell'ipocalcemia ma non tanto da causare ipercalcemia e ipercalcemia. A tal fine la calcemia va mantenuta tra 8 e 9 mg/dl, monitorizzando periodicamente e regolarmente il paziente. Sono generalmente utilizzati supplementi *per os* di calcio, alla dose di 1 g al giorno di calcio elementare, eliminando cibi ricchi di fosforo, come latte e formaggi. Se necessario la fosforemia può essere ridotta utilizzando antiacidi chelanti il fosforo. In alcuni casi, i tiazidici aggiunti al calcio si dimostrano efficaci nel ridurre la calciuria e possono essere impiegati nelle forme lievi della malattia.

La terapia con vitamina D (v. VITAMINE, XV, 2170; *7579) si avvale dell'utilizzazione di numerosi composti. I preparati più economici sono rappresentati dalla vitamina D₃ (colecalciferolo) o D₂ (ergocalciferolo), a dosaggi compresi tra 25.000-100.000 U./die (1,25-5 mg/die). Il calcitriolo, 1,25(OH)₂D₃, alla dose di 0,25-2 µg/die è attualmente il farmaco più utilizzato.

La crisi ipoparatiroidica acuta si giova della sola terapia con calcio gluconato endovena mediante iniezione lenta di soluzione al 5 o al 10%.

Bibliografia

- Arnold A., Horst S. A., Gardella T. J. et al., *J. Clin. Invest.*, 1990, **86**, 1084.
Aurbach G. D., Marx S. J., Spiegel A. M., *Hypoparathyroidism*, in Wilson J. D., Foster D. W. eds., *Williams Textbook of Endocrinology*, 1992, 8 ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia.
Bassett J. H. D., Thakker R. V., *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995, **3**, 581.
Bilous R. W., Murty G., Parkinson D. B. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1069.
Brown E. M., Pollak M., Seidmann C. E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 234.
Compston J. E., *Clin. Endocrinol.*, 1995, **42**, 195.
Coudray C., Lienhardt P. Y., Conradi A. et al., *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.*, 1994, **111**, 189.
Eastell R., Heath H. III., *The hypocalcemic states; their differential diagnosis and management*, in Coc F. L., Favus M. J. eds., *Disorders of bone and mineral metabolism*, 1992, Raven Press, New York.
Endres D. B., Villanueva R., Sharp C. R. jr. et al., *Clin. Chem.*, 1991, **37**, 162.
Goltzman D., Cole D. E. C., *Hypoparathyroidism*, in Favus M. J. ed., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1996, 3 ed., Lippincott Raven Press, Philadelphia.
Gross J. A., Mundy G. R., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, **80**, 1.
Hatake A., Ark R., Minam D. et al., *Clin. Endocrinol.*, 1994, **40**, 303.
Hassler P., Bobender C., Vuillemin M. O. et al., *Presse Med.*, 1993, **22**, 1.

- Levine M. A., *Parathyroid hormone resistance syndromes*, in Favus M. J. ed., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1996, 3 ed., Lippincott Raven Press, Philadelphia-New York.
Mizunashi K., Furukawa Y., Abo K. et al., *Calcif. Tissue Int.*, 1993, **53**, 378.
Parkinson D. B., Shaw N. J., Himsworth R. L. et al., *Hum. Genet.*, 1993, **91**, 281.
Patten J. L., Johns D. R., Valle D. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1990, **322**, 1412.
Pollak M. R., Brown E. M., Estep H. L. et al., *Nat. Genet.*, 1994, **8**, 303.
Polverosi R., Zambelli C., Shegheh R. et al., *Radiol. Med.*, 1994, **87**, 12.
Potts J. T. Jr., *Diseases of the parathyroid gland and other hyper- and hypocalcemic disorders*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1994, 13 ed., Mc Graw-Hill Inc., USA.
Thakker R. V., *Molecular genetics of hypoparathyroidism*, in Bilezikian J. P., Levine M. A., Marcus R. eds., *The parathyroids*, 1994, Raven Press, New York.

SALVATORE MINISOLA ED ELISABETTA ROMAGNOLI

IPERTENSIONE ARTERIOSA [v. vol. VIII, coll. 163-191; Agg. I, coll. *3971-4032]

SOMMARIO GENERALE

ETIOPATOGENESI	col. 2876
GENETICA DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA	col. 2887
IPERTENSIONE ARTERIOSA DELL'ANZIANO	col. 2897

ETIOPATOGENESI

SOMMARIO

INTRODUZIONE	col. 2876
Ipertensione arteriosa essenziale (col. 2877). - Ipertensione arteriosa secondaria (col. 2877).	
MECCANISMI PATOGENETICI NERVOSI E IPERTENSIONE ARTERIOSA	col. 2877
Sistema nervoso centrale (S.N.C.) e ipertensione arteriosa (col. 2877). - Sistema nervoso autonomo (S.N.A.) e ipertensione arteriosa (col. 2878): Ruolo delle catecolamine. - Ruolo dei barocettori. - Ruolo dei recettori pre- e post-sinaptici. - Sistema nervoso simpatico (S.N.S.) e fattori concomitanti (col. 2879): Ruolo dei neuromodulatori. - Ruolo dei sistemi neuromonali.	
MECCANISMI PATOGENETICI NEUROMONALI E IPERTENSIONE ARTERIOSA	col. 2880
Sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA) (col. 2880): Sistema RAA e ipertensione arteriosa essenziale. - Sistema RAA e ipertensione nefrovascolare. - Sistema RAA e ipertensione associata a tumori renina-secrenti. - Sostanze renali ad azione vasodilatrice (col. 2882): Sistema calcitonina-chinina renale (CCR). - Sistema prostaglandinico renale (PGR).	
MECCANISMI NEUROMORALI E IPERTENSIONE ARTERIOSA	col. 2882
Fattori di origine surrenalica (col. 2882): Mineralocorticoidi e ipertensione arteriosa. - Glucocorticoidi e ipertensione arteriosa. - Sindrome da deficit di 11-β HSD e ipertensione arteriosa. - Catecolamine e ipertensione arteriosa. - Fattori natriuretici peptidici (col. 2883): Fattore natriuretico atriale (ANP) e ipertensione arteriosa. - Fattore natriuretico cerebrale (BNP) e ipertensione arteriosa. - Peptide natriuretico di tipo C (CNP) e ipertensione arteriosa. - Fattori similitudinali (col. 2885). - Arginina-vasopressina (AVP) (col. 2885). - Fattori di origine endoteliale (col. 2885): Endotelina e ipertensione arteriosa. - Ossido nitrico (NO) e ipertensione arteriosa.	

INTRODUZIONE

L'ipertensione arteriosa [i.a.] è una condizione clinica caratterizzata da un incremento dei valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica responsabile di una elevata incidenza di manifestazioni cliniche in termini soprattutto di

eventi cardiaci e cerebrovascolari (Joint National Committee, 1993). Nell'articolato universo della malattia ipertensiva, il riscontro di elevati valori pressori rappresenta il fenomeno macroscopicamente rilevabile che consegue all'intervento di complessi meccanismi patogenetici (Oparil, 1993; Gordon, 1995). Sinteticamente, un aumento patologico dei valori pressori può conseguire all'intervento di una o più delle tre componenti principalmente coinvolte nel controllo della pressione arteriosa e cioè il *sistema nervoso centrale e periferico*, il *rene* ed il *sistema neuroumorale* il cui contributo può tradursi in un quadro clinico di severità variabile da quello della ipertensione *borderline* a quello delle forme ad evoluzione maligna.

Ipertensione arteriosa essenziale

Per quanto attiene agli aspetti patogenetici specifici della i.a. essenziale, numerose sono le modificazioni patologiche individuate senza tuttavia identificare un aspetto prevalente in ragione soprattutto degli aspetti di multifattorialità che sembrano essere nettamente dominanti (Oparil, 1993; Gordon, 1995). Per alcuni di questi meccanismi patogenetici è stato recentemente possibile individuare un substrato genetico (Lifton, 1993) probabilmente responsabile del progressivo sviluppo di anomalie organiche e funzionali che possono essere indotte, nel soggetto geneticamente predisposto, in presenza di opportune condizioni che ne promuovono la espressione fenotipica (ad es.: dieta, stress, personalità, etc.). Per una analitica trattazione degli aspetti genetici della i.a., v. sotto coll. **2887-2897.

Ipertensione arteriosa secondaria

La i.a. secondaria (Laragh e Brenner, 1990) differisce dalla forma essenziale in quanto consegue all'intervento diretto di una causa nota che determina invariabilmente un incremento dei valori pressori mediato attraverso modificazioni che coinvolgono il rapporto volume-vasocostrizione. In termini fisiopatologici la i.a. secondaria presenta aspetti che si sovrappongono a quelli della forma essenziale dalla quale differisce fondamentalmente per la reversibilità del quadro ipertensivo che consegue alla rimozione della *noxa* patologica.

MECCANISMI PATOGENETICI NERVOSI E IPERTENSIONE ARTERIOSA

Sistema nervoso centrale (S.N.C.) e ipertensione arteriosa

Il S.N.C. (Brody *et al.*, 1986; Luft *et al.*, 1986) è responsabile del controllo istantaneo dei valori pressori attraverso una serie di centri in complessa connessione con strutture sensoriali periferiche (tab. I) i cui segnali, opportunamente integrati a livello centrale, si traducono in adeguati aggiustamenti dei livelli pressori e della secrezione di fattori neuro-

TAB. I. STRUTTURE COINVOLTE NEL CONTROLLO PRESSORIO A LIVELLO NERVOSO CENTRALE

1. Nucleo del tratto solitario
2. Nucleo parabrachiale
3. Nucleo motore dorsale del vago
4. Midollo allungato ventro-laterale
5. Midollo allungato caudale
6. Ipotalamo
 - Nucleo paraventricolare
 - Ipotalamo laterale e posteriore
 - Ipotalamo anteriore (regione AV3V, regione pre-ottica)

TAB. II. FUNZIONI LOCALIZZATE A LIVELLO DELL'IPOTALAMO ANTERIORE E IPERTENSIONE ARTERIOSA

1. Controllo del tono vasomotorio
2. Controllo della escrezione di sodio
3. Controllo della secrezione di arginina-vasopressina
4. Controllo del centro della sete
5. Controllo del rilascio di Fattore Natriuretico Atriale (ANP)
6. Produzione e rilascio di Fattore Natriuretico Atriale di tipo C (CNP)
7. Produzione e rilascio di fattori digossino-simili

umori. Il controllo nervoso centrale della pressione arteriosa è localizzato prevalentemente a livello del midollo allungato la cui attività può essere modificata da stimoli sistemici di natura chimica legati alla funzione cardiovascolare e respiratoria (modificazioni del pH ematico, della PaCO_2).

Il controllo nervoso centrale della funzione neuroumorale, è localizzato a livello dell'ipotalamo e delle strutture correlate (Brody *et al.*, 1986). In questa sede un adeguato *pool* neuronale integra le stimolazioni che originano dai centri nervosi (strutture limbiche e corticali) e/o viscerali influenzando su fattori quali la sete, la natriuresi, la secrezione di vasopressina e di alcuni altri fattori natriuretici in grado di interferire sul controllo pressorio sistemico. L'ipotalamo partecipa, tuttavia, anche al controllo nervoso della pressione arteriosa e in questa ottica la regione più interessante in termini patogenetici è rappresentata dalla regione antero-ventrale (AV3V) dell'ipotalamo anteriore dotata della capacità di esercitare un controllo su funzioni molteplici (tab. II) e la cui distruzione è in grado di prevenire la insorgenza di un numero considerevole di ipertensioni sperimentali dipendenti da meccanismi patogenetici sostanzialmente diversi.

Nell'ambito delle strutture localizzate a livello del S.N.C. e coinvolte nella patogenesi dell'i.a. un ruolo particolare va inoltre riservato al nucleo del tratto solitario che rappresenta la proiezione centrale delle fibre provenienti dai barocettori seno-aortici e probabilmente renali, responsabili della riduzione dei valori pressori.

Sistema nervoso autonomo (S.N.A.) e ipertensione arteriosa

Il S.N.A. risulta strettamente connesso con il controllo della pressione arteriosa in particolare per quanto concerne la componente simpatica (S.N.S.) (Weiss, 1993) la cui iperattività risulta di frequente riscontro in alcune condizioni pre-ipertensive umane e sperimentali. Numerosi sono gli studi che dimostrano un coinvolgimento del S.N.S. periferico nella patogenesi della i.a. attraverso un intervento diretto o mediato dalla facilitazione di altri fattori in grado di determinare un incremento dei valori pressori (fig. 1).

Ruolo delle catecolamine

Le catecolamine (v.; v.**) rappresentano, senza dubbio, la espressione più tangibile della iperattività simpatica diretta nel paziente iperteso. La noradrenalina è il principale neurotrasmettitore responsabile della regolazione degli organi periferici da parte del S.N.S. Modificazioni patologiche del rapporto tra noradrenalina e recettori post-sinaptici sono state ripetutamente proposte nei pazienti ipertesi, nei quali sono di frequente riscontro una iperattività simpatica di base associata ad esagerato rilascio di noradrenalina in risposta allo stress e ad una incapacità di sopprimere il livello

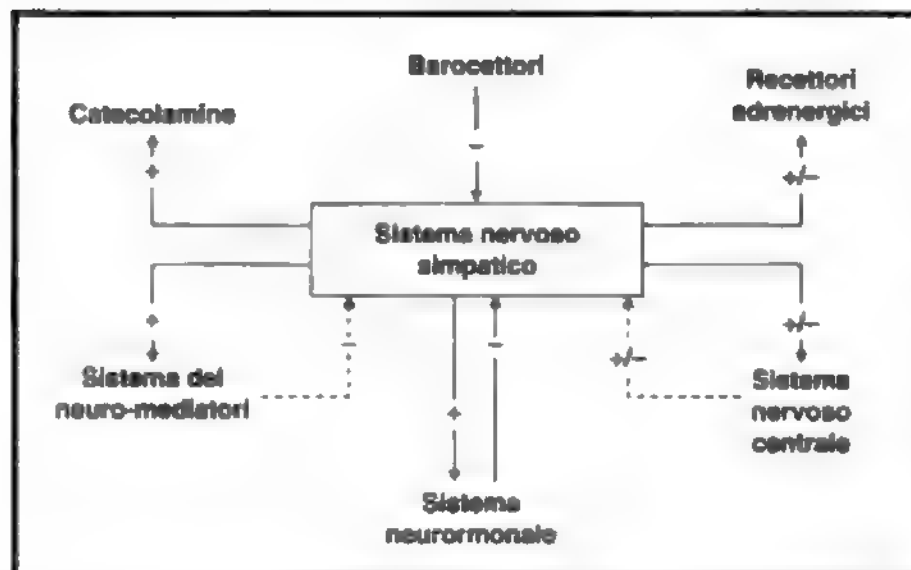


Fig. 1. Reciproche interazioni tra sistema nervoso simpatico (S.N.S.) e meccanismi di controllo della pressione arteriosa. (+: stimolazione; -: inibizione).

di attività simpatica di base sia pure in presenza di elevati valori pressori (Weiss, 1993).

Ruolo dei barocettori

Le alterazioni funzionali del S.N.S. sarebbero poi accentuate da una riduzione della attività di controllo dei barocettori seno-carotidei che è stata ripetutamente descritta nell'animale da esperimento mentre i dati umani sono tuttora oggetto di discussione (Brody *et al.*, 1986).

Ruolo dei recettori pre- e post-sinaptici

Nella i.a. la iperattività simpatica si presenta di solito con i caratteri della stimolazione post-sinaptica che coinvolge prevalentemente i recettori di tipo α_1 i quali debbono essere considerati come i mediatori principali della alterata risposta simpatica periferica anche se il loro ruolo patogenetico risulta in parte ridimensionato dalla osservazione che il blocco dei recettori α_1 non risulta in grado di prevenire lo sviluppo di ipertensione sperimentale. In questa ottica un ruolo non secondario sembra essere quello attribuibile ai recettori α_2 pre-sinaptici con funzione inibitoria sul rilascio di noradrenalina la cui ridotta funzionalità potrebbe contribuire all'alterato profilo simpatico del paziente iperteso.

Sistema nervoso simpatico (S.N.S.) e fattori concomitanti

In aggiunta ad un meccanismo diretto, l'influenza patogenetica del S.N.S. nei confronti della ipertensione arteriosa

TAB. III. FATTORI NEUROMORALI IN GRADO DI MODIFICARE LA PRESSIONE ARTERIOSA MODIFICANDO LA ATTIVITÀ SIMPATICA

1. Neuro-mediatori

- Catecolamine circolanti
- Neuropeptide Y
- Adenosina
- Galanina

2. Neuro-ormoni

- Angiotensina II
- Endoneurinio Atriale (ANP)
- Arginina Vasopressina (AVP)
- Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)
- Ossido nitrico (NO)
- Endotelina
- Fattori e fattori simil-digossinici

può estrinsecarsi attraverso la interferenza tra mediatori adrenergici (noradrenalina e adrenalina) e sostanze in grado di esagerarne gli effetti a livello recettoriale (Weiss, 1993) (tab. III) le quali potrebbero giustificare un ruolo primario per il S.N.S. anche in quelle condizioni nelle quali il rilievo di elevati valori pressori non si associa a segni evidenti di iperattività simpatica basale.

Ruolo dei neuromediatori

Il ruolo patogenetico del S.N.S. può essere potenziato dalla sua interazione con alcuni neuromediatori quali: 1) *adrenalina* e *noradrenalina* in virtù della loro capacità di agire in senso inibitorio a livello pre-sinaptico, 2) *neuro-peptide Y* in grado di potenziare la risposta degli effettori vascolari periferici alla noradrenalina, 3) *adenosina*, in grado di esercitare un effetto inibitorio post-sinaptico che determina una riduzione del tono vascolare, 4) *galanina*, neuromediatore distribuito a livello centrale e periferico ed in grado di inibire la risposta simpatica. Un eccessivo (neuropeptide Y) o insufficiente (adenosina, galanina) rilascio di tali sostanze determina un eccesso di attività simpatica con conseguente aumento dei valori pressori che potrebbe contribuire allo sviluppo di i.a. anche in presenza di normali livelli di catecolamine circolanti.

Ruolo dei sistemi neuroormonali

In aggiunta alla azione concomitante a quella dei neuro-mediatori, il S.N.S. può contribuire allo sviluppo di ipertensione attraverso una complessa interazione con numerosi altri sistemi a carattere neuroormonale (fig. 1; tab. III). In particolare un incremento della attività simpatica si associa ad un aumento della attività reninica plasmatica e dei livelli di angiotensina II ad azione ipertensivante (Weiss, 1993). La interazione tra emodinamica distrettuale e S.N.S. è resa inoltre più complessa dalle influenze reciproche tra quest'ultimo e fattori plasmatici (AVP, Fattori simil-digossinici) o sistemi ad azione prevalentemente paracrina quali *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF), ossido nitrico (NO) ed endotelina la cui sintesi e rilascio è largamente influenzata dal S.N.S. ed i cui effetti si esplicano prevalentemente attraverso una modulazione della azione vasocostrittrice simpatica (tab. III).

MECCANISMI PATOGENETICI NEUROMONALI ED IPERTENSIONE ARTERIOSA

Sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA)

Il sistema RAA (v. RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE SISTEMA) esercita la sua azione attraverso la formazione di angiotensina II la cui produzione rappresenta l'anello finale di una catena che ha inizio con la secrezione di renina prodotta principalmente a livello renale (Waeber *et al.*, 1986) (fig. 2). In termini patogenetici la angiotensina II potrebbe essere in grado causare ipertensione secondo diverse modalità (fig. 3) che coinvolgono: l'aumento del tono vascolare, la ritenzione sodica sia primitiva che secondaria alla secrezione di aldosterone, la accentuazione della contrattilità miocardica, il potenziamento della attività simpatica e la stimolazione dei processi di accrescimento tessutale.

La molteplicità delle funzioni cardiovascolari attribuite alla angiotensina II e la stretta relazione tra tale peptide ed il bilancio sodico rendono ragione della importanza del suo ruolo patogenetico nello sviluppo di varie forme di i.a. che verranno di seguito prese in esame.

Sistema RAA e ipertensione arteriosa essenziale

Nei pazienti con ipertensione arteriosa i valori di renina circolante sono abnormemente elevati in circa il 15% dei pazienti e francamente ridotti in circa il 25-30% della po-

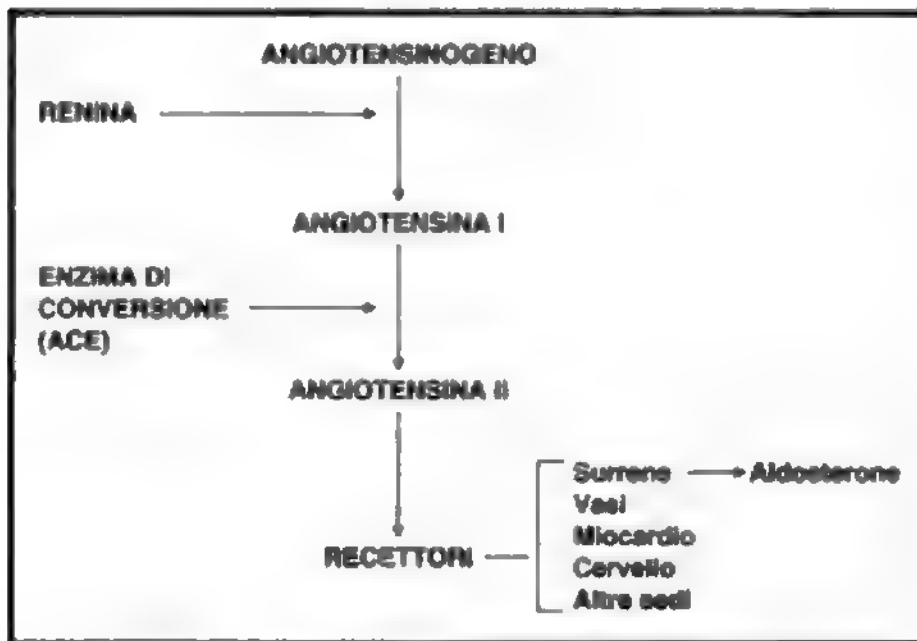


Fig. 2. Il sistema renina-angiotensina-aldosterone.

polazione ipertesa. Nei soggetti con elevata renina, il sistema RAA svolge una funzione patogenetica primaria mentre nei pazienti che presentano valori normali di attività reninica è stato proposto recentemente un meccanismo patogenetico che conferirebbe al sistema RAA un ruolo patogenetico comunque significativo. È stato infatti suggerito che il riscontro di normali livelli di attivazione reninica in presenza di elevati valori pressori sia da considerare come una implicita dimostrazione di iperattività del sistema RAA che sarebbe in grado di svolgere comunque un ruolo patogenetico sostanziale.

Sistema RAA e ipertensione nefrovascolare

La ipertensione nefrovascolare (v.; v.*) rappresenta la condizione paradigmatica della ipertensione arteriosa nella quale il quadro ipertensivo risulta interamente sostenuto dagli effetti diretti e mediati di una componente ad origine intrarenale dotata di effetti prevalentemente sistemici. Nei soggetti con *nefroangiosclerosi* in virtù della ipoperfusione renale i livelli di renina circolante e intrarenale risultano spesso elevati e svolgono un ruolo patogenetico determinante nel condizionare l'aumento dei valori pressori.

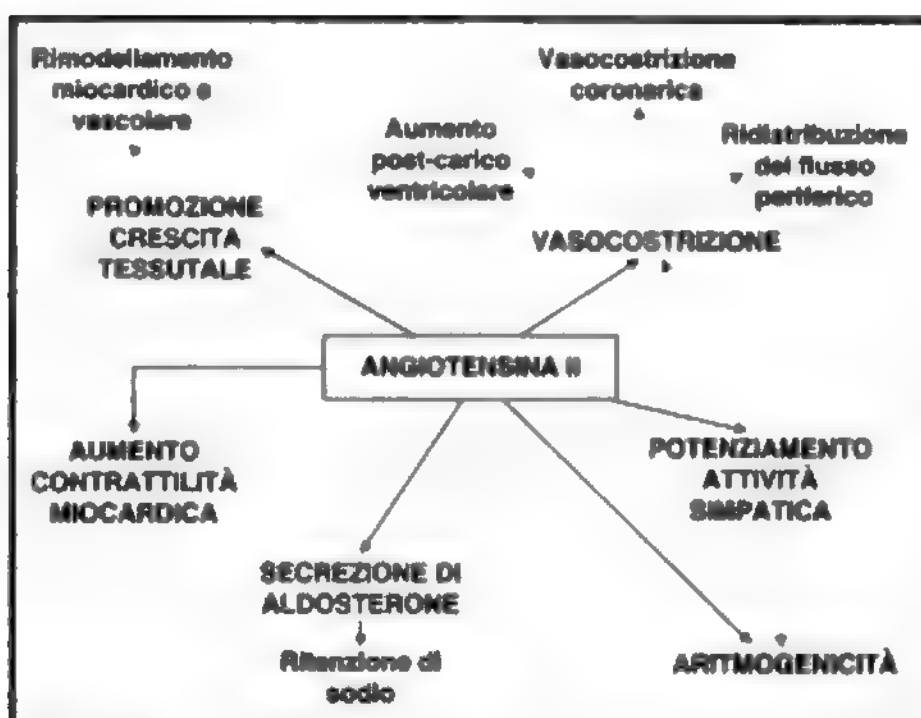


Fig. 3. Effetti emodinamici, metabolici e vascolari della angiotensina II.

Nei pazienti con *stenosi bilaterale della arteria renale* o con *stenosi monolaterale e rene singolo* il meccanismo patogenetico che sottende alla i.a. è sostanzialmente sovrapponibile a quello sopra riportato. La differenza sostanziale tra queste due forme risiede nella estensione bilaterale del quadro stenotico che rende in questo secondo caso la filtrazione glomerulare interamente dipendente dai livelli di angiotensina II.

Sistema RAA e ipertensione associata a tumori renina-secer-nenti

I tumori renina-secer-nenti localizzati a livello dell'apparato juxtaglomerulare rappresentano una rara forma di ipertensione tipicamente angiotensina II-dipendente caratterizzata da marcata vasocostrizione periferica ed alterazioni del metabolismo sodico che si normalizzano mediante l'impiego di un inibitore dei recettori dell'angiotensina II (ad es. losartan) o di un ACE-inibitore.

Sostanze renali ad azione vasodilatatrice

Il rene è indubbiamente uno degli organi più attivi nella produzione di sostanze ad azione vasodilatatrice e natriuretica. In particolare le prostaglandine renali e la bradichinina potrebbero svolgere un ruolo non trascurabile nella patogenesi della ipertensione arteriosa sia essenziale che in condizioni di malattia nefro-parenchimale.

Sistema callicreina-chinina renale (CCR)

Una relazione tra sistema CCR e lo sviluppo di ipertensione arteriosa è stata suggerita sulla base della dimostrazione di una ridotta escrezione urinaria di callicreina sia nei pazienti ipertesi che nei giovani soggetti normotesi con familiarità per la ipertensione arteriosa (Scioli e Carrettero, 1986).

Sistema prostaglandinico renale (PGR)

Il rene è uno dei tessuti più attivi nel sintetizzare prostaglandine (Schlondorff e Ardillon, 1986) la cui influenza sulla patogenesi della ipertensione arteriosa primitiva è tuttavia ancora oggetto di discussione.

MECCANISMI NEUROUMORALI E IPERTENSIONE ARTERIOSA

Numerosi sistemi neuroumorali sono coinvolti nel controllo della pressione arteriosa (fig. 4) e il malfunzionamento di alcuni di essi può esercitare un ruolo patogenetico promuovendo lo sviluppo di i.a.

Fattori di origine surrenalica

Le anomalie della funzione surrenalica corticale e midollare sono cause importanti di i.a. nell'uomo (5% della popolazione ipertesa adulta) (Blumenfeld, 1993). In questo ambito l'aumento dei valori pressori conseguente ad eccesso mineralocorticoide rappresenta certamente la forma più comune, mentre le patologie associate alla linea glucocorticoide e midollare sono più infrequenti. I fattori umorali coinvolti nei quadri di ipertensione ad origine cortico-surrenale (aldosterone, cortisolo, desossicorticosterone, deidroepiandrosterone, etc.) agiscono prevalentemente promuovendo il riassorbimento tubulare del sodio e il suo accumulo a livello intracellulare determinando una espansione del volume extracellulare. Le catecolamine secrete in corso di feocromocitoma esercitano una azione prevalente a livello dei recettori adrenergici.

Mineralocorticoidi e ipertensione arteriosa

In condizioni normali la produzione e secrezione di aldosterone è prevalentemente regolata dal sistema RAA in

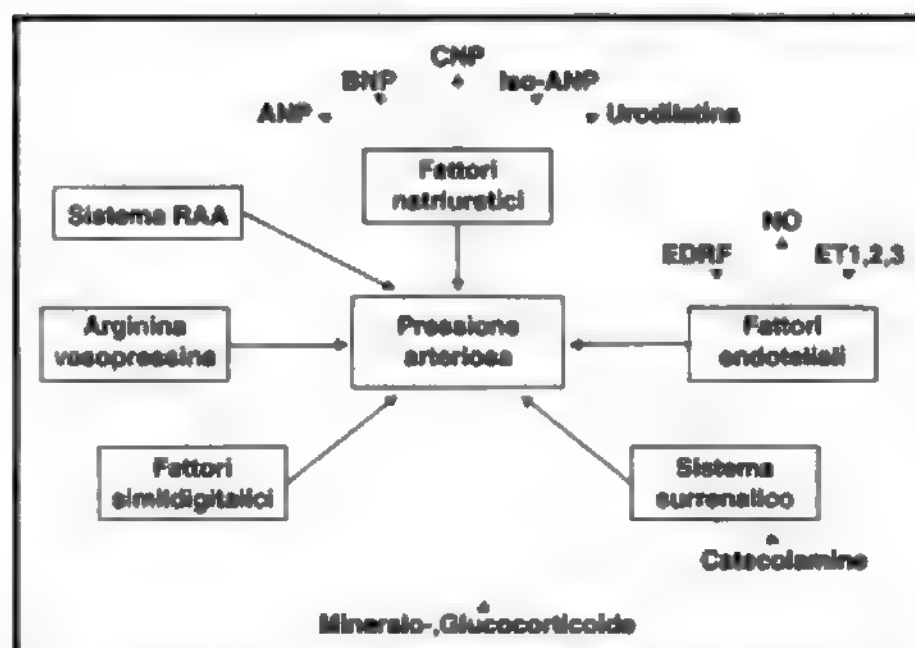


Fig. 4. Interazione tra sistemi neuromonali e controllo della pressione arteriosa.

risposta a modificazioni posturali e dell'apporto dietetico di sodio e potassio. In alcune condizioni patologiche (tumori o iperplasia surrenale) si realizza una situazione di eccessiva produzione di aldosterone associata a segni clinici di iperattività ormonale tra i quali l'i.a.

Glucocorticoidi e ipertensione arteriosa

Nei soggetti sani la sintesi di glucocorticoidi risulta prevalentemente sotto il controllo spontaneo e stimolato dei ritmi circadiani di secrezione di un fattore corticotropinico ipotalamo-ipofisario. In presenza di una eccessiva produzione di glucocorticoidi (primitiva o secondaria a stimolazione ipotalamo-ipofisaria) il complesso quadro clinico può comprendere anche lo sviluppo di i.a.

Sindrome da deficit di 11-β HSD e ipertensione arteriosa

Recentemente è stata identificata (Seckl e Brown, 1994) una forma di ipertensione ad origine surrenalica conseguente al deficit della 11-β-idrossi-steroido-deidrogenasi (11β-HSD), un enzima che catalizza la conversione del cortisolo in cortisone e previene il legame tra cortisolo e recettori mineralocorticoidi. Nei soggetti che presentano tale deficit, è possibile riscontrare un quadro di i.a. sovrapponibile a quello da eccesso di mineralocorticoidi in assenza di livelli plasmatici elevati di aldosterone.

Catecolamine e ipertensione arteriosa

L'i.a. conseguente alla esagerata produzione di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) caratterizza il quadro clinico del feocromocitoma e di tutte le altre forme neoplastiche secernenti catecolamine e localizzate in sede extra-surrenalica (ad es. paragangli aortici). Poiché il quadro clinico del feocromocitoma consegue alla eccessiva produzione di catecolmine, i suoi aspetti patogenetici sono sovrapponibili a quelli elencati per i rapporti tra i.a. e S.N.S.

Fattori natriuretici peptidici

I fattori natriuretici peptidici sono una composita famiglia di peptidi circolanti e tissutali (tab. IV) che a fronte di differenze nella sequenza aminoacidica e nelle modalità di secrezione presentano numerose somiglianze per quanto concerne la loro azione ed il meccanismo finalistico di intervento (Nakao *et al.*, 1993). In particolare si identificano due principali composti circolanti: il Fattore Natriuretico Atriale (*Atrial Natriuretic Peptide*; ANP) ed il Fattore Natriuretico Cerebrale (*Brain Natriuretic Peptide*; BNP) se-

TAB. IV. FATTORI NATRIURETICI ED IPERTENSIONE ARTERIOSA

Fattori peptidici

1. Fattore Natriuretico Atriale (ANP)
2. Fattore Natriuretico Cerebrale (BNP)
3. Fattore Natriuretico di tipo C (CNP)
4. Iso-ANP
5. Urodilatina

Steroidi

6. Fattore Natriuretico Simil-Digitalico

creti rispettivamente a livello atriale (ANP) e ventricolare (BNP) in risposta al sovraccarico del volume cardiopolmonare (ANP) o della pressione arteriosa (BNP). Poiché entrambi tali fattori agiscono direttamente o indirettamente controllando la pressione arteriosa attraverso una azione esercitata sul tono vascolare e sul bilancio sodico, essi sono in grado di svolgere un ruolo consistente nella patogenesi della ipertensione arteriosa. Ai due fattori sopra elencati si aggiungono il peptide natriuretico di tipo C (C-type NP), identificabile a livello cerebrale dove esercita una azione di tipo neuropeptidica, nonché l'Iso-ANP e l'Urodilatina il cui significato è ancora oggetto di studio.

Fattore natriuretico atriale (ANP) e ipertensione arteriosa

La molteplicità delle azioni dell'ANP nell'ambito dei meccanismi di controllo della pressione arteriosa (tab. V) suggeriscono un ruolo potenziale di tale fattore nella patogenesi dell'i.a. In particolare una insufficiente o ritardata secrezione di ANP è stata riportata nei soggetti con ipertensione borderline e negli individui normotesi con familiarità per i.a. a dimostrazione del fatto che una alterazione nei meccanismi di rilascio dell'ANP potrebbe direttamente contribuire allo sviluppo di i.a. in virtù della inadeguata inibizione di meccanismi ipertensivanti vascolari e renali.

V. FATTORE NATRIURETICO ATRIALE**.

Fattore natriuretico cerebrale (BNP) e ipertensione arteriosa

Un aumento dei livelli plasmatici di BNP è stato riportato nei pazienti con ipertensione arteriosa nei quali esercita effetti sovrapponibili a quelli riportati per il peptide atriale rispetto al quale differisce per il suo maggiore coinvolgimento nelle condizioni patologiche caratterizzate da disfunzione ventricolare sinistra.

Peptide natriuretico di tipo C (CNP) e ipertensione arteriosa

Il terzo membro della famiglia dei peptidi atriali (CNP) differisce da quelli precedentemente identificati in quanto

TAB. V. PROPRIETÀ GENERALI DEL FATTORE NATRIURETICO ATRIALE (ANP)

1. Riduzione del tono vascolare periferico
2. Azione diuretica e natriuretica
3. Inibizione della secrezione di renina
4. Inibizione della sintesi e rilascio di aldosterone
5. Inibizione della produzione di arginina-vasopressina
6. Inibizione della attività simpatica
7. Aumento della permeabilità vascolare
8. Antagonismo nei confronti della angiotensina II
9. Inibizione del rilascio di fattori simil-digitalici
10. Azione di neuro-mediatore a livello centrale?

la sua sede principale di produzione è rappresentata dal cervello a livello del quale il CNP esercita una azione in qualità di neuropeptide e potrebbe agire unitamente al sistema di fattori natriuretici endocrini (ANP, BNP) nella regolazione della pressione arteriosa e della crescita cellulare.

Fattori simildigitalici

Tali sostanze di struttura simile a quella dei glicosidi cardioattivi, agirebbero interferendo con i meccanismi di trasporto cellulare degli ioni mono- e bivalenti (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) ed attraverso una azione inibitrice esercitata a livello della Na/K ATPasi a livello tubulare renale e vascolare (de Wardener e Clarkson, 1985). Livelli plasmatici significativamente elevati di tali sostanze sono stati riscontrati in alcune condizioni tipicamente pre-ipertensive ed in risposta a stimoli adeguati quali la espansione di volume e la prolungata ingestione di cloruro di sodio. In queste situazioni particolari il blocco della pompa sodio/potassio conseguente al rilascio di fattori simil-digitalici, sarebbe responsabile del progressivo incremento delle resistenze vascolari periferiche e della aumentata sensibilità periferica alle catecolamine (effetto diretto inibitorio sulla ricaptazione sinaptica della noradrenalina) che rappresentano due meccanismi tipicamente coinvolti nello sviluppo progressivo di ipertensione.

Arginina-vasopressina (AVP)

Il ruolo della arginina-vasopressina, nonapeptide secreto a livello neuro-ipofisario, nella patogenesi della i.a. sembra essere essenzialmente facilitante e promuovente la azione di fattori più intimamente connessi con il metabolismo idrosalino e con il controllo del tono vasocostrittore (Cowley *et al.*, 1983). Ciò significa che livelli modestamente elevati di AVP potrebbero tradursi in un potenziamento della azione vasocostrittiva associata a livelli fisiologici di angiotensina II o di catecolamine contribuendo allo sviluppo di elevati valori pressori anche in assenza di una evidente stimolazione simpatica e/o del sistema renina-angiotensina-aldosterone.

Fattori di origine endoteliale

Tra le acquisizioni fisiopatologiche recenti in merito alla ipertensione arteriosa, certamente l'accertamento del contributo dei fattori endoteliali rappresenta uno dei campi di interesse che racchiude maggiori prospettive (tab. VI) (Lüscher e Vanhoutte, 1990). L'endotelio dei vasi può contribuire al controllo pressorio attraverso il rilascio di fattori dotati di attività vasodilatatrice (ossido nitrico, EDRF, EDHF, Prostaciclina) o vasocostrittrice (Endotelina, Anione superossido, Trombossano A_2 , Endoperossidasi).

Endotelina e ipertensione arteriosa

Tra i fattori ad azione vasocostrittrice un ruolo primario sembra essere quello attribuibile ad una famiglia di peptidi

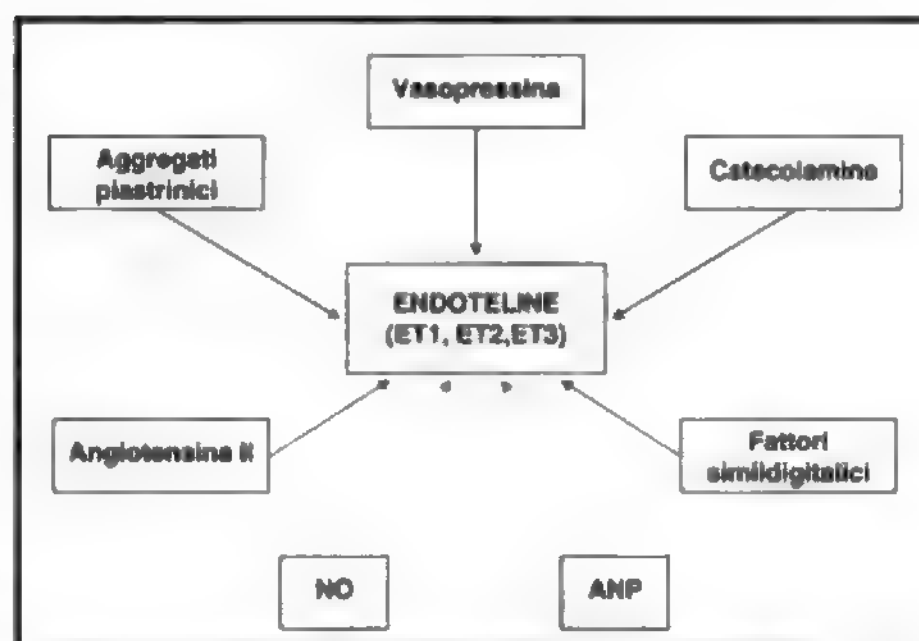


Fig. 5. Fattori responsabili della stimolazione e inibizione della produzione di endotelina. (NO = ossido nitrico; ANP = fattore natriuretico atriale; ⇢ = inibizione; → = stimolazione).

definiti endotelina (v. ENDOTELIO**); VASCOLARI VASOATTIVI FATTORI (v.*; v.**)) che vengono rilasciati dalle cellule endoteliali in coltura e dai vasi isolati esplicando una azione prevalentemente paracrina locale, anche se livelli circolanti dosabili sono stati rilevati anche nell'uomo.

Tra i 3 peptidi che costituiscono la famiglia delle endotelina la endotelina 1 (ET1) e la endotelina 3 (ET3) rappresentano le forme circolanti e come tali potenzialmente coinvolte nel controllo della omeostasi circolatoria (Vanhoutte, 1993). La secrezione di endotelina risulta influenzata da altre sostanze intimamente connesse con la fisiopatologia della ipertensione arteriosa, alcune in grado di promuovere il rilascio del peptide ed aumentarne il potere vasocostrittore (aggregati piastrinici, angiotensina II, vasopressina, catecolamine e fattori simildigitalici) ed altre in grado di inibirlo (EDRF, ANP) (fig. 5). Relativamente agli aspetti patogenetici della ipertensione, la endotelina è stata ripetutamente implicata in virtù del suo notevole potere vasocostrittore che potrebbe contribuire all'aumento delle resistenze vascolari periferiche osservato nel paziente iperteso.

Ossido nitrico (NO) e ipertensione arteriosa

Il ruolo dell'ossido nitrico (v. MONOSSIDO D'AZOTO**) nella patogenesi della ipertensione arteriosa risale ad alcune osservazioni condotte negli ultimi dieci anni che suggerivano la capacità di tale molecola di interagire con fattori responsabili delle malattie cardiovascolari. In particolare, nel paziente iperteso si è suggerito che una riduzione nella produzione o nel rilascio del NO possa contribuire ad aumentare il tono vasocostrittore ed i valori pressori (de Belder e Radomski, 1994). Recentemente la dimostrazione di un deficit nella attività della NO sintetasi in alcune condizioni caratterizzate da ipertensione ha permesso di ipotizzare la natura genetica del difetto riscontrato nella sintesi e rilascio di NO.

Bibliografia

- Blumenfeld J. D., *Curr. Opin. Nephrol. & Hypertens.*, 1993, 2, 274-282.
 Brody M. J., Alper R. H., O'Neill T. P., Porter J. P., *Central neural control of the cardiovascular system*, in Zanchetti A., Tarazi R. C. eds., *Handbook of Hypertension. Pathophysiology of hypertension: regulatory mechanisms*, 1986, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-25.
 Cowley A. V. jr., Quillen E. W. jr., Skelton M. M., *Fed. Proc.*, 1983, 42, 3170-3176.

TAB. VI. PRINCIPALI FATTORI VASOATTIVI A PRODUZIONE ENDOTELIALE

1. Vasodilatatori	
	Ossido nitrico (NO)
	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)
	Prostaciclina
2. Vasocostrittori	
	Endotelina (ET1, ET2, ET3)
	Anione superossido
	Trombossano A_2
	Endoperossidasi

- de Belder A. J., Radomski M. W., *J. Hypertens.*, 1994, **12**, 617-624.
 de Wardener H. E., Clarkson E. M., *Physiol. Rev.*, 1985, **65**, 658-759.
 Gordon R. D., *Nature Genetics*, 1995, **11**, 6-9.
 Joint National Committee on detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, *Arch. Intern. Med.*, 1993, **153**, 154-182.
 Laragh J. H., Brenner B. M., *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 1990, Raven Press, New York, Cap. 98.
 Lifton R. P., *Curr. Opin. Nephrol. & Hypertens.*, 1993, **2**, 258-264.
 Luft F. C., Unger Th., Lang R. E., Ganten D., *Chemical messengers and transmitters in the brain and cardiovascular regulation*, in Zanchetti A., Tarazi R. C. eds., *Handbook of Hypertension. Pathophysiology of hypertension: regulatory mechanisms*, 1986, 26-46.
 Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., *The Endothelium: Modulator of cardiovascular function*, 1990, CRC Press, Boca Raton, 1-215.
 Nakao K., Itoh H., Suga S., Ogawa Y., Imura H., *Curr. Opin. Nephrol. & Hypertens.*, 1993, **2**, 45-50.
 Oparil S., *Curr. Opin. Nephrol. & Hypertens.*, 1993, **2**, 253-257.
 Seckl J. R., Brown R. W., *J. Hypertens.*, 1994, **12**, 105-112.
 Schlondorff D., Ardillou R., *Kidney Int.*, 1986, **29**, 108-119.
 Scicli A. G., Carrettero O. A., *Kidney Int.*, 1986, **29**, 120-130.
 Vanhoutte P. M., *Hypertension*, 1993, **21**, 747-751.
 Waechter B., Nussberger J., Brunner H. R., *The renin-angiotensin-system: role in experimental and human hypertension*, in Zanchetti A., Tarazi R. C. eds., *Handbook of Hypertension. Pathophysiology of hypertension: regulatory mechanisms*, 1986, 489-519.
 Weiss M. J., *Curr. Opin. Nephrol. & Hypertens.*, 1993, **2**, 265-273.

CLAUDIO BORGHI

GENETICA DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA

SOMMARIO

Introduzione (col. 2887). - **Ricerche sulle basi genetiche dell'ipertensione primaria** (col. 2888). - **Studi di linkage nell'ipertensione sperimentale** (col. 2889): **Risultati degli studi di linkage**. - **Ratti transgenici come modelli nella ricerca dell'ipertensione** (col. 2890): **Il ratto transgenico TGR(mRen-2)27**. - **Animali transgenici che esprimono il gene umano per la renina**. - **Animali transgenici che esprimono il gene per l'angiotensinogeno**. - **Prospettive future sulla genetica della malattia ipertensiva** (col. 2894).

Introduzione

Per molti anni l'ipertensione arteriosa (i.a.) primaria, ha rappresentato una sfida tipica per medici e ricercatori. Il 24% della popolazione adulta negli Stati Uniti soffre di i.a. (Burt *et al.*, 1995); questo, tradotto in numeri, corrisponde ad un totale di oltre 43 milioni di persone. Al giorno di oggi è opinione comune che l'i.a. ha una origine poligenica, nella quale entrano in gioco l'interazione tra più geni e diversi fattori ambientali (cfr. Ambrosioni, 1996). Questo rende la patologia ipertensiva un campo difficilissimo da affrontare, nel quale sono stati intrapresi parecchi studi genetici.

Studi di concatenazione (*linkage*) o di caso-controllo costituiscono un buon mezzo per studiare gli aspetti genetici dell'i.a.: infatti, questi metodi confrontano la distribuzione della frequenza allelica in soggetti ipertesi e normotesi. Un approccio sperimentale è rappresentato da studi di concatenazione genica (*linkage*) che esaminano la progenie in F₂ ottenuta da incroci tra ceppi autoincrociati (*inbred*) di ratti normotesi o ipertesi (Schmidt e Ganten, 1994). In questi studi, i ricercatori prendono in esame la cosegregazione di un dato fenotipo che porta un *marker* genetico: il vantaggio principale di questo tipo di ricerche è rappresentato dal fatto che essi si appoggiano su una vasta popolazione e sono passibili di modalità di trasmissione ereditaria: essi costituiscono uno strumento obbligatorio per comprendere patologie poligeniche complesse quali l'i.a. Infatti, si è ipotizzato che da cinque a otto geni siano implicati nello sviluppo dell'i.a.; per trovare una risposta a questi quesiti sono stati adottati modelli animali per oltre tre decenni.

Da un lato, al fine di identificare i geni responsabili di

questa patologia, si possono collegare alcune regioni cromosomali nei ratti spontaneamente ipertesi (SHR) con il loro fenotipo iperteso; da un altro lato, parecchi geni sono stati proposti quali possibili candidati responsabili per l'insorgenza dell'i.a. In particolar modo risultano di particolare interesse i geni che fanno parte del sistema renina/angiotensina (RAS), il peptide atriale natriuretico (ANP), la famiglia delle endoteline, i geni che fanno parte del sistema della ossidazione nitrica e di quello adrenergico: ma questi geni sono solo quelli di interesse principale. Al fine di studiare il loro coinvolgimento nella fisiologia e nella fisiopatologia, l'espressione di questi geni può essere sperimentalmente alterata in animali normotesi attraverso l'uso di tecniche che portano alla produzione di animali transgenici: infatti si può ottenere la super-espressione, sia sistemica che tessuto specifica, del transgene di elezione introducendo promotori e geni esogeni nel genoma di animali da esperimento. Gli animali transgenici negli ultimi anni hanno dato preziose informazioni riguardo a geni di cui si sospetta una implicazione nell'insorgenza dell'i.a.: un esempio tipico è rappresentato proprio dai geni del RAS.

Ricerche sulle basi genetiche dell'ipertensione primaria

L'origine genetica dell'i.a. è confermata da diversi studi epidemiologici e genetici; inoltre sono stati individuati anche fattori di origine familiare, importanti per l'insorgenza dell'i.a. (Havlik *et al.*, 1979). Infatti, ricerche compiute su gemelli monozigotici ha portato alla conclusione che l'82% delle basi fisiopatologiche dell'i.a. sistolica è di origine genetica; inoltre esistono calcoli che fanno ammontare al 64% l'origine ereditaria dell'i.a. diastolica (Feinleib *et al.*, 1977). A questo si aggiungono dati che dimostrano come figli naturali e adottati, nell'ambito della stessa famiglia, non sembrano avere una correlazione con la pressione sanguigna (Biron *et al.*, 1976). Tali dati suggeriscono che il contributo genico nella determinazione della pressione sanguigna abbia una importanza maggiore rispetto a fattori di tipo ambientale (Kreutz *et al.*, 1992). Ancora una volta queste ricerche danno supporto all'ipotesi che esistono elementi genetici significativi nello sviluppo dell'i.a. In passato, la maggior parte degli studi sono stati effettuati come studi di associazione (in altre parole come studi di caso-controllo); questo approccio presenta però un grosso svantaggio dato che è molto difficile selezionare i controlli appropriati (Kreutz *et al.*, 1992): ad es., è stata discussa la correlazione tra pressione sanguigna e antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) che sono associati a numerosi e differenti malattie (Gerbase-Delima *et al.*, 1989). Nella maggior parte degli studi di maggiore impatto, non si riscontrano differenze significative tra pazienti ipertesi e gruppi di controllo (Svejgaard *et al.*, 1983).

Gli studi di *linkage* forniscono invece una evidenza più convincente circa la cosegregazione di un *locus* genico con l'i.a. In questo tipo di studi si confronta l'esistenza di un *marker* polimorfico, localizzato in prossimità del gene di interesse, con il fenotipo osservato; diviene in questo modo possibile la determinazione della cosegregazione del gene di elezione e del fenotipo di interesse. Parecchi studi condotti finora hanno potuto dimostrare una associazione tra i componenti del sistema RAS e l'i.a.; infatti, Jeunemaitre (Jeunemaitre *et al.*, 1992) ha dimostrato su due diverse popolazioni in Utah e Parigi, che la frequenza allelica del gene per l'angiotensinogeno è diversa nella popolazione normotesa in confronto con quella ipertesa. La variante genetica associata all'i.a. implica la sostituzione con treonina della metionina in posizione 235 dell'angiotensinogeno (tale mutazione viene indicata come M235T). Studi successivi hanno evidenziato sia il legame dello stesso allele con la preeclam-

psia (Ward *et al.*, 1993) sia i rapporti che legano i diversi alleli con significative variazioni della concentrazione plasmatica di angiotensinogeno (Jeunemaitre *et al.*, 1992). Tutto questo sostiene l'esistenza di una predisposizione ereditaria all'insorgenza di i.a. essenziale come confermano gli studi di Caulfield *et al.* (1994).

Nel 1992 sono stati pubblicati risultati sul polimorfismo dovuto ad inserzione/delezione (DI) nel gene dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE); secondo questi dati (Tiret *et al.*, 1992) mentre l'allele «I» mostra una inserzione genomica nell'introne 16, tale inserzione subisce una delezione nell'allele «D». Si possono dunque caratterizzare tre genotipi diversi: due forme omozigotiche (DD e II) ed una eterozigotica (DI); sebbene sia stata descritta una correlazione tra la forma DD e la concentrazione plasmatica di ACE, sino ad oggi non è stata osservata alcuna associazione con l'i.a. In ogni caso, Cambien e collaboratori (Cambien *et al.*, 1992) hanno suggerito che il genotipo DD potrebbe costituire un fattore di rischio per la malattia coronarica. Secondo questi ricercatori il genotipo DD è significativamente più frequente in pazienti con infarto cardiaco che in soggetti normali. Anche se studi più recenti hanno smentito questa associazione (Lindpaintner *et al.*, 1995), resta il fatto che, soprattutto nei post-infartuali di basso peso corporeo e di basso livello plasmatico di apolipoproteina B (ApoB), ossia nei pazienti che erano in precedenza considerati a basso rischio, la prevalenza del genotipo DD è estremamente elevata. Altri AA. hanno trovato questo polimorfismo genico associato con l'ipertrofia cardiaca come risulta da dati elettrocardiografici (Schunkert *et al.*, 1994). Tali studi implicano che il RAS svolge un ruolo non soltanto nell'i.a. sistemica ma anche nel danno terminale per l'organo come la sclerosi coronarica o l'ipertrofia cardiaca.

In alcuni ceppi di ratti, come ad es. nei ratti Dahl, sensibili ad alte concentrazioni di sale, o nei ratti SHR, esiste un polimorfismo di frammenti di restrizione (RFLP) del gene per la renina associato con l'i.a. (Kurtz *et al.*, 1990). Tuttavia questa associazione non è stata osservata nell'i.a. umana (Naftilan *et al.*, 1989), come confermano i dati di uno studio prospettico condotto su popolazioni ipertese e normotese (Soubrier *et al.*, 1990).

Studi di linkage nell'ipertensione sperimentale

In questo tipo di studio si usano normalmente ceppi di ratto normotese e ipertese. I ceppi sono incrociati con la finalità di produrre una generazione F_1 eterozigote che successivamente viene usata in incroci fratello/sorella. All'interno della popolazione F_2 che risulta da tali incroci si viene a determinare la possibilità di cosegregazione di certi alleli con pressione arteriosa elevata. Di solito si usano marker genetici sparsi su tutto il genoma di questi animali allo scopo di scoprire variazioni individuali all'interno del genoma stesso. Ad una maggiore distanza tra un marcatore genetico ed il gene da studiare, corrisponde una maggiore probabilità che il marker stesso ed il gene siano separati nel corso della ricombinazione meiotica.

Risultati degli studi di linkage

Due studi condotti in maniera indipendente (Hilbert *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991) hanno permesso l'identificazione di loci genetici attraverso incroci tra ratti spontaneamente ipertesi predisposti all'ischemia cerebrale (SHRSP) e ratti normotese di tipo Wistar-Kyoto (WKY). Due loci, noti come BP/SP-1 e BP/SP-2 risultavano significativamente correlati all'insorgenza dell'i.a. BP/SP-1 risultava localizzato sul cromosoma 10, nella regione che contiene i geni per l'ACE, per l'ormone della crescita e per il recettore del nerve growth factor; questa regione è omologa per sintenia

a quella situata sul braccio lungo del cromosoma 17 dell'uomo. BP/SP-2 era localizzato sul cromosoma X (Lindpaintner *et al.*, 1995). Nella generazione F_2 si notava una marcata differenza nelle risposte della pressione arteriosa dopo carico con NaCl; tale variabilità, inoltre, era da associare alla distribuzione di BP/SP-1. Il ruolo di questi due loci è drasticamente differente in quanto, mentre il primo locus sembra svolgere un ruolo di scarso rilievo nella variazione dei livelli basali di pressione arteriosa, al locus BP/SP-2, localizzato sul cromosoma X, veniva invece attribuito un ruolo fondamentale nelle variazioni della pressione arteriosa basale osservate nei ratti femmina della popolazione F_2 . Infatti, le femmine F_2 portatrici dell'allele SHRSP nel locus BP/SP-2 hanno pressione arteriosa elevata; tuttavia questi due loci non rendono conto di tutte le variazioni pressorie nella generazione F_2 , infatti è probabile che parecchi altri geni svolgano un ruolo importante nello sviluppo dell'i.a. in questi animali.

Un altro gene candidato a cosegregare con la pressione arteriosa elevata nei ratti Dahl sensibili al sale è quello della 11 β steroidoidrossilasi (Rapp e Dahl, 1972; Cicilia *et al.*, 1993). Le mutazioni descritte nella sequenza genica causano cambiamenti nella sequenza aminoacidica di questo enzima; si ritiene che tale variazione di sequenza sia responsabile dell'accumulo di 18-idrossi-deossicorticosterone (precursore del mineralcorticoide aldosterone) e quindi della ridotta concentrazione di aldosterone.

Come già discusso, è stato dimostrato già nel 1992, che il gene per l'angiotensinogeno è associato all'i.a. umana; recentemente, una associazione genica simile è stata studiata nella generazione F_2 di ratti incrociati appartenenti ai ceppi SHRSP e WKY (Hübner *et al.*, 1994). In questi animali si è proceduto alla misura della pressione arteriosa diastolica e sistolica, in presenza o assenza di carico di sodio alimentare e si determinava anche il peso dei ventricoli destro e sinistro. A differenza di quanto avviene nell'uomo, non è stato possibile stabilire alcuna relazione tra locus genico in esame e pressione arteriosa o massa ventricolare. Questi dati indicano che la dissezione genica dell'i.a. rappresenta uno strumento di ricerca assai utile ma pongono anche l'accento sul fatto che l'i.a. non ha soltanto origine poligenica, ma è anche una malattia di origine eterogenea; questo significa che in ceppi di ratti ipertesi, la causa di questa patologia potrebbe derivare da gruppi di geni diversi ma comunque implicati nell'insorgenza della stessa patologia.

Ratti transgenici come modelli nella ricerca dell'ipertensione

Negli animali transgenici si inserisce del materiale genetico esogeno, di solito un frammento genomico o un cDNA sotto il controllo di un promotore adeguato, nel genoma dell'animale ricevente. Con la trasmissione ereditaria del transgene alla generazione successiva, si ha lo stabilirsi di una linea transgenica. Questa tecnica può essere adottata in specie animali diverse, anche se il topo è quello che trova l'uso più frequente; in ogni caso, nelle ricerche sull'i.a., il ratto sembra essere un modello migliore che permette di adottare strategie di tipo farmacologico e fisiologico sull'animale intero. Inoltre, parecchi ceppi di ratto ipertesi, ad es. gli SHR, e di ratti normotese, come i WKY, sono stati sviluppati proprio con questa finalità e possono essere utilizzati come ceppi di riferimento.

Per la generazione di animali transgenici sono state descritte tecniche diverse: la prima prevede l'infezione delle cellule embrionali con un retrovirus; tale tecnica è stata adottata con successo per i topi transgenici (Hogan *et al.*, 1986; Jaenisch *et al.*, 1981). Un'altra, usa le cellule staminali transfettate in precedenza con il DNA di interesse (Wil-

liams, 1990); la terza tecnica, che è anche quella più comunemente adottata, fa ricorso alla microiniezione di DNA esogeno nel pronucleo degli oociti fecondati (Babinet *et al.*, 1989). A questo scopo viene indotta superovulazione somministrando gonadotropina di siero di cavalla incinta (PM-SG) in concomitanza con ormone follicolo stimolante (FSH): questo permette di ottenere un numero di oociti sufficiente con un potenziale di sviluppo normale. I ratti femmina in condizioni di superovulazione sono fatti accoppiare con maschi fertili, mentre allo stesso tempo femmine mature sono fatte accoppiare con maschi vasectomizzati: questo allo scopo di ottenere nutrici in cui è stato indotto uno stato di pseudogravidanza. Gli oociti vengono successivamente raccolti dopo asporto dell'ovidotto ed il DNA viene introdotto in questi stessi per microiniezione. Successivamente l'embrione è trasferito nell'ovidotto della madre adottiva: la presenza del transgene nel genoma della discendenza viene controllata attraverso l'analisi del DNA, ad es. mediante *southern blot* di prelievi biotipici operati sulla coda (fig. 6).

Il ratto transgenico TGR(mRen-2)27

La prima linea di ratti transgenici espressamente costruita per lo studio dell'i.a. è stata ottenuta con l'introduzione del gene murino *Ren-2* in oociti di ratto (Mullins *et al.*, 1990); questo gene, codificante per la renina, è presente in alcuni ceppi di topo come copia aggiuntiva probabilmente derivante da una duplicazione avvenuta nel corso dell'evoluzione. Dai cinque animali che avevano espresso il transgene (Ganten *et al.*, 1991) sono derivate tre discendenze di cui

quella denominata TGR(mRen-2)27 era composta sia da animali eterozigoti nei quali, all'età di 10 settimane, la pressione arteriosa poteva raggiungere i 240 mmHg, sia da animali omozigoti nei quali, accanto a valori pressori oscillanti intorno ai 300 mmHg, si osservava una elevata incidenza di manifestazioni ischemiche miocardiche e renali che potevano essere attenuate dal trattamento con farmaci antipertensivi.

In questi casi la particolare efficacia degli ACE inibitori e degli antagonisti dell'angiotensina II (ANG II) era un primo indizio sia del ruolo svolto dal RAS nella patogenesi di questi stati ipertensivi, sia del significato non solo analogico, ma anche patogenetico che l'i.a. di questi animali assumeva come modello sperimentale della patologia ipertensiva umana. Come nell'uomo, i livelli ipertensivi dei maschi erano più elevati di quelli delle femmine (Bader *et al.*, 1992), fenomeno questo riferibile all'azione stimolante degli androgeni sul RAS (Paul *et al.*, 1994); in effetti il trattamento con diidrotestosterone aggrava l'i.a. delle femmine, mentre la castrazione attenua quella dei maschi.

Ma il significato che questo modello assume nei confronti dell'i.a. umana deve soprattutto vedersi nei due aspetti che distinguono lo stato ipertensivo di questi animali: in primo luogo il basso livello circolante di renina e, in secondo luogo, il ruolo svolto dal RAS tessutale. Infatti, malgrado gli elevati livelli pressori, la concentrazione plasmatica di renina, ANG I e II era ridotta nei ratti transgenici che quindi assumono il significato di un modello di i.a. a basso livello circolante di renina (Ganten *et al.*, 1991); risultava elevata solo la prorenina, precursore inattivo della

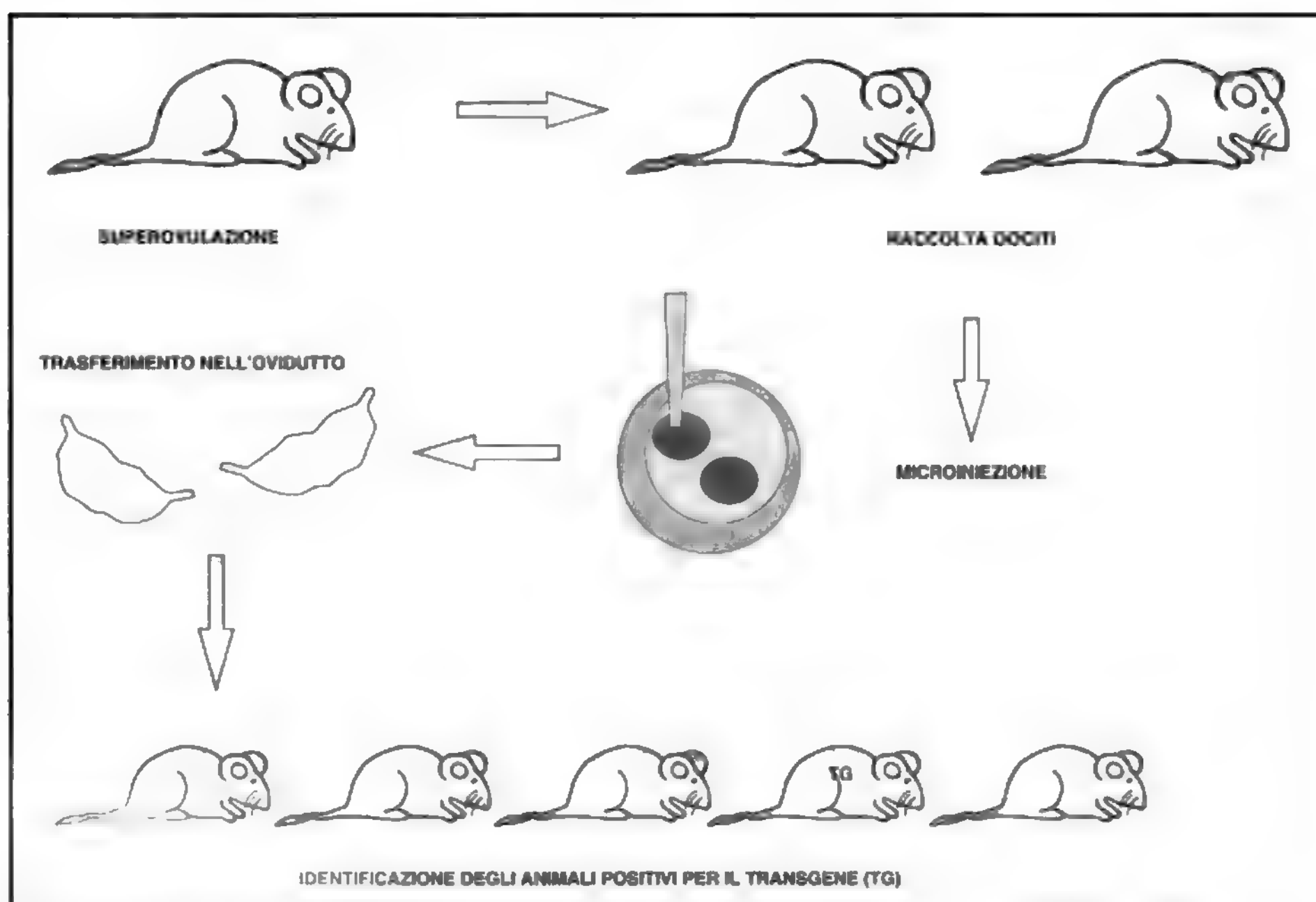


Fig. 6. Produzione di ratti transgenici

renina prevalentemente secreto dal surrene (Peters *et al.*, 1992). A livello tissutale l'espressione del transgene era particolarmente elevata nel surrene, ma era pure evidente nel sistema gastrointestinale, nel cervello e anche nel rene, sede classica di origine della renina, ove l'attività reninica endogena risultava ridotta.

È possibile che il surrene, ove l'espressione del transgene è la più elevata, svolga un ruolo nella patogenesi di questo modello di i.a., come suggerisce sia la normalizzazione dei valori pressori che segue la surrenectomia, sia l'elevata escrezione urinaria di corticosteroidi, che accompagna lo sviluppo dell'i.a. nei ratti giovani per poi normalizzarsi una volta stabilizzato lo stato ipertensivo negli animali adulti (Sander *et al.*, 1992); tuttavia i rapporti fra RAS e cortico-surrene richiedono ulteriori chiarimenti in considerazione dell'attenuazione dello stato ipertensivo indotta dal desametasone (Djavidani *et al.*, 1992) e dalla sua persistenza in corso di trattamento con spironolattone (Bachmann *et al.*, 1992).

Gli effetti della terapia antipertensiva sugli animali di questo ceppo hanno messo in evidenza il carattere tessuto-specifico della regolazione del RAS tissutale e il ruolo che questo sistema svolge nella patogenesi della cardiomiopatia ipertensiva. In corso di terapia con un ACE inibitore (lisinopril) si verifica un sostanziale aumento dell'espressione renale del transgene e del gene endogeno per la renina, che risultano quindi entrambi sottoposti al fisiologico *feed-back* negativo esercitato dall'ANG II (Lee *et al.*, 1995), mentre non si modifica quella dell'angiotensinogeno. Questi effetti sono specificamente riferibili all'inibizione dell'ACE in quanto la diidralazina, pur abbassando la pressione arteriosa, non modifica l'espressione renale di renina e di angiotensinogeno. D'altra parte, a livello miocardico lo stesso trattamento con lisinopril non modifica l'espressione di renina, mentre riduce nettamente quella dell'angiotensinogeno. Questi effetti sono profondamente diversi da quelli della diidralazina che non modifica l'espressione miocardica di renina mentre aumenta nettamente quella di angiotensinogeno. Le modificazioni dell'angiotensinogeno miocardico indotte dal trattamento antipertensivo risultano nettamente correlate agli effetti che lo stesso trattamento ha sull'ipertrofia miocardica: significativamente ridotta dal trattamento con lisinopril, essa si accentua negli animali trattati con diidralazina (Lee *et al.*, 1995).

L'ipertrofia miocardica non può dunque considerarsi conseguenza dello stato ipertensivo (essa del resto si sviluppa in una età nella quale l'i.a. non è ancora stabilizzata) ma sembra dipendere dalle modificazioni dell'attività del RAS locale. Fra i componenti del RAS coinvolti nell'ipertrofia cardiaca, all'aumento dei livelli locali di ANG II sembra doversi riconoscere una posizione di indiscutibile rilievo (Schelling *et al.*, 1991); lo sostiene anche la regressione dell'ipertrofia indotta dal lisinopril. Resta tuttavia da chiarire il ruolo svolto sia da altri componenti di questo sistema (ACE è presente in concentrazioni superiori alla norma in molti tessuti di questi animali) sia in quelli di altri sistemi vasoattivi (elevati livelli di endotelina I sono stati rilevati nel tessuto miocardico). Ma l'esistenza di RAS locali (Higashimori *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1995) modulati da meccanismi tessuto-specifici e coinvolti nella patologia ipertensiva cardiaca e renale, pur se negati da diversi AA. (von Lutterotti *et al.*, 1994), trova in questo ceppo transgenico chiare evidenze sperimentali e indica quanto riduttivo possa essere nello studio della patologia cardiovascolare limitare le ricerche ai componenti circolanti del RAS.

Animali transgenici che esprimono il gene umano per la renina

Topi (Fukamizu *et al.*, 1991) e ratti (Ganten *et al.*, 1992) transgenici per il gene umano della renina la esprimevano in forma tessuto- e cellulo-specifica. L'espressione più elevata del transgene si aveva infatti nel rene ove è stata individuata la sede di sintesi nel sistema iuxtaglomerulare mediante l'uso di anticorpi (topo) o per ibridazione *in situ* (ratto). Nelle due linee di ratti transgenici ottenute in questi studi, una presentava livelli plasmatici di renina di origine transgenica di poco inferiori a quelli dell'uomo, mentre nell'altra questi livelli erano 12 volte più alti di quelli dell'uomo. Ciò nondimeno i ratti erano normotesi e avevano normali livelli circolanti di ANG I e II. Questo indica una incompatibilità fra renina umana e angiotensinogeno del ratto. Tuttavia una dieta iposodica determinava un evidente ed equivalente aumento in circolo della renina umana e di quella di ratto: il transgene risponde dunque allo stimolo fisiologico senza che vi siano interferenze da parte della sintesi di renina endogena (Paul *et al.*, 1994).

Animali transgenici che esprimono il gene dell'angiotensinogeno

Topi transgenici per il gene dell'angiotensinogeno del ratto sotto il controllo del promotore del topo indotto dalla metallotioneina non erano ipertesi anche dopo infusione di $ZnSO_4$ che stimola il promotore (Ohkubo *et al.*, 1990). Incrociati con topi transgenici portatori del gene della renina di ratto sotto il controllo dello stesso promotore, essi hanno dato origine a una progenie F_1 ipertesa nella quale l'i.a. veniva aggravata dall'infusione di $ZnSO_4$ e attenuata dal trattamento orale con un ACE antagonista (captopril). In questi animali l'i.a. appare legata all'interazione a livello plasmatico fra i due componenti transgenici del RAS.

Diverso risulta il quadro ipertensivo e la sede di interazione fra i componenti del RAS in un ceppo transgenico di topo portatore del gene della renina del ratto sotto il controllo del promotore originale del ratto (Kimura *et al.*, 1992). In questo ceppo gli animali erano ipertesi e l'espressione dell'angiotensinogeno transgenico era elevata nelle sedi in cui è normalmente presente l'angiotensinogeno (fegato, cervello, cuore), mentre i livelli plasmatici erano paragonabili a quelli dei portatori del gene sotto il controllo del promotore metallotioneico. Si può dunque ritenere che nel ceppo studiato da Kimura *et al.* lo stato ipertensivo sia da ricondursi all'attivazione del RAS tissutale e che a questa stessa attivazione possa attribuirsi l'ipertrofia cardiaca evidente in questi animali.

Sono anche stati ottenuti topi e ratti transgenici portatori del gene umano per l'angiotensinogeno. Nei topi l'espressione del transgene, particolarmente elevata a livello epatico, era evidente anche in altri organi (cervello, rene, cuore). Nei ratti si sono evidenziati livelli plasmatici di angiotensinogeno variabili, ma sempre più elevati di quelli misurati nell'uomo. Il fatto che questi ratti non fossero ipertesi sta a indicare una incompatibilità di specie fra angiotensinogeno umano e RAS del ratto: in effetti i livelli circolanti di ANG II in questi animali non si differenziavano da quelli dei controlli (Ganten *et al.*, 1992). Di questa incompatibilità può considerarsi ulteriore espressione l'assenza di i.a. nei ratti transgenici portatori del gene della renina umana (v. sopra).

Prospettive future sulla genetica della malattia ipertensiva

Nella futura ricerca l'individuazione dei geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'i.a. costituisce uno dei più promettenti obiettivi. In questo campo i topi transgenici

hanno fornito spunti e orientamenti volti a creare nei ratti più consistenti modelli di malattia ipertensiva.

Uno degli obiettivi di questa ricerca riguarderà le endoteline (ET) (v. ENDOTELIO**; VASCOLARI VASOATTIVI FATTORI**), peptidi composti da 21 aminoacidi delle quali si conoscono diversi tipi (ET 1, 2, 3). Del sistema delle ET sono stati individuati i recettori specifici e l'enzima di conversione delle ET (ECE). Esse sono i più potenti vasocostrittori attualmente noti e sono capaci di indurre ipertrofia vascolare: queste proprietà ne suggeriscono il coinvolgimento nella patogenesi dell'i.a. dell'uomo e degli animali (Schiffrin, 1995). I dati attualmente disponibili sono in parte a favore e in parte contro questa possibilità. Così nei ratti ipertesi da deossicorticosterone-NaCl (Dahl) esiste una elevata concentrazione vascolare di proteine endoteliniche e del relativo mRNA. In questi animali l'infusione di un antagonista delle ET attenuava l'i.a. e l'ipertrofia vascolare. D'altra parte, ceppi SHR non presentavano livelli elevati di ET e del relativo mRNA; in questi animali il prolungato trattamento con antagonisti delle ET risultava inefficace nel ridurre la pressione arteriosa (Lariviere *et al.*, 1993). Chiarimenti in questo campo potranno venire dallo studio di un ceppo di ratti transgenici portatori del gene per ET 2 (Fukamizu *et al.*, 1991). Dai ratti transgenici si potranno trarre utili informazioni sul significato fisiologico e fisiopatologico dell'ANP, ormone principalmente sintetizzato dai cardiomiociti atriali e dotato di azione ipotensiva arteriosa principalmente legata ai suoi effetti diuretici e natriuretici. Sono stati prodotti topi transgenici per identificare il promotore del gene dell'ANP che ne condiziona l'espressione tessuto-specifica (Seidman *et al.*, 1984). Sotto il controllo del promotore indotto dalla transtiretina l'espressione del gene era elevata nel fegato (Steinhelper *et al.*, 1990). Nei topi adulti la concentrazione dell'ANP plasmatico era 8 volte più elevata che nei controlli e si associava a uno stato ipotensivo non accompagnato da variazioni della frequenza cardiaca o dell'equilibrio elettrolitico.

In rapporto all'ormai accettata esistenza di un RAS locale cardiaco, sono stati condotti studi sulla chimasi cardiaca dell'uomo, il più specifico degli enzimi che generano ANG II (Urata e Ganten, 1993). Questa serinproteasi è presente nello spazio extracellulare del miocardio (Urata *et al.*, 1992), mentre l'ACE è localizzato sul lato lumenale della membrana delle cellule endoteliali; questo può riflettere il diverso ruolo fisiologico dei due enzimi: mentre l'ACE sembra essere responsabile della formazione di ANG II plasmatica, la chimasi cardiaca sarebbe coinvolta nelle funzioni locali del RAS. Inoltre la chimasi umana è principalmente localizzata nei ventricoli e non è influenzata dagli ACE inibitori, mentre l'ACE è prevalentemente espressa a livello atriale. Questo potrebbe da un lato spiegare l'attività antiaritmica degli ACE inibitori e dall'altro suggerire la loro inefficacia o scarsa efficacia nel contrastare gli effetti ipertrofizzanti dell'ANG II sul cuore insufficiente (Urata *et al.*, 1989). È chiaro che lo sviluppo di ratti transgenici che esprimano la chimasi cardiaca umana potrebbe chiarire i rapporti fra i due enzimi e illuminarci sul ruolo della chimasi cardiaca nella patogenesi dell'i.a.

Altrettanto importante è il problema delle sequenze dei promotori che controllano l'espressione dei geni nei miociti e nelle cellule miocellule vasali. Al fine di controllare se l'espressione di un gene nelle sedi prescelte, il promotore viene combinato con un gene di riferimento, come quello per la fosforilasi per l'acido lattico, il caso del cloramfenicolo (Lee *et al.*, 1992; Seidman *et al.*, 1984), enzimi la cui presenza può essere evidenziata con metodi di facile esecuzione. Finora sono stati utilizzati i promotori dell'ANP e della catena leggera 2 della miosina che potranno permettere di creare

TAB. VII. ANIMALI TRANSGENICI NELLA RICERCA SULL'IPERTENSIONE ARTERIOSA

Sequenza codificante	Promotore	Specie
Ren-2 topo	Ren-2	topo
	Ren-2	ratto
Renina umana	Renina umana	topo
	Renina umana	ratto
	Metallotioneina	topo
	Metallotioneina	ratto
Angiotensinogeno ratto	Metallotioneina	topo
	Angiotensinogeno ratto	topo
Angiotensinogeno umano	Angiotensinogeno umano	topo

nuovi modelli animali caratterizzati da una sovraespressione del gene esclusivamente localizzata a livello cardiaco.

Fra le metodologie dell'ingegneria genetica, l'introduzione di mutazioni nelle cellule germinali potrà portare alla creazione di animali cosiddetti *knockout*. In questi casi si fa ricorso alla ricombinazione omologa di cellule staminali di origine embrionale (Robertson, 1991). Questa tecnica è stata finora applicata nel topo. Un'altra metodologia mira a influenzare l'espressione genica inattivandola o sopprimendola con la microiniezione di ribozimi antisense. Questi costrutti sono diretti contro particolari sequenze del gene in esame del quale inibiscono l'espressione. L'applicazione *in vivo* di questa tecnica ha finora avuto scarsi successi (Katsuki *et al.*, 1988).

Gli animali transgenici (tab. VII) hanno dunque aperto nuove prospettive allo studio dei meccanismi coinvolti nell'i.a. cronica. Sul piano clinico è d'altra parte evidente che una più approfondita conoscenza delle basi genetiche e quindi della fisiopatologia dell'i.a. rimane ancor oggi l'obiettivo di un'azione volta a migliorare la prevenzione, la diagnosi e la terapia di questa patologia.

Per i rapporti tra la componente genetica dell'i.a. e la componente ambientale, cfr. Ambrosioni (1996) e Giuliano *et al.* (1996).

Bibliografia

- Ambrosioni E., *Ann. It. Med. Inter.*, 1996, **11** (2), 87-89.
 Bahnet C., Morello D., Renart J., *Genome*, 1989, **31**, 938-949.
 Bachmann S., Peters J., Engler E. *et al.*, *Kidney Int.*, 1992, **41**, 24-36.
 Bader M., Zahor Y., Sander M. *et al.*, *Hypertension*, 1992, **19**, 681-686.
 Biron P., Monageau J., Bertrand D., *Can. Med. Assoc. J.*, 1976, **115**, 773-774.
 Burt V., Wehlton P., Roccella E. *et al.*, *Hypertension*, 1995, **25**, 305-313.
 Cambien F., Poirier O., Lecerf L. *et al.*, *Nature*, 1992, **359**, 641-644.
 Caulfield M., Lavender P., Farrall M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1629-1633.
 Cicilia G., Rapp J., Wang J. *et al.*, *Nat. Genet.*, 1993, **3**, 346-353.
 Djavidani B., Sanders M., Böhm M. *et al.*, *J. Hypertension*, 1992, **10** (suppl. 4), 10.
 Feinleib M., Garrison R., Fabsitz R. *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 1977, **106**, 284-295.
 Fukamizu A., Hatae T., Kon Y. *et al.*, *Biochem. J.*, 1991, **278**, 601-603.
 Ganten D., Takahashi S., Lindpaintner K., Mullins J., *Hypertension*, 1991, 1991, **18**:111, 108-114.
 Ganten D., Wagner J., Zeh K. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 7806-7810.
 Gerbase-Delima M., Delima J., Persoli *et al.*, *Hypertension*, 1989, **14**, 604-609.
 Giuliano R., Damiani S., Cattani H., Brenzi G., *Ann. It. Med. Inter.*, 1996, **11** (2), 95-106.
 Havlik R., Garrison R., Feinleib M. *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 1979, **110**, 304-312.

- Higashimori K., Gante J., Holzemann G., Inagami T., *Hypertension*, 1991, **17**, 270-277.
- Hilbert P., Lindpaintner K., Beckmann J. et al., *Nature*, 1991, **353**, 521-529.
- Hogan B., Constantini F., Lacy E., *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*, 1986, Cold Spring Harbor Lab. Press, Spring Harbor, 52-75.
- Hübner N., Kreutz R., Takahashi S. et al., *Hypertension*, 1994, **23**, 797-801.
- Jacob H., Lindpaintner K., Lincoln S. et al., *Cell*, 1991, **67**, 213-224.
- Jaenisch R., Jahner D., Nobis P. et al., *Cell*, 1981, **24**, 519-529.
- Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y. et al., *Cell*, 1992, **71**, 169-180.
- Katsuki M., Sato M., Kimura M. et al., *Science*, 1988, **241**, 593-595.
- Kimura S., Mullins J., Bunnemann B. et al., *EMBO J.*, 1992, **11**, 821-827.
- Kreutz R., Higuchi M., Ganten D., *Clin. Exp. Hypertens. A*, 1992, **14**, 15-34.
- Kurtz T., Simonet L., Kabra P. et al., *J. Clin. Invest.*, 1990, **85**, 1328-1332.
- Larivière R., Thibault G., Schiffrin E., *Hypertension*, 1993, **21**, 294-300.
- Lee K., Ross R., Rockman H. et al., *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 15875-15885.
- Lee M., Böhm M., Shokei K. et al., *Hypertension*, 1995, **25**, 570-580.
- Lindpaintner K., Pfeiffer M., Kreutz R. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 706-711.
- Lindpaintner K., Kreutz R., Ganten D., *Genetic of Hypertension*, in Haber E. ed., *Molecular Cardiovascular Medicine*, 1995, Scientific American, New York, pp. 243-257.
- Mullins J., Peters J., Ganten D., *Nature*, 1990, **344**, 541-544.
- Naftilan A., Williams R., Burt D. et al., *Hypertension*, 1989, **14**, 614-618.
- Ohkubo H., Kawakami H., Kakehi Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, **87**, 5153-5157.
- Paul M., Wagner J., Hoffman S. et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 1994, **56**, 811-829.
- Peters J., Munter K., Bader M. et al., *J. Clin. Invest.*, 1992, **91**, 251-257.
- Peters J., Sanders M., Munter K. et al., *The role of adrenal renin in steroid metabolism and development of hypertension in transgenic rats TGR(mREN2)27*, in: Sassard J. ed., *Colloque INSERM, Vol. 218: Genetic Hypertension*, 1992, John Libbey Eurotext, Paris 345-347.
- Rapp J., Dahl L., *Nature*, 1972, **237**, 338-339.
- Robertson E., *Biol. Reprod.*, 1991, **44**, 238-245.
- Sander M., Bader M., Djavidani B. et al., *Endocrinology*, 1992, **131**, 807-814.
- Schelling P., Fischer H., Ganten D., *J. Hypertens.*, 1991, **9**, 3-15.
- Schiffrin E., *Hypertension*, 1995, **25**, 1135-1143.
- Schmidt S., Ganten D., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1994, **9**, 473-474.
- Schunkert H., Hense H., Holmer S. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1634-1638.
- Seidman C., Bloch K., Klein J. et al., *Science*, 1984, **226**, 1206-1209.
- Soubrier F., Jeunemaitre X., Rigat B. et al., *Hypertension*, 1990, **16**, 712-717.
- Steinhelper M., Cochrane K., Field L., *Hypertension*, 1990, **16**, 301-307.
- Stock P., Leifeldt L., Paul M., Ganten D., *Cardiology*, 1995, **86** (suppl. 1), 2-8.
- Svejgaard A., Platz P., Ryder L., *Immunol. Rev.*, 1983, **70**, 193-218.
- Tiret L., Rigat B., Vissikis S. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, **51**, 197-205.
- Urata H., Ganten D., *Eur. Heart J.*, 1993, **14** (suppl. 1), 177-182.
- Urata H., Healy B., Stewart R. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1989, **69**, 54-66.
- Urata H., Kinoshita A., Bumpus F. et al., *J. Hypertens.*, 1992, **10** (suppl. 4), 9.
- von Lutterotti N., Catanzaro D., Sealy J., Laragh H., *Circulation*, 1994, **89**, 493-498.
- Ward K., Hata A., Jeunemaitre X. et al., *Nat. Genet.*, 1993, **4**, 59-61.
- Williams D., *Bone Marrow Transpl.*, 1990, **5**, 141-144.

DIRK ENDEMAN, MARTIN PAUL E DETLEV GANTEN

IPERTENSIONE ARTERIOSA DELL'ANZIANO

SOMMARIO

Introduzione (col. 2898). - **Modificazioni cardiovascolari età-dipendenti** (col. 2898). - **Studi clinici sull'intervento farmacologico** (col. 2901). - **Problemi specifici dell'anziano iperteso** (col. 2902). - **Misura della pressione arteriosa negli anziani** (col. 2903). - **Terapia antipertensiva dell'anziano** (col. 2906): **Diuretici**. - **Betabloccanti**. - **Inibitori dell'enzima di conversione (ACE-inibitori)**. - **Calcioantagonisti**. - **Bloccanti dei recettori alfa post-sinaptici**. - **Scelta del farmaco antipertensivo** (col. 2908).

Introduzione

Introduzione

Numerosi studi epidemiologici trasversali e longitudinali hanno evidenziato nei paesi industrializzati l'aumento che la pressione arteriosa subisce con l'avanzare dell'età. In particolare si osserva un aumento della pressione arteriosa sistolica fino al 7°-8° decennio di vita, e di quella diastolica fino al 5° decennio, cui fa seguito una stabilizzazione nel 6° decennio e una riduzione in quelli successivi. Le nostre conoscenze sono più limitate per i soggetti di età più avanzata (9°-10° decennio), nei quali sembra ridursi anche la pressione sistolica oltre a quella diastolica. Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che il rischio di complicazioni cardiovascolari mortali e non-mortali aumenta col crescere dei valori sistolici e diastolici e che questo incremento è particolarmente accentuato nelle persone anziane (fig. 7).

Ciò nonostante il principio di ridurre i valori pressori elevati per diminuire il rischio cardiovascolare non è stato facilmente e immediatamente accettato per l'anziano iperteso, come invece era accaduto per gli ipertesi adulti e giovani. Alcune modificazioni età-dipendenti dell'apparato cardiocircolatorio sono state causa di perplessità o di cautela per molti medici e hanno ritardato l'accettazione dell'indicazione al trattamento dell'anziano iperteso, trattamento che ha trovato valido sostegno in diversi studi epidemiologici e preciso inquadramento nelle linee guida che ne orientano l'approccio farmacologico.

Modificazioni cardiovascolari età-dipendenti

Anche in assenza di processi patologici, l'invecchiamento di per sé comporta importanti modificazioni strutturali e funzionali del sistema cardiovascolare. Tuttavia non è sempre facile distinguere le modificazioni dovute all'età, da quelle invece secondarie a malattie concomitanti come l'aterosclerosi, lo scompenso cardiaco o il diabete mellito che si riscontrano frequentemente nelle persone anziane. Inoltre, a differenza di quella che è una opinione abbastanza diffusa, le modificazioni età-dipendenti non sono generalizzate a tutte le funzioni corporee, ma al contrario possono interessare le diverse funzioni in tempi e con intensità differenti.

Per quanto riguarda l'apparato cardiovascolare è necessario distinguere le modificazioni strutturali da quelle funzionali, che comprendono anche i fattori umorali e renali coinvolti nell'omeostasi cardiocircolatoria. L'invecchiamento cardiaco comporta significative modificazioni strutturali con aumento del peso del cuore e comparsa di un lieve grado di ipertrofia cardiaca, con aumento del contenuto di grasso ma non di collagene (Miller et al., 1986). A carico delle fibrocellule muscolari compaiono depositi di pigmento di lipofucsina e degenerazioni basofile, ma, in assenza di patologia concomitante cardiaca, non è presente un incremento del volume tele-diastolico e tele-sistolico (Rodeheffer et al., 1984).

Dal punto di vista funzionale, a riposo la frequenza cardiaca ed il riempimento protodiastolico si riducono solo in grado minore, mentre la funzione sistolica (frazione di eiezione, gettata sistolica e lavoro sistolico) è solo minimamente o per nulla modificata. Al contrario, durante l'esercizio si osservano modificazioni cardiache più evidenti: innanzitutto l'aumento della frequenza cardiaca è decisamente minore ed anche molti indici di contrattilità miocardica aumentano in grado inferiore nei confronti dei giovani e degli adulti. Per assicurare un adeguato apporto di ossigeno ai tessuti durante l'esercizio, il cuore senile tende ad aumentare il diametro ventricolare telediastolico, sfruttando

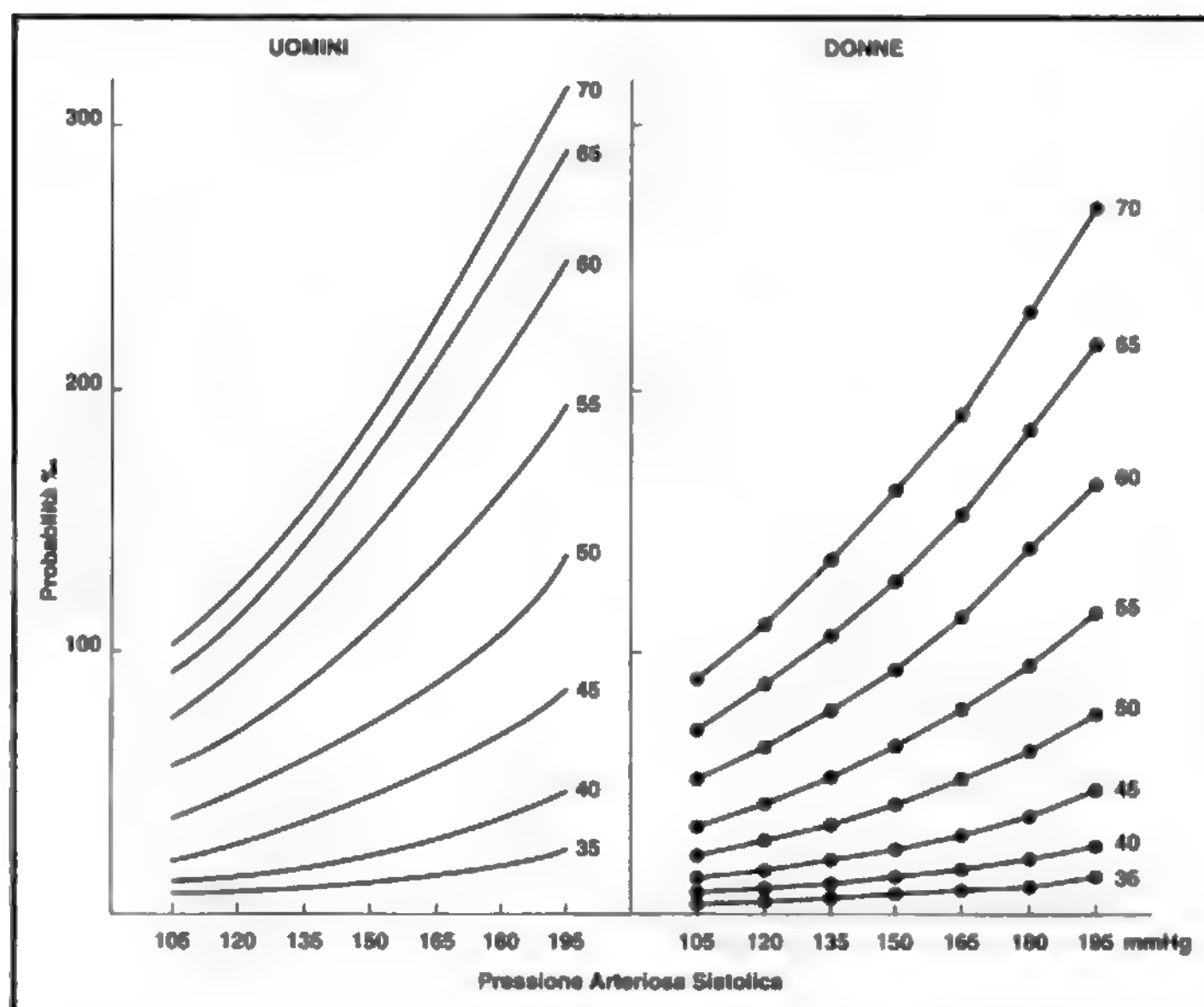


Fig. 7. Probabilità dell'insorgenza di complicazioni cardiovascolari negli uomini e nelle donne in funzione dei valori pressori sistolici e dell'età (studio di Framingham).

così il meccanismo di Starling per compensare il ridotto inotropismo e cronotropismo cardiaco.

Eguale a quanto accade a livello cardiaco, un lieve grado di ipertrofia età-dipendente si osserva anche a carico dell'intima e della media (ma non dell'avventizia) delle arterie che tendono ad essere anche allungate e tortuose. Vi sono pure irregolarità nella forma e nella grandezza delle cellule endoteliali, insieme a frammentazione e calcificazione dell'elastina (Stemermann *et al.*, 1982).

Un aumento della rigidità vascolare con l'età è un reperto universalmente riscontrato ed emodinamicamente importante anche se è ancora dibattuto se sia età-dipendente oppure causato dal sovraccarico di lavoro sui vasi (Roach *et al.*, 1959; Roy, 1983). L'aumentata rigidità delle arterie comporta un proporzionale incremento della velocità dell'onda sfigmica. L'avvento delle tecniche ultrasonografiche e di registrazione indiretta battito a battito della pressione arteriosa dovrebbe aiutare a valutare se l'aumento della rigidità vasale con l'invecchiamento è ubiquitario e, eventualmente, di simile entità. A causa dell'aumentata rigidità delle arterie e, in parte, dell'ipertrofia delle arteriole di piccolo calibro, le resistenze totali periferiche sono modestamente elevate nell'età più avanzata, mentre il volume ematico totale e quello circolante sono in parte ridotti e ciò può comportare una modificazione parziale dell'emodinamica regionale.

Accanto alle modificazioni strutturali e funzionali del cuore e dei vasi, si osservano alterazioni dei fattori umorali che svolgono un ruolo importante nella regolazione cardiovascolare. Il livello plasmatico delle catecolamine aumenta con l'età e questo può essere dovuto, almeno per la norepinephrina, sia ad una riduzione della clearance (o eliminazione) che ad un aumento dello spillover (sfuggita) dalle terminazioni nervose, con deplezione del contenuto tissutale di catecolamine (Ziegler *et al.*, 1976; Esler *et al.*, 1981).

Anche i livelli basali di vasopressina e quelli dopo restrizione di acqua sono più elevati nel soggetto anziano che nel giovane o nell'adulto: nonostante ciò gli anziani accusano meno la sensazione di sete durante il periodo della restrizione di acqua ed introducono meno acqua alla fine della prova (Helderman *et al.*, 1978). In contrapposto all'aumento delle catecolamine e della vasopressina, il sistema renina-angiotensina è depresso negli anziani, sia in condizioni basali che durante la stimolazione ortostatica, la deplezione sodica o l'emorragia (Hayduk *et al.*, 1973), mentre il fattore natriuretico atriale aumenta col crescere dell'età (MacKnight *et al.*, 1989).

Con l'età vi è una riduzione del 20-30% della massa renale più accentuata a carico della corticale che della midollare. Il numero dei nefroni si riduce, prevalentemente quello degli iuxtamidollari che, con la loro lunga ansa di Henle, svolgono un ruolo importante nei meccanismi di concentrazione delle urine. Inoltre nei glomeruli residui si osservano sclerosi o perdita delle anse capillari, insieme ad un aumento della componente mesangiale. Il flusso ematico renale si riduce di circa il 10% per ogni decennio di vita a partire dagli anni trenta e la clearance della creatinina endogena diminuisce dell'1% per ogni anno a partire dagli anni quaranta e fino ai novanta. Il mancato aumento concomitante della creatininemia è da imputare al ridotto catabolismo endogeno per riduzione delle masse muscolari. La riduzione del filtrato glomerulare con l'età può comportare una diminuzione della eliminazione dei farmaci escreti per via renale.

L'estrema labilità o variabilità è l'aspetto caratteristico della funzione circolatoria del soggetto anziano: marcate riduzioni dei valori pressori possono essere osservate in risposta all'assunzione della posizione ortostatica, a emorragia, a deplezione idro-salina. Al contrario, la variabilità della frequenza cardiaca è ridotta nei soggetti anziani.

I meccanismi responsabili della alterata omeostasi circolatoria nei soggetti anziani sono complessi e conosciuti solo in parte: una ridotta efficienza dei riflessi cardiovascolari è stata dimostrata, anche se la compromissione dei vari riflessi non è uniforme.

In conclusione, l'avvento di tecniche più specifiche e sensibili, ha permesso di definire le complesse e diversificate modificazioni del sistema cardiovascolare associate con l'età, che oggi si possono così riassumere: 1) gettata cardiaca ridotta a riposo e durante sforzo; 2) lieve aumento della massa ventricolare sinistra e delle resistenze vascolari periferiche; 3) riduzione della perfusione tessutale e della riserva funzionale di vari organi e sistemi; 4) relativa ipovolemia e depressione del sistema renina-angiotensina; 5) compromissione dei riflessi cardiopolmonari e barocettoriali arteriosi; 6) iperattività del sistema simpatico e ipofunzione del sistema nervoso parasimpatico e 7) compromissione dell'omeostasi circolatoria con conseguente aumento della variabilità pressoria spontanea e con esagerata risposta ipotensiva a vari stimoli, quali ortostatismo, assunzione del cibo, restrizione di sodio. L'estrema complessità dell'omeostasi circolatoria e le modificazioni dei vari componenti organici ed umorali associati all'età possono in parte giustificare le perplessità che hanno avuto (e che forse ancora hanno) molti medici nell'accettare l'indicazione al trattamento farmacologico anche per gli anziani ipertesi. D'altra parte questo complesso di cose giustifica l'estrema cautela che si impone nel classificare un anziano come iperteso e nel far ricorso a farmaci antipertensivi, una volta che la diagnosi di ipertensione arteriosa sia stata correttamente posta.

Studi clinici sull'intervento farmacologico

Il significato di fattore di rischio cardiovascolare assegnato dagli studi epidemiologici all'aumento della pressione arteriosa non implica necessariamente che la normalizzazione dei valori pressori si associ alla diminuzione o scomparsa degli eventi cardiovascolari.

Numerosi studi hanno preso in esame, anche in passato, gli effetti di un trattamento farmacologico antipertensivo. Tuttavia la ridotta numerosità della casistica e/o la durata limitata della sperimentazione non avevano permesso di giungere a conclusioni definitive. Al fine di aumentare la numerosità dei pazienti studiati e pertanto la potenza statistica è stata effettuata una metanalisi (Van Hoof *et al.*, 1995) comprendente 8 studi diversi (Veterans Administration Cooperative Study Group on Anti-hypertensive Agents, 1972; Hypertension-Stroke Cooperative Study Group, 1974; Kuramoto *et al.*, 1981; Management Committee, 1981; Amery *et al.*, 1985; Coope *et al.*, 1986; Dahlöf *et al.*, 1991; MRC Working Party, 1992). Dai risultati di questa metanalisi che ne aggiorna una precedente della fine degli anni 80, si evidenzia che (tab. VIII) le mortalità cardiovascolare, cerebrovascolare e coronarica sono significativamente ridotte nei pazienti trattati con farmaci antipertensivi rispetto a quelli che invece assumevano placebo, mentre la riduzione della mortalità totale non raggiunge la significatività statistica. Probabilmente a causa della eterogenea definizione degli eventi cardiovascolari non mortali nei diversi studi, non è stato possibile eseguire una analisi statistica separata per questi eventi.

L'ipertensione sistolica isolata, definita come valore sistolico superiore a 160 mmHg e diastolico inferiore a 90 o 95 mmHg, costituisce un importante fattore di rischio cardiovascolare, anche più importante della ipertensione diastolica (Staessen *et al.*, 1991). Particolarmente frequente nelle persone anziane, essa è riconducibile alla ridotta distensibilità delle arterie di grosso calibro ed ha creato le

TAB. VIII. METANALISI DI 8 STUDI EPIDEMIOLOGICI NEGLI ANZIANI IPERTESI. MODIFICAZIONI DELLA MORTALITÀ

Mortalità totale	-9%	612/546	n.s.
Mortalità non-cardiovascolare	+11%	230/256	n.s.
Mortalità cardiovascolare	-22%	372/287	p < 0,05
Mortalità coronarica	-26%	197/141	p = 0,04
Mortalità cerebrovascolare	-33%	105/69	p < 0,05

Sono riportati per ogni *end-point* le variazioni percentuali tra trattamento attivo e placebo ed il numero degli eventi nel gruppo placebo ed in quello con trattamento attivo.

maggiori perplessità ai medici sull'opportunità di instaurare un trattamento farmacologico.

Lo studio SHEP americano (*Systolic Hypertension in the Elderly Program*) ha affrontato specificatamente il problema dell'ipertensione sistolica isolata nell'anziano (SHEP Cooperative Research Group, 1991) e, grazie alla numerosità della popolazione studiata (oltre 4.000 anziani), ha permesso di giungere a conclusioni clinicamente rilevanti. Nei soggetti sottoposti a trattamento antipertensivo si è osservata una riduzione statisticamente significativa degli eventi cardiovascolari, coronarici e cerebrovascolari, mentre la riduzione della mortalità totale non ha raggiunto la significatività statistica.

Gli studi clinici di intervento farmacologico permettono dunque di concludere che il trattamento dell'anziano con ipertensione sisto-diastolica o sistolica isolata riduce significativamente il rischio cardiovascolare, anche se vi sono notevoli discrepanze fra i risultati dei vari studi, forse imputabili alla popolazione studiata, ai trattamenti impiegati, agli *end-points* previsti, ai valori pressori all'inizio dello studio stesso.

Problemi specifici dell'anziano iperteso

I risultati incoraggianti degli studi di intervento farmacologico nell'anziano iperteso meritano qualche osservazione particolare in rapporto alle modificazioni senili, strutturali e funzionali, dell'apparato cardiocircolatorio.

Il primo problema riguarda i limiti entro i quali è giustificato instaurare un trattamento antipertensivo, anche alla luce di uno studio finlandese che ha evidenziato una sopravvivenza direttamente correlata ai valori pressori sistolici o diastolici nei soggetti di età superiore a 85 anni (Mattiila *et al.*, 1988). Negli 8 studi considerati nella metanalisi di Van Hoof *et al.* (1995), tutti i pazienti avevano una età superiore a 60 anni, ma solo in 3 studi erano stati ammessi pazienti con età superiore a 80 anni mentre in quello più numeroso (MRC Working Party, 1992), l'età era compresa tra 65 e 74 anni. Nello studio EWPHE (Amery *et al.*, 1985) e nello studio STOP (Dahlöf *et al.*, 1991) sono stati valutati i benefici cardiovascolari in funzione dell'età dei pazienti al momento del reclutamento: ne è emerso un beneficio statisticamente significativo fino all'età di 75-80 anni, mentre al di sopra di questi limiti gli effetti tendenzialmente favorevoli del trattamento non raggiungevano livelli significativi.

Il secondo problema prende in esame quale sia il valore diastolico basale al di sopra del quale il trattamento antipertensivo ha effetti benefici. Benché i livelli pressori diastolici considerati validi per essere ammessi ai vari studi valutati nella metanalisi fossero diversi, secondo Thijs *et al.* (1992) il beneficio del trattamento antipertensivo non è stato dimostrato per i soggetti con pressione diastolica iniziale infe-

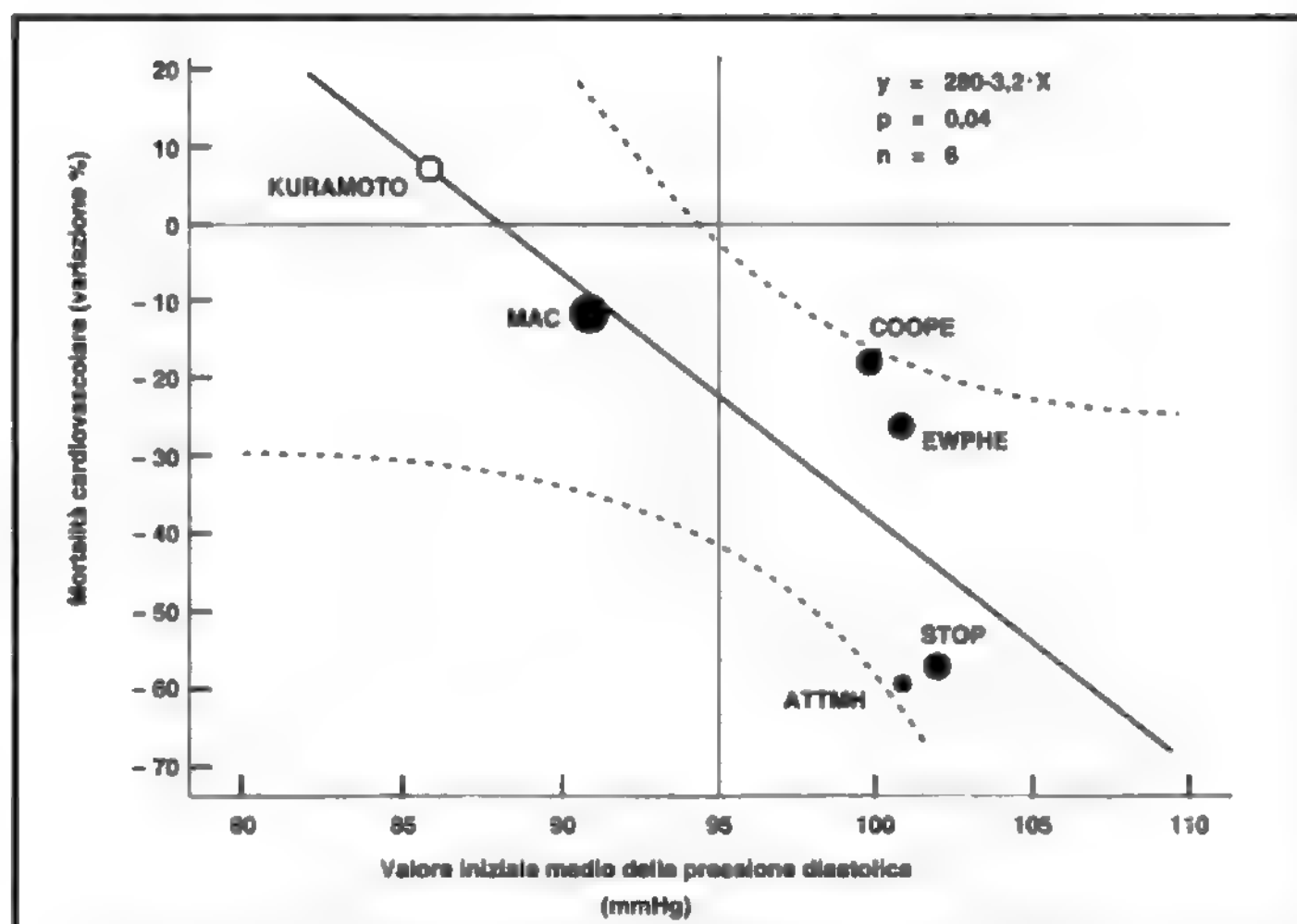


Fig. 8. Differenza percentuale della mortalità cardiovascolare (ordinate) fra pazienti anziani trattati con placebo o con farmaci antipertensivi in 6 diversi studi clinici (KURAMOTO; MRC; COOPE; EXPHE; STOP; ATTMH); correlazione fra i favorevoli effetti del trattamento e i valori di pressione diastolica all'inizio dello studio (ascisse). La linea continua corrisponde alla retta di regressione e le linee tratteggiate ai limiti fiduciali ($P = 95\%$) della regressione. (Da Van Hoff et al., 1995, modificata e ridisegnata).

riore a 95 mmHg (fig. 8); ovviamente questo non può riferirsi ai pazienti con ipertensione sistolica isolata.

Come terzo problema è necessario stabilire quale livello pressorio debba essere raggiunto con il trattamento farmacologico al fine di ridurre la morbidità e la mortalità cardiovascolare e di migliorare la qualità di vita. In realtà il problema non è stato espressamente considerato negli studi che pur hanno documentato un effetto benefico della terapia antipertensiva. Infatti i valori pressori raggiunti col trattamento variano chiaramente nei diversi studi (105, 95, 90 e anche 80 mmHg per la pressione diastolica; 170, 160 e anche meno di 150 mmHg per la sistolica).

Notevole interesse ed al tempo stesso perplessità ha destato l'osservazione (Cruickshank, 1988) di una accentuata incidenza di infarto miocardico nei pazienti la cui pressione diastolica era stata ridotta al di sotto di 85 mmHg. A parte alcune considerazioni di carattere procedurale e statistico (studio retrospettivo e non-significatività delle differenze osservate) è interessante segnalare che un simile comportamento è stato riscontrato anche nei pazienti dello studio EWPHE (Staessen et al., 1989) trattati con placebo: questo sembra escludere che la riduzione della pressione arteriosa indotta per via farmacologica di per sé aumenti il rischio cardiovascolare, mentre fa ritenere che la riduzione «spontanea» della pressione diastolica sia espressione di una patologia sottostante non ancora clinicamente evidente. Interessanti indicazioni al riguardo potranno derivare da uno studio attualmente in corso (Hansson, 1993) e specificamente rivolto a valutare il beneficio cardiovascolare della riduzione della pressione diastolica al di sotto di 90, 85 ed 80 mmHg in una ampia popolazione (oltre 19.000) di età compresa tra 50 ed 80 anni.

Misura della pressione arteriosa negli anziani

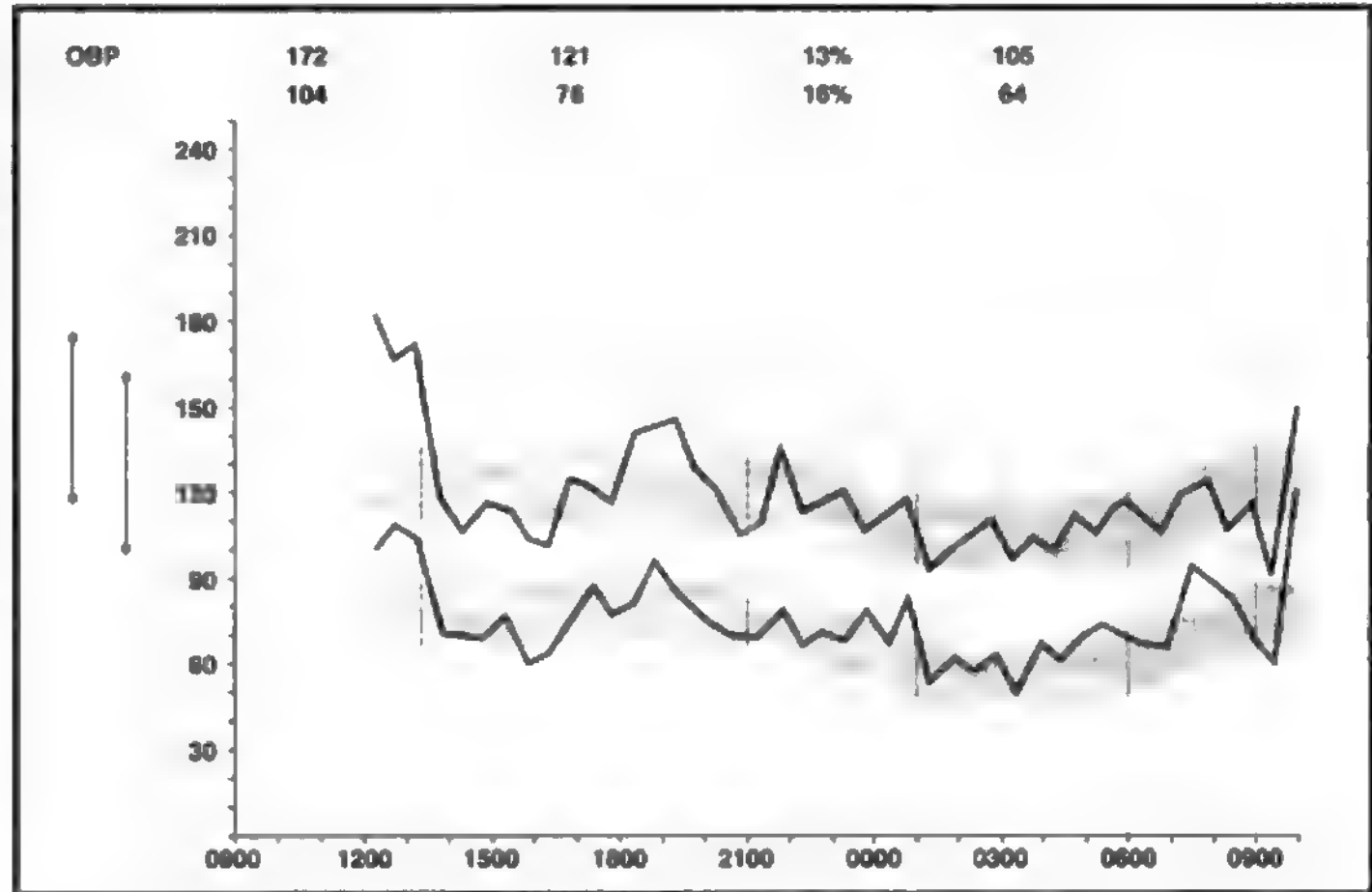
L'avvento del monitoraggio continuo della pressione arteriosa per 24 ore ha permesso di evidenziare che la misurazione pressoria fatta dal medico è comunemente più elevata di quella registrata al di fuori dell'ambulatorio col monitoraggio, confermando quanto era già stato evidenziato con

l'automisurazione domiciliare da parte del paziente. Secondo O'Brien et al. (O'Brien e O'Malley, 1995) il termine «ipertensione da camice bianco» (*white coat*) dovrebbe essere riservato ai pazienti con valori pressori elevati nello studio medico e valori entro i limiti della normalità con il monitoraggio nel restante periodo della giornata (fig. 9), mentre col termine di fenomeno «camice bianco» si dovrebbero classificare quei pazienti i cui valori pressori elevati nello studio medico, si riducono, senza rientrare nei limiti normali, nel corso del monitoraggio delle 24 ore (fig. 10).

La variabilità della pressione arteriosa è aumentata negli anziani (Messerli et al., 1991) e vi è qualche evidenza che, in questi soggetti, non solo l'ipertensione ma anche il fenomeno «camice bianco» siano più frequenti (Lerman et al., 1989; Cox et al., 1991); questo pone in discussione l'attendibilità di una misurazione convenzionale eseguita nello studio medico ai fini di una diagnosi di ipertensione nel soggetto senile. Tenendo conto di vari aspetti (estrema variabilità della pressione nell'anziano, necessità di proteggerlo da una terapia non necessaria o eccessiva, ma anche significativo beneficio del trattamento antipertensivo), O'Brien e O'Malley (1995) eseguono un monitoraggio ambulatorio della pressione arteriosa per 24 ore in tutti gli anziani per escludere l'ipertensione da «camice bianco» e per identificare il fenomeno «camice bianco» ritenuto una condizione «non normale» che richiede una continua osservazione, ma non necessariamente un immediato approccio farmacologico.

Prescindendo dal significato prognostico delle modificazioni pressorie dovute alla reazione emotiva del paziente durante la visita medica, la misurazione pressoria nel soggetto anziano deve essere fatta a tutt'oggi col classico sfigmomanometro di Riva Rocci, seguendo le procedure valide per i soggetti giovani ed adulti. Particolare attenzione meritano tuttavia i seguenti punti: 1) impiego di bracciali di dimensioni corrette per non sovrastimare (con bracciali piccoli) o sottostimare (con bracciali grandi) la pressione arteriosa; 2) iniziale determinazione del valore sistolico col metodo palpatorio, essendo «il silenzio ascoltatorio» più frequente nel soggetto anziano e; 3) misura della pressione

Fig. 9. Valori pressori (ordinate, mmHg) registrati nel corso di 24 h (ascisse) in un caso di «ipertensione da camice bianco». Le fasce punteggiate indicano i limiti di normale variabilità della pressione sistolica e diastolica. Nella parte alta della figura sono riportati da sinistra a destra: il valore pressorio medio nella prima ora di registrazione; quello del periodo diurno; la caduta pressoria percentuale media nel periodo notturno e il valore pressorio medio durante lo stesso periodo. I due tratti verticali a sinistra delle ordinate riportano i valori di due successive misure eseguite nello studio medico. (OBP: Office Blood Pressure).



arteriosa, almeno in occasione della prima visita, nelle posizioni clinostatica, seduta ed ortostatica, per evidenziare l'eventuale presenza dell'ipotensione ortostatica relativamente frequente nei soggetti senili.

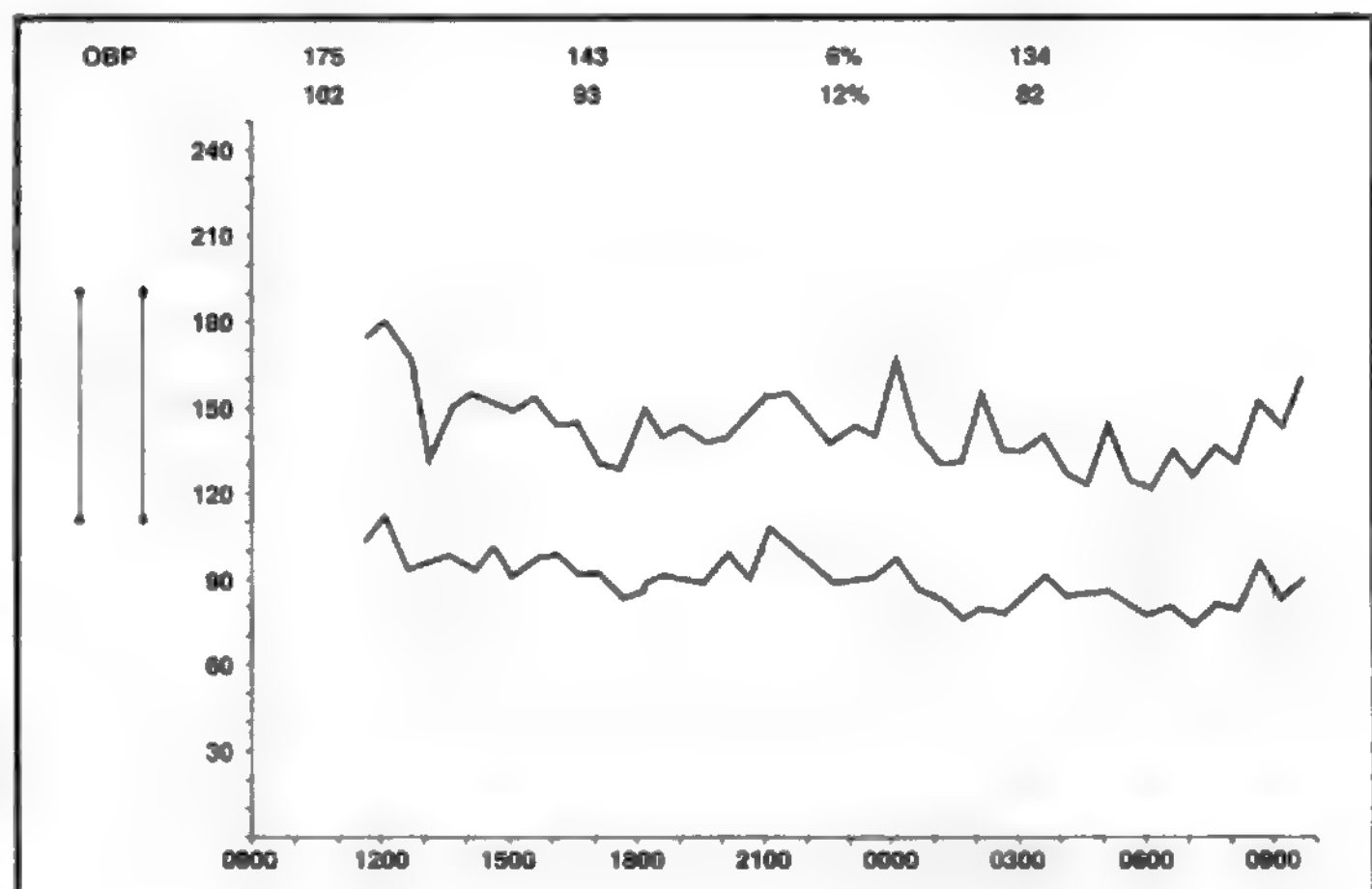
Negli anziani è stata descritta una condizione emodinamica definita «pseudo-ipertensione arteriosa» nella quale gli alti valori pressori, misurati con i metodi tradizionali, contrastano con i livelli normali evidenziati dalla misurazione diretta intra-arteriosa. Messerli *et al.* (1985) hanno proposto di eseguire la manovra di Osler per distinguere tra ipertensione e pseudo-ipertensione. La manovra consiste nel gonfiare il manicotto del bracciale al di sopra del valore sistolico: se l'arteria distale al manicotto (per esempio la radiale) è ancora palpabile (ma non pulsante) la manovra è indicativa di pseudo-ipertensione. Questa condi-

zione clinica è dovuta alla marcata sclerosi vasale che comporta anche una riduzione della *compliance* vasale. La misura diretta intrarteriosa e la metodica Doppler sono le sole in grado di definire la «vera» pressione arteriosa di questi soggetti.

Terapia antipertensiva dell'anziano

Pur tenendo conto della scarsa attenzione con cui l'efficacia e la tollerabilità dei farmaci antipertensivi sono state messe a confronto negli ipertesi anziani e in quelli giovani e adulti, è necessario delineare alcuni dei limiti del rapporto rischio/beneficio di una terapia antipertensiva condotta nell'anziano con l'impiego dei farmaci di «prima scelta» (diuretici, betabloccanti, inibitori dell'enzima di conversione, calcioantagonisti e bloccanti dei recettori alfa postsinaptici).

Fig. 10. Valori pressori (ordinate, mmHg) registrati nel corso di 24 h (ascisse) in un caso di «fenomeno da camice bianco». Simboli come in fig. 9.



Diuretici

Negli studi non controllati ed in quelli verso placebo (in particolare gli studi SHEP, EWPHE e MRC nell'anziano) i diuretici hanno chiaramente dimostrato di causare significative riduzioni dei valori pressori, maggiori di quelle osservate con placebo. Inoltre in studi di confronto con altri farmaci antipertensivi, il diuretico ha dimostrato di essere equipotente. L'influenza dell'età sulla risposta antipertensiva ai diuretici è stata valutata in 6 studi; 3 di questi (Andersen, 1983; Schersten *et al.*, 1980; Rowlands *et al.*, 1984) hanno documentato un maggior effetto antipertensivo dei diuretici nell'anziano rispetto al giovane iperteso, mentre gli altri 3 (Niarchos *et al.*, 1984; Rosendorff *et al.*, 1986; Fagan *et al.*, 1986) non hanno evidenziato effetti età-dipendenti. Tuttavia in alcuni studi la maggior risposta ipotensiva negli anziani era associata a valori pressori pre-trattamento più elevati. Pertanto, la maggiore risposta ipotensiva ai diuretici segnalata da alcuni studi nei soggetti anziani, non sembra costituire un fenomeno costante e di notevole entità.

Tra le modificazioni ematochimiche, l'ipopotassiemia è considerata una delle più pericolose, specialmente per il suo rapporto, ancora non ben definito, con le aritmie. In due studi (Ramsay *et al.*, 1977; Hollenberg *et al.*, 1986) non è stata riscontrata alcuna relazione tra riduzione della potassiemia da diuretici ed età dei pazienti; anche nei grandi studi clinici sugli anziani le diminuzioni della potassiemia e/o l'incidenza di valori nettamente ridotti di potassiemia non sembrano diverse da quelle osservate nei giovani e negli adulti ipertesi. Oltre alla riduzione della potassiemia, si può osservare negli anziani, come nei giovani e negli adulti, una iponatremia od un aumento della uricemia, della glicemia o della creatininemia.

Betabloccanti

Per il loro meccanismo d'azione (riduzione della gittata e della frequenza cardiaca ed in grado minore, e più tardivamente, delle resistenze vascolari periferiche) i betabloccanti sono poco indicati negli anziani ipertesi che già possono avere una riduzione della gittata e della frequenza cardiaca. In una rassegna sui rapporti tra età dei pazienti ed efficacia antipertensiva dei betabloccanti, Fitzgerald (1988) ha citato 6 studi che suggerivano una relazione inversa tra età dei pazienti e riduzione dei valori pressori, mentre 16 studi non segnalavano differenze nell'attività antipertensiva in funzione dell'età.

Si ritiene che la tollerabilità dei farmaci antipertensivi in generale e dei betabloccanti in particolare, sia ridotta negli anziani, probabilmente a causa di una diversa farmacocinetica e farmacodinamica; tuttavia, gli studi relativi ai betabloccanti non sono di supporto a questa ipotesi (Wikstrand *et al.*, 1986; 1982). I betabloccanti possono causare modificazioni delle lipoproteine (riduzione del colesterolo HDL, aumento del colesterolo LDL e dei trigliceridi) e dei carboidrati (aumento della glicemia), ma non è noto se queste variazioni siano età-dipendenti. È ovvio che l'impatto prognostico delle modificazioni delle lipoproteine e dei carboidrati è minore nei soggetti anziani rispetto ai giovani ed agli adulti per la ridotta attesa di vita.

Inibitori dell'enzima di conversione (ACE-inibitori)

I farmaci che agiscono sul sistema renina-angiotensina dovrebbero teoricamente avere una efficacia minore nei soggetti anziani, nei quali l'attività del sistema renina-angiotensina è diminuita. Tuttavia è ben noto che nessun farmaco antipertensivo agisce attraverso un solo meccanismo; tutti possono attivare processi anche non correlati a quello

specifico della classe, ed essere egualmente efficaci nel ridurre i valori pressori.

Il captopril, il capostipite degli ACE-inibitori, riduce significativamente la pressione arteriosa negli anziani ipertesi, specialmente se associato ai diuretici e, in monoterapia, risulta equipotente ai diuretici stessi. Non esiste uno studio sull'efficacia antipertensiva del captopril in funzione dell'età. Il rash cutaneo e l'alterazione del gusto sono stati i disturbi più frequentemente riscontrati in uno studio di sorveglianza *post-marketing* del captopril in anziani ipertesi, mentre, fra le modificazioni ematochimiche, quelle riferibili a una riduzione della funzione renale sono risultate le più frequenti (Jenkins *et al.*, 1985). In un ampio studio di sorveglianza sul captopril, l'ipotensione fu riscontrata in 12 pazienti (0,1%) sotto i 60 anni e nello 0,5% in quelli oltre 60 anni (Chalmers *et al.*, 1987).

In un ampio studio di sorveglianza l'enalapril, altro ACE-inibitore frequentemente usato nella terapia dell'ipertensione arteriosa dell'anziano, ha determinato una riduzione pressoria che risultava età dipendente, se espressa in valori assoluti, ma non correlata all'età se espressa in valori percentuali della pressione arteriosa basale. Gli effetti indesiderati più gravi sono stati la tosse (3%), il rash cutaneo (0,5%), l'ipotensione (0,3%) e l'edema angio-neurotico (0,03%) (Cooper *et al.*, 1987).

Calcioantagonisti

Il problema dei rapporti fra età del paziente ed entità dell'effetto antipertensivo è stato particolarmente dibattuto per i calcioantagonisti anche se, in realtà, esso si pone in modo altrettanto valido per tutti gli agenti antipertensivi.

Nonostante ciò non è stato possibile giungere a conclusioni definitive: infatti secondo alcuni autori i calcioantagonisti sono più efficaci negli ipertesi anziani rispetto a quelli giovani o adulti (Buhler *et al.*, 1982; Erne *et al.*, 1983); secondo altri sono equipotenti nelle varie classi di età (Kurokawa *et al.*, 1986; Hiramatsu *et al.*, 1982); infine, secondo lo studio di Ferrara *et al.* (1985), vi è una correlazione inversa fra efficacia antipertensiva ed età dei pazienti. Come detto precedentemente per i diuretici, l'efficacia dei calcioantagonisti, che secondo alcuni autori cresce col crescere dell'età dei pazienti, può essere imputabile a valori pressori pretrattamento più elevati.

Gli eventi indesiderati, quali cefalea, arrossamento, palpitazioni ed edemi malleolari, tipici dei calcioantagonisti non sembrano essere più frequenti o più accentuati negli anziani ipertesi rispetto ai giovani ed agli adulti.

Bloccanti dei recettori alfa postsinaptici

L'esperienza clinica con questa classe di farmaci è relativamente limitata per la popolazione ipertesa in genere e per gli anziani in particolare. Secondo Meredith *et al.* (1987) non vi è differenza nella efficacia antipertensiva della trimazosina nei giovani, negli adulti e negli anziani ipertesi, mentre l'acebutololo era più efficace nei giovani ipertesi. D'altra parte, secondo Stokes (Stokes *et al.*, 1984; Stokes, 1988), la prazosina, in monoterapia o associata ad un diuretico, è efficace e ben tollerata negli anziani ipertesi e solo quando è impiegata come terzo farmaco di associazione, causa persistenti sintomi imputabili a ipotensione ortostatica.

Scelta del farmaco antipertensivo

L'anziano iperteso è sovente portatore di altri fattori di rischio per la malattia aterosclerotica (tab. IX), come la dislipidemia, il diabete mellito o l'obesità, oppure è affetto da altre patologie cardiovascolari e non cardiovascolari

TAB. IX. PREVALENZA DI ALTRI FATTORI DI RISCHIO PER L'ATEROSCLEROSI IN PAZIENTI IPERTESI

Colesterolo totale elevato	70%
Fumo	35%
Colesterolo HDL basso	25%
Diabete mellito	> 5%
Estroprogestinici	3%
Ipertrofia ventricolare sinistra	30%

concomitanti. In genere la scelta di un farmaco antipertensivo dipende da diversi importanti fattori quali l'efficacia del farmaco, le proprietà farmacodinamiche, il profilo degli effetti indesiderati, l'utilità in funzione della patologia e dei farmaci concomitanti ed infine il costo.

Poiché le varie classi di farmaci antipertensivi possono essere considerate equipotenti nel ridurre i valori pressori, indipendentemente dal meccanismo di azione, mentre gli effetti indesiderati possono essere spesso contenuti utilizzando dosaggi più bassi, la scelta del farmaco antipertensivo nel singolo paziente è sovente condizionata dalla presenza di altri fattori di rischio ed ancor più di patologie concomitanti. Anche se, come già riferito, la maggioranza degli studi sulla efficacia e tollerabilità dei farmaci antipertensivi è stata effettuata nei pazienti giovani ed adulti, parte di queste conoscenze possono essere estrapolate ai pazienti anziani, in particolare per quanto riguarda l'interferenza con i fattori di rischio e con le patologie concomitanti.

Particolare attenzione è stata rivolta all'interferenza dei farmaci antipertensivi sul profilo lipidico (tab. X). I farmaci con il più favorevole impatto sulle lipoproteine sono i bloccanti dei recettori alfa 1-postsinaptici, in grado di ridurre le lipoproteine aterogene e aumentare quelle antiaterogene, seguiti dai calcio-antagonisti e dagli ACE-inibitori, che possono essere considerati neutri, mentre un effetto sfavorevole sulle lipoproteine è esercitato dai diuretici e dai betabloccanti con qualche differenza per questi ultimi a seconda della selettività o meno per i beta 1-recettori e dell'attività simpatico-mimetica intrinseca.

Clinicamente più rilevante, almeno a breve termine, è l'effetto dei farmaci antipertensivi sulle patologie concomitanti all'ipertensione arteriosa: la presenza di una patologia può, in alcuni casi indicare ed in altri controindicare l'impiego di un farmaco antipertensivo. Come risulta dalla tab. XI i calcioantagonisti e gli ACE-inibitori possono es-

TAB. XI. INDICAZIONI E CONTROINDICAZIONI PER I FARMACI ANTIPERTENSIVI IN FUNZIONE DELLE PATOLOGIE CONCOMITANTI

	Indicati	Controindicati (o cautela)
Diabete mellito	ACE-inibitori Calcioantagonisti	Diuretici Betabloccanti
Broncopneumopatia cronica ostruttiva	Calcioantagonisti ACE-inibitori	Betabloccanti
Vasculopatia periferica	Calcioantagonisti ACE-inibitori	Betabloccanti
Cardiopatía ischemica	Betabloccanti Calcioantagonisti	
Scompenso cardiaco	Diuretici ACE-inibitori	Betabloccanti
Ipertrofia cardiaca	ACE-inibitori Betabloccanti Calcioantagonisti	Vasodilatatori diretti
Insufficienza renale	ACE-inibitori Diuretici (ansa)	Betabloccanti Diuretici (tubulari)

sere utilizzati in presenza delle più frequenti patologie concomitanti, mentre per i bloccanti dei recettori alfa, i diuretici ed i betabloccanti esistono indicazioni e controindicazioni.

Bibliografia

- Amery A., Birkenhäger W., Brixko R. *et al.*, *Lancet*, 1985, **I**, 1349-1354.
 Andersen G. S., *Acta Med. Scand.*, 1983 (Suppl. 676), 151-160.
 Buhler F., Hulthen U. L., Kiowski W., Bolli P., *Clin. Sci.*, 1982, **63**, 439s-442s.
 Chalmers D., Dombey S. L., Lawson D. H., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1987, **24**, 343-350.
 Coope J., Warrender T. S., *Br. Med. J.*, 1986, **293**, 1145-1151.
 Cooper W. D., Sheldon D., Brown D. *et al.*, *J. R. Coll. Gen. Pract.*, 1987, **37**, 346-349.
 Cox J. P., Atkins N., O'Malley K., O'Brien E., *J. Hypertens.*, 1991, **9** (Suppl. 6), S100-S101.
 Cruickshank J. M., *Br. Med. J.*, 1988, **297**, 1227.
 Dahlof B., Lindholm L. H., Hansson L. *et al.*, *Lancet*, 1991, **338**, 1281-1285.
 Erne P., Bolli P., Bertel O. *et al.*, *Hypertension*, 1983, **5** (Suppl. 11), 97-102.
 Esler M., Skews H., Leonard P. *et al.*, *Clin. Sci.*, 1981, **60**, 217-219.
 Fagan T. C., Conrad K. A., Le S. M., Simons J. A., *J. Hypertens.*, 1986, **4** (Suppl. 5), S513-S514.
 Ferrara L. A., Fasano M. L., Soro S., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1985, **28**, 473-474.
 Fitzgerald J. D., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1988, **12** (Suppl. 8), S83-S92.
 Hansson L., for the HOT Study Group, *Blood Pressure*, 1993, **2**, 62-68.
 Hayduk K., Krause D. K., Kaufman W. *et al.*, *Clin. Sci.*, 1973, **45**, 273s-278s.
 Helderma J. H., Vestal R. E., Rowe J. W. *et al.*, *J. Gerontol.*, 1978, **33**, 39-47.
 Hiramatsu K., Yamagishi F., Kubota T., Yamada T., *Am. Heart J.*, 1982, **104**, 1346-1350.
 Hollenberg N. K., Bannon J. A., *Am. J. Med.*, 1986, **80** (Suppl. 4A), 30-36.
 Hypertension-Stroke cooperative Study Group, *JAMA*, 1974, **229**, 409-418.
 Jenkins A. C., Knill J. R., Dreslinkski G. R., *Arch. Intern. Med.*, 1985, **145**, 2029-2031.
 Kuramoto K., Matsushita S., Kuwajima M., *Jpn. Heart J.*, 1981, **22**, 75-85.
 Kuramoto K., Yamada K., Miushita H., *Jpn. J. Geriatr.*, 1986, **23**, 180-188.
 Lerman C. E., Brody D. S., Hui T. *et al.*, *J. Gen. Intern. Med.*, 1989, **4**, 225-231.
 MacKnight J. A., Roberts J., Sheridan B., Atkins A. B., *J. Human Hypertension*, 1989, **3**, 157-163.

TAB. X. MODIFICAZIONI DEI LIPIDI PLASMATICI DA FARMACI ANTIPERTENSIVI

	Colesterolo Totale	LDL-Colesterolo	HDL-Colesterolo	Trigliceridi
Diuretici	↑	↑	±	↑
Calcio-antagonisti	O	O	O↑	O
ACE-inibitori	O	O	O	O
Alfabloccanti	↓	O↓	↑	↓
Betabloccanti	↑↓	↑↓	↓	↑

↑ = aumento; ↓ = riduzione; O = nessun effetto; ± = effetti minimi; ↑↓ = risultati inconsistenti.

IPERTENSIONE ARTERIOSA

- Management Committee, *Med. J. Aust.*, 1981, **2**, 398-402.
- Mattila K., Haavisto M., Rajala S., Heikinheimo R., *Br. Med. J.*, 1988, **296**, 887.
- Meredith P. A., Kelmam A. W., Scott P. J. W., Reid J. L., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1987, **22**, 605P.
- Messerli F. H., Ventura H. O., Amodeo C., *N. Engl. J. Med.*, 1985, **312**, 1548-1551.
- Messerli H., Schneider R. E., *Blood pressure measurement in the elderly*, in O'Brien E., O'Malley K. eds., *Blood pressure measurement*, Birkenhager W. H., Reid J. L., series eds., *Handbook of Hypertension*, 1991, Elsevier, Amsterdam, pp. 148-154.
- Miller T. R., Grossman S. J., Schechtman K. B. et al., *Am. J. Cardiol.*, 1986, **58**, 531-535.
- MRC Working Party, *Br. Med. J.*, 1992, **304**, 405-412.
- Niarchos A. P., Weinstein D. L., Laragh J. H., *Am. J. Med.*, 1984, **77**, 1061-1068.
- O'Brien E., O'Malley K., *Blood pressure measurement in the elderly with special reference to ambulatory blood pressure measurement*, in Leonetti G. ed., *Hypertension in the elderly*, 1995, Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, **2**, 13-25.
- Ramsay L. E., Boyle P., Ramsay M. H., *Q. J. Med.*, 1977, **46**, 401-410.
- Roach M. R., Burton A. C., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**, 557-570.
- Rodeheffer R. J., Gesternbith G., Becker L. C. et al., *Circulation*, 1984, **69**, 203-213.
- Rosendorff C., Murray G. D., *J. Hypertens.*, 1986, **4** (Suppl. 6), S109-S111.
- Rowlands D. B., Glover D. R., Young M. A. et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1984, **27**, 397-405.
- Roy C. S., *J. Physiol.*, 1983, **345**, 139-142.
- Schersten B., Kuylestierna J. et al., *Hypertension*, 1980, **2**, 672-679.
- SHEP Cooperative Research Group, *JAMA*, 1991, **265**, 3255-3264.
- Staessen J., Bulpitt C., Clement D. et al., *Br. Med. J.*, 1989, **298**, 1552-1556.
- Staessen J., Dekempeneer L., Fagard R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1991, **18** (Suppl. 1), S34-S40.
- Stemermann M. B., Weinstein R., Rowe J. W. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 3863-3866.
- Stokes G. S., Marwood J. F., *Metb. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1984, **6**, 197-204.
- Stokes G. S., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1988, **12** (Suppl. 8), S109-S115.
- Thijs L., Fagard R., Lijnen P. et al., *J. Hypertens.*, 1992, **10**, 1103-1109.
- Van Hoof R., Thijs L., Staessen R., et al., in Leonetti G. ed., *Hypertension in the elderly*, 1995, Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, **5**, 71-89.
- Veterans Administration Cooperative Study Group on Anti-hypertensive Agents, *Circulation*, 1972, **45**, 991-1004.
- Wikstrand J., Berglund G., *Br. Med. J.*, 1982, **285**, 250-251.
- Wikstrand J., Westergren G., Berglund G. et al., *JAMA*, 1986, **255**, 1304-1310.
- Ziegler M. G., Lake C. R., Kopin I. J., *Nature*, 1976, **261**, 333-335.

GASTONE LEONETTI

IPERTENSIONE ARTERIOSA CHIRURGICA

F. hypertension arterielle chirurgicale. - I. surgical arterial hypertension. - T. chirurgische arterielle Hypertension. - S. hipertensión arterial quirúrgica.

Introduzione

È noto che su 100 ipertesi arteriosi, 95 sono affetti da ipertensione cosiddetta «primitiva», eredo-familiare, criptogenetico-essenziale e d'interesse internistico, e 5 sono affetti da ipertensione «secondaria», non-familiare, da causa accertabile e spessissimo d'interesse chirurgico. L'ipertensione secondaria riguarda essenzialmente tre capitoli della patologia chirurgica (coartazione aortica, ischemia renale e tumori del surrene), oltre a figurare tra le possibili sequele dell'estrogenoterapia.

Il motivo di guardare in senso unitario all'ipertensione chirurgica risponde alla finalità pratica di dover sempre accertare, ogni volta che si rileva un caso d'ipertensione arteriosa, che non si tratti di una condizione chirurgica, anche se contemporaneamente rari rispetto alle forme internistiche. Invece, instaurare una farmacoterapia ipotensiva, senza aver preventivamente escluso l'eventuale natura secondaria dell'ipertensione, significa tenere ancora nascosta la malattia

di base, con tutte le conseguenze di ordine clinico. Ecco perché in ogni *flow chart* (diagramma che presenta le procedure da applicare [v. sotto]), in uso nei «Centri dell'ipertensione», figura sempre una vasta serie d'esami volti a rivelare tutte le possibili cause chirurgiche dell'ipertensione, prima di passare alla terapia.

Patologia

Le forme morbose chirurgiche che sostengono un regime ipertensivo quale componente dominante del loro quadro clinico sono: a) la *coartazione aortica* (v. CARDIOCHIRURGIA, III, 849; CARDIOCHIRURGIA*, *1252-1255; CUORE, IV, 1773-1780), caratterizzata dall'ipertensione nel distretto superiore dell'organismo e dall'ipotensione nel distretto inferiore; b) l'*ipertensione nefrovascolare* (v.; VIII, 207-221; *4040-4045), per liberazione di renina su base ischemico-renale per steno-ostruzione dell'arteria renale e quella *nefrogena* per ridotto parenchima renale; c) la *patologia endocrino-secrente tumorale dei surreni* (v. SURRENALIGHIANDOLE, XIV, 1637; *6896), nella componente midollare (con produzione di catecolamine in eccesso) o corticale (con produzione di cortisolo o di aldosterone in eccesso per adenoma [v. ALDOSTERONISMI**]). Quest'ultima patologia può avere anche una localizzazione extra-surrenalica, nei gangli paravertebrali (componente *feo*) o per una *sindrome paraneoplastica* (componente corticale, con produzione di sostanze ACTH-simili).

L'ipertensione su base organica può riguardare qualsiasi età, anche se deve destare maggior sospetto quanto più giovane sia l'età del soggetto iperteso. Nel neonato può essere già presente un'ipertensione da coartazione aortica, con soffio auscultabile sulla paravertebrale basale sinistra e con positività all'eco-Doppler attraverso una «finestra» intercostale. Nel tempo, cefalea, palpitazioni ed epistassi recidivanti possono richiamare l'attenzione quali epifenomeni dell'incremento pressorio. Nel bambino, nell'adolescente o nel giovane può essere rilevata un'ipertensione da coartazione aortica (iposfigmia femorale), o da patologia nefrovascolare (anomalie o displasia del supporto arterioso, con soffio addominale e positività all'eco-Doppler trans-lombare) o nefrogena (rene policistico palpabile, tumore di Wilms), o da tumore medullo-surrenalico (feocromocitoma o simpatoblastoma, con forti sbalzi pressori e intensi epifenomeni) o corticosurrenalico (aspetto *cushingoide*, ambiguità dei genitali, irsutismo).

Quanto più, invece, il primo reperto ipertensivo si sposta verso l'età adulta, si fa meno pressante il sospetto di un'ipertensione «organica»: tuttavia nulla vieta di considerare l'eventualità di una placca ateromastica all'ostio di un'arteria femorale o di un tumore del surrene anche in un'età tipicamente appannaggio dell'ipertensione essenziale. Perciò, è innanzitutto indispensabile un'anamnesi e un esame obiettivo quanto più dettagliati e completi possibile, meglio ancora se redatti in base ad un protocollo-questionario specialistico.

«Flow-chart» diagnostico

Il criterio da seguire è quello della maggiore efficienza, minore invasività e minor costo. Un primo *screening* può fornire informazioni di carattere generale e alcuni «segnali» di patologia d'organo, di cui si fornisce un esempio nella tab. I, in cui comunque domina per importanza il monitoraggio non-invasivo della pressione arteriosa nelle 24 ore (v. PRESSIONE SANGUIGNA*), sul tipo dell'*Holter* già in uso per lo studio delle aritmie cardiache, con tecnica microfonica od oscillometrica (cfr. Prattichizzo, 1993). Nel contempo, o dopo il primo *screening*, si può presentare la necessità di approfondire la *diagnostica d'organo* (tab. II), ove

TAB. I. SCREENING GENERALE

Sangue
— emocromo con formula leucocitaria
— glicemia
— azotemia, creatininemia, uricemia
— sodio, potassio, cloro, calcio
— colesterolo totale, HDL, trigliceridi
— SGOT, SGPT, fosfatasi alcalina, gamma-GT
— proteine totali, albuminemia
— fibrinogeno, attività protrombinica
— TSH, FT3, FT4
Urine
— esame chimico e microscopico
Exami strumentali
— ECG (eventualmente esame Holter)
— ecocardiografia
— fundus oculi
— monitoraggio della pressione arteriosa per 24 ore

TAB. II. DIAGNOSTICA D'ORGANO

Per sospetto ischemico-renale:
— albuminuria delle 24 ore, creatinina-clearance, urinocultura
— reninemia (in clino- e ortostatismo)
— ecografia reno-surrenalica
— eco-Doppler renale
— angioscintigrafia renale
Per sospetto surrenalico:
— corticale:
17-OH-corticosteroidi e 17-chetosteroidi urinari
aldosterone e renina plasmatici
scintigrafia con ¹³¹ I-colesterolo
— midollare:
metanefrine urinarie delle 24 ore
scintigrafia con ¹³¹ I-MIBG (eventualmente total body)
Per sospetta coartazione aortica:
— eco-Doppler dei tronchi sovraortici
— eco-Doppler transesofageo

predominano le moderne indagini strumentali (eco-Doppler e scintigrafia con indicatori positivi, questi ultimi indispensabili nella patologia *extra-surrenalica*). In caso di positività l'ipotesi di una ipertensione chirurgica impone sempre, come premessa indispensabile, il passaggio a una fase ancora più sofisticata e costosa (TAC, RMN) o invasiva (arteriografia) della diagnostica, per l'accertamento *in dettaglio* visivo della forma organica ipertensiogena. La terapia medica, in tal caso, potrà avere un ruolo importante soprattutto per la preparazione farmacologica all'intervento (come nel caso del feocromocitoma o dei tumori cortico-surrenalici secernenti).

Se invece il primo *screening* risulterà negativo, questo assumerà il valore di una diagnosi di esclusione di forme organiche e si passerà direttamente al trattamento medico dell'ipertensione di tipo primitivo.

Per lo specifico trattamento della ipertensione nefrovascolare, v. IPERTENSIONE NEFROVASCOLARE (v.; v.*) e ANGIOPLASTICA TRANSLUMINALE PERCUTANEA* (*540-542), per quella da coartazione aortica, v. CARDIOCHIRURGIA (III, 849-853); CARDIOCHIRURGIA* (*1254-1255).

Bibliografia

- Dean R. H., Benjamin M. E., Hansen K. J., *Curr. Probl. Surg.*, 1997, 34 (3), 209-308.
 De Vicar M. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1993, 7, 404-412.
 Di Giovanni V., Asòle F., *Le malattie delle ghiandole surrenali*, 1980, SEU Universo, Roma.

- Elliot W. J., Martin W. B., Murphy M. B., *Arch. Intern. Med.*, 1993, 153 (6), 755-764.
 Laslett L., *West J. Med.*, 1995, 162 (3), 215, 129.
 Maffei Faccioli A. et al., Che cosa c'è di nuovo in chirurgia delle surrenali?, *Arch. e Atti della Soc. It. Chirurgica*, 97° Congr., Trieste, 1995, vol. I.
 MaVicar M., Carman C., Chandra M. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1993, 7 (4), 404-412.
 Porena M., Rosi P., De Mitri R., *Arch. Ital. Urol. Androl.*, 1994, 66 (4 Suppl.), 19-22.
 Prattichizzo F. A., *Fed. Med.*, 1993, 15, 159-162.
 Rao P. S., *Semin. Nephrol.*, 1995, 15 (2), 87-105.
 Scanu A. M. et al., L'ipertensione nefro-vascolare, *Arch. e Atti della Soc. It. Chirurgica*, 97° Congr., Trieste, 1995, vol. I.
 Spitalewitz S., Weber M. A., Reiser I. W., *Cardiologia*, 1997, 42 (3), 237-243.
 White W. B., Malchoff C., *Am. J. Hypertens.*, 1992, 5 (6), 414-418.

FILIPPO ASÒLE

IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE [v. vol. VIII, coll. 191-199; Agg. I, coll. *4032-4040]

SOMMARIO

Introduzione e classificazione (col. 2914). - **Disfunzione endoteliale nella ipertensione arteriosa polmonare** (col. 2917). - **Rimodellamento vascolare** (col. 2919). - **Terapia** (col. 2920): **Ossigenoterapia**. - **Vasodilatatori**. - **Anticoagulanti**. - **Terapia chirurgica**.

Introduzione e classificazione

La ipertensione arteriosa polmonare [i.a.p.] (primitiva o secondaria) continua a suscitare l'interesse dei ricercatori e dei clinici. I settori di maggior sviluppo negli ultimi anni sono stati quelli relativi a:

- il ruolo dell'endotelio;
- il rimodellamento vascolare;
- la ricerca di nuovi mezzi terapeutici.

La circolazione polmonare ha due caratteristiche uniche, che la contraddistinguono:

- 1) è un sistema a bassa pressione ed a bassa resistenza

TAB. I. CLASSIFICAZIONE (EMODINAMICO-CLINICA) DELL'IPERTENSIONE POLMONARE

Tipo	Meccanismo	Esempi clinici
Passiva	Ostruzione al drenaggio venoso polmonare	Stenosi mitralica Malattia veno-occlusiva polmonare
Ipercinetica	Aumento del flusso ematico polmonare	Difetto settale atriale Difetto settale ventricolare
Ostruttiva	Ostruzione al flusso ematico a livello delle grandi arterie polmonari	Tromboembolia polmonare Stenosi (o assenza) unilaterale di una arteria
Obliterativa	Ostruzione al flusso ematico a livello delle piccole arterie polmonari	Microembolie polmonari multiple Ipertensione polmonare primitiva Malattie collagene-vascolari
Vasocostrittiva	Ostruzione al flusso ematico da vasocostrizione ipossica	Malattia cronica da grandi altezze Sindrome della apnea da sonno
Poligenica	Due (o più) dei meccanismi indicati	Broncopneumopatia cronica ostruttiva Pneumopatie interstiziali-infiltrative diffuse

(circa 1/5 rispetto alla circolazione sistemica): questo risultato è frutto di meccanismi attivi riferibili alla attività del sistema β -adrenergico ed alla presenza di vasodilatatori endogeni: le prostaglandine;

2) è un sistema che risponde alla ipossia (alveolare) con una *vasocostrizione* (vasocostrizione polmonare ipossica), meccanismo (Von Euler e Liljestrand, 1946) deputato ad ottimizzare il rapporto (locale) tra perfusione e ventilazione e con ciò la ossigenazione del sangue arterioso.

La classificazione dell'i.a.p. risalente a Paul Wood si mantiene ancora, dal punto di vista fisiopatologico, attuale per la sua semplicità e per la sua rilevanza clinica. Le categorie più importanti di questa storica ma fondamentale suddivisione sono riportate nella tab. I. Si ricorda che la dexfenfluramina può essere causa di i.a.p. (v. OBESITÀ**).

Il progressivo aumento della pressione arteriosa polmonare in corso di ipossia cronica è correlato sia alla persistente presenza di vasocostrizione, sia all'instaurarsi di un rimodellamento strutturale a carico dei vasi polmonari. I meccanismi che sono alla base della vasocostrizione non sono stati accertati in modo definitivo: fra le ipotesi più accreditate vi sono sia la esaltazione del tono fisiologico, che l'alterato equilibrio tra fattori vasocostrittori e fattori vasodilatatori di varia origine (fig. 1).

Il più utilizzato modello clinico-sperimentale di vasocostrizione polmonare è quello reattivo all'ipossia acuta. La *vasocostrizione acuta ipossica* rappresenta una specifica proprietà locale, caratteristica delle cellule muscolari lisce dei

vasi polmonari, non dipendente da influenze di natura nervosa od umorale, volta a sottrarre flusso ematico ad alveoli scarsamente ventilati, migliorando il rapporto ventilazione-perfusione. È stato recentemente dimostrato a livello delle cellule di tipo 1 dei glomi carotidi che la diminuzione della pressione parziale di ossigeno inibisce una corrente di ioni potassio, facilitando la depolarizzazione mediante l'aumento dell'ingresso intracellulare di calcio attraverso canali voltaggio-dipendenti. Recentemente meccanismi analoghi sono stati messi in evidenza anche nei corpi neuroepiteliali della mucosa bronchiale e nei miociti dei vasi polmonari. Questi meccanismi cellulari spiegano tra l'altro l'efficacia di farmaci che esercitano un'azione iperpolarizzante sulla membrana cellulare attivando i canali del potassio (correlati con il calcio e con l'ATP) (tab. II).

L'attivazione della cellula muscolare liscia può avvenire, oltre che direttamente, anche attraverso l'effetto combinato di vari mediatori vasoattivi che presuppone comunque una modulazione della concentrazione intracellulare di calcio. Sono stati identificati numerosi mediatori vasoattivi prodotti dai neutrofili, dai macrofagi, dalle mast-cellule, dalle piastrine e dalle cellule endoteliali: catecolamine, acetilcolina, prostaglandine, bradichinina, trombossano, leucotrieni, serotonina, istamina, adenosina, monossido d'azoto e vari peptidi, come per es. il peptide natriuretico atriale.

Negli ultimi anni gli sforzi dei ricercatori sono stati indirizzati ad indagare la possibilità di identificare in pazienti con i.a.p. la presenza di un'alterazione del normale equili-

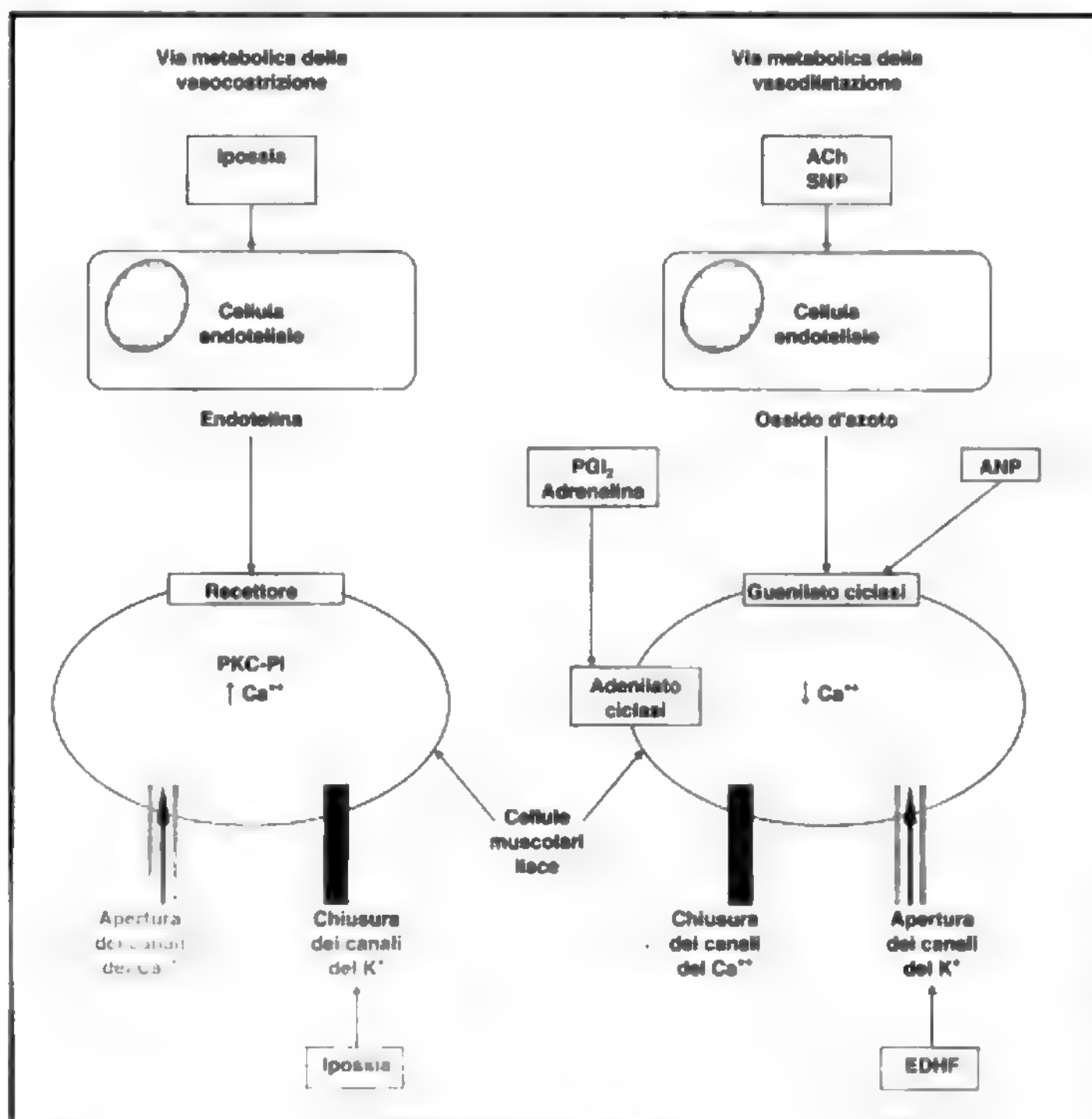


Fig. 1. Meccanismi responsabili del controllo del tono vascolare polmonare. ACh) acetilcolina; ANP) peptide natriuretico atriale; EDHF) fattore iperpolarizzante derivato dall'endotelio; PGI₂) prostaciclina; PI) fosfoinositolo; PKC) proteinchinasi C; SNP) sodio nitroprusiato.

TAB. II. EFFETTI DEI FARMACI SUL CIRCOLO POLMONARE

Effetto/farmaco	Meccanismo d'azione
Vasocostrizione	
Dopamina	α -adrenergico
Propranololo	Inibizione β -recettoriale
Bloccanti della ciclo-ossigenasi (Indometacina-Meclofenamato)	Sintesi di prostaglandina
Almitrina	Sconosciuto (stimolazione glomeroli carotidei)
Vasodilatazione	
Calcioantagonisti	Ridotto ingresso di Ca^{++} Ridotta sintesi di vasocostrittori
Prostaciclina	Aumento AMPc
Metilxantine	
Simpatomimetici	
Nitroderivati	Aumento GMPc
ACE-inibitori (Captopril)	Aumentata sintesi di PGI_2
Idralazina	
Clonidina	Stimolazione α_2 -adrenergica
Fentolamina	Inibizione recettore α_1 -adrenergico
Prazosina	Inibizione della sintesi di trombano
Tolazolina	

Si segnala che la dexfenfluramina può esser causa di i.a.p.

brio nella produzione endogena di fattori determinanti vasodilatazione e vasocostrizione.

In una piccola percentuale di pazienti (5-6%) è stata documentata una incidenza familiare della i.a.p. primitiva (Rich *et al.*, 1997). La trasmissione familiare è difficilmente prevedibile data la incompleta penetranza con la quale il gene (che è stato recentemente localizzato nel cromosoma 2 (q31-32) [Nichols *et al.*, 1997]) viene trasmesso.

Le caratteristiche cliniche (inclusa la sopravvivenza) della forma familiare sono del tutto sovrapponibili a quelle della forma sporadica, con la sola eccezione che, solitamente, la diagnosi è più precoce. Caratteristiche distintive della forma familiare sembrano essere una maggior prevalenza di anticorpi anti-nucleo e una associazione con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC: HLA-DR in particolare).

Disfunzione endoteliale nella ipertensione arteriosa polmonare

Tradizionalmente l'i.a.p. è stata spiegata in termini emodinamici. Questa visione, che ignora il ruolo svolto dall'endotelio vascolare polmonare, appare oggi incompleta. I vasi polmonari, infatti, non sono dei semplici condotti passivi per il flusso di sangue dal cuore destro a quello sinistro: gli elementi cellulari che li compongono sono dotati di numerose proprietà che contribuiscono alla regolazione dinamica del flusso polmonare e delle resistenze vascolari.

È ormai dimostrato che le cellule endoteliali (v. ENDOTELIO**) svolgono un ruolo centrale sia nella normale regolazione del tono vascolare polmonare, sia nella patogenesi delle alterazioni dei piccoli vasi che si riscontrano in corso di ipertensione polmonare. Le cellule endoteliali polmonari contribuiscono a regolare la permeabilità vascolare, elaborano sostanze (in risposta a stimoli fisici e chimici) che controllano il tono della muscolatura liscia vascolare, modulano la tendenza del sangue alla coagulazione, rilasciano fattori di crescita e citochine che inducono la migrazione e replicazione delle sottostanti cellule muscolari lisce. È no-

tevole il fatto che molte di queste proprietà possono essere modulate da fattori emodinamici (flusso ematico polmonare, pressione o stiramento) o biochimici (ipossia, acidosi).

L'endotelio produce numerosi *mediatori vasoattivi*: il monossido d'azoto, la prostaciclina ed il fattore iperpolarizzante derivato dall'endotelio presentano un'attività vasodilatatrice; l'endotelina, il fattore attivante le piastrine e l'angiotensina II costituiscono i principali agenti vasocostrittori.

Il *monossido d'azoto* (NO o ossido nitrico; v. MONOSSIDO D'AZOTO**), un nitrovasodilatatore endogeno, è stato identificato come il principale composto biochimico di produzione endoteliale in grado di determinare vasodilatazione. È sintetizzato a partire dalla L-arginina, per effetto della ossido nitrico sintetasi, e, attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi solubile nel citoplasma delle cellule muscolari lisce, produce un aumento della concentrazione intracellulare di GMP-ciclico e quindi una riduzione dei livelli intracellulari di calcio tramite l'apertura di canali del potassio. Anche la *prostaciclina* (PGI_2) raggiunge l'effetto di ridurre i livelli di calcio intracellulare, determinando quindi vasodilatazione, agendo però attraverso un'attivazione dell'adenilato ciclasi.

L'*endotelina* è un potente vasocostrittore polmonare, la cui sintesi può essere stimolata dall'ipossia, dall'angiotensina II, dalla vasopressina e dalle catecolamine. Si tratta di un peptide di 21 aminoacidi derivato dalla proendotelina; delle tre isoforme sinora identificate, l'endotelina-1 è la più diffusa e la meglio studiata (v. VASCOLARI VASOATTIVI FATTORI [v.*; v.**]).

Tra i mediatori vasoattivi di produzione endoteliale esistono anche specifiche interazioni: per es., il monossido d'azoto, attraverso l'aumento della concentrazione di GMP ciclico all'interno delle cellule endoteliali, inibisce la produzione di endotelina-1, inoltre l'endotelina-1 sembra stimolare la produzione di monossido d'azoto, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di regolazione a *feedback*.

Questi mediatori vasoattivi presentano inoltre anche altre proprietà: la prostaciclina e l'ossido d'azoto non presentano solo un effetto vasodilatatore, ma sono inoltre in grado di inibire l'aggregazione piastrinica e la replicazione delle cellule muscolari lisce all'interno della parete vascolare. Al contrario, l'endotelina-1 è in grado di promuovere la proliferazione delle cellule muscolari lisce. In tal modo le interazioni tra i vari mediatori di derivazione endoteliale hanno conseguenze non solo in rapporto al tono vascolare, ma anche al controllo della proliferazione delle cellule muscolari e della coagulabilità locale.

Una alterazione del normale equilibrio tra fattori vasocostrittori e vasodilatatori di produzione endoteliale è stata negli ultimi anni postulata come un possibile meccanismo responsabile degli effetti vasocostrittori dell'ipossia. Le modificazioni strutturali delle cellule endoteliali, dimostrate in pazienti con i.a.p. grazie all'impiego della microscopia elettronica (aumento dei microvilli di superficie, del reticolo endoplasmatico rugoso e dei fasci di microfilamenti) ed indicative di un aumento dell'attività metabolica, rappresenterebbero l'equivalente morfologico di una *disfunzione endoteliale*.

Nella i.a.p. primitiva ed in molte forme secondarie è stata messa in evidenza una compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente a causa di una diminuita sintesi e secrezione di monossido d'azoto (in pazienti affetti da BPCO: broncopneumopatia cronica ostruttiva; v. PNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA [v.; v.*]) e di prostaciclina (nelle forme primitive). In ratti cronicamente ipossici la somministrazione di monossido d'azoto previene l'insorgenza di vasocostrizione arteriolare e all'autopsia di pazienti con gravi forme primitive e secondarie di i.a.p. è stata messa

recentemente in evidenza una diminuita espressione endoteliale di ossido nitrico sintetasi.

Anche le sostanze vasocostrittrici possono essere implicate: la misurazione dei livelli di endotelina-1 nel sangue venoso ed arterioso, unitamente a studi immunocitochimici ed all'applicazione di tecniche di ibridazione *in situ*, ha fatto riscontrare, nei pazienti con ipertensione polmonare secondaria, una riduzione (assoluta o relativa ad aumentata produzione) della normale capacità di clearance dell'endotelina-1 da parte del letto vascolare polmonare e, nei pazienti con ipertensione polmonare primitiva, un aumentato rilascio di endotelina-1 da parte dell'endotelio polmonare. Ciò vale soprattutto per le forme di lunga durata e fornisce ulteriori conferme alla possibilità che questa sostanza, dotata anche di azione proliferativa sulle cellule muscolari lisce, potrebbe indurre il rimodellamento vascolare, dal quale dipende la stabilizzazione della ipertensione polmonare.

Rimodellamento vascolare

Il rimodellamento vascolare (v.***) è costituito dalle modificazioni strutturali a carico dei vasi polmonari unite a perdita (amputazione) di piccoli vasi polmonari periferici che usualmente si associano all'ipertensione polmonare cronica. A livello del circolo polmonare, il rimodellamento interessa specificamente le arteriole precapillari ed è la principale caratteristica istopatologica della ipertensione polmonare cronica.

I tratti salienti, che si riscontrano in tutti i disordini ipossici cronici (indipendentemente dall'etiologia), sono costituiti da:

- a) anomala deposizione di elevate quantità di collagene ed elastina a livello dell'avventizia vascolare;
- b) proliferazione di cellule muscolari lisce con aumento della muscolatura in arterie normalmente muscolarizzate (ipertrofia ed iperplasia);
- c) estensione distale della muscolatura in arteriole normalmente prive di tessuto muscolare (neomuscolarizzazione).

Quindi il rimodellamento vascolare si configura in lesioni che determinano una *arteriopatia mista*:

- a) *ostruttiva* (proliferazione dell'intima);
- b) *restrittiva* (ipertrofia della media, aumentata deposizione di collagene ed elastina nell'avventizia).

Si tratta di un evento *secondario* ad altri processi (che modificano l'emodinamica polmonare), ma che, una volta instauratosi, contribuisce a sua volta a modificare l'emodinamica polmonare creando una *ostruzione fissa* al flusso ematico per riduzione dell'area sezionale trasversa del letto vascolare. Oltre alla creazione di una ostruzione fissa, altra conseguenza importante del rimodellamento è costituita dalla *alterata reattività vascolare* ad agenti farmacologici ed alla ipossia (i vasi si comporterebbero come le vie aeree in corso di BPCO, presentando ostruzione fissa ed alterata reattività). Rappresenta la base istologica della vecchia asserzione per cui, nel polmone, *ipertensione genera ipertensione*. In modelli animali (ratti con ipossia cronica) il rimodellamento strutturale contribuisce per un terzo all'aumento della pressione arteriosa: degli altri due terzi sono responsabili la vasocostrizione ipossica e la poliploidia.

Fattori di grande meccanismo (pressione, tensione d'attrito, distensione) e l'ipossia cooperano nella ristrutturazione vascolare, innescando processi che inducono proliferazione cellulare vascolare. Fattori di crescita possono stimolare il rimodellamento delle pareti vasali in corso di ipertensione arteriosa polmonare: il TGF- β (*transforming growth factor- β*) è il più attivamente studiato tra quelli di

derivazione endoteliale, ma un ruolo potrebbe essere svolto anche da citochine come l'interleuchina-1 e dal fattore di crescita dei fibroblasti. Le cellule endoteliali interagiscono anche con le piastrine nel rilasciare fattori anticoagulanti e mantenere uno stato non trombogenico del parete vasale.

Terapia

Ossigenoterapia

Misure volte a prevenire l'ipossia rimangono un razionale approccio terapeutico in caso di ipertensione polmonare. L'ossigenoterapia (v.; v.**) riduce l'entità della vasocostrizione ipossica, può far regredire la progressione dell'i.a., prevenirne l'ulteriore aggravamento ed arrestare il progressivo rimodellamento vascolare osservabile abitualmente.

Nonostante la somministrazione continua (per almeno 14-18 ore al giorno) di ossigeno a basso flusso (2 l/min) lungo termine abbia dimostrato (*Nocturnal Oxygen Therapy Trial*) di migliorare la sopravvivenza in pazienti affetti da BPCO con ipossiemia, tuttavia non è stata ancora dimostrata una chiara relazione tra miglioramento della sopravvivenza in seguito a somministrazione di ossigeno supplementare e miglioramento dell'emodinamica polmonare. La diminuzione della pressione arteriosa polmonare è di grado molto modesto ed è inversamente correlato con l'entità dell'ipertensione: ciò conferma il fatto che probabilmente la pressione arteriosa polmonare molto elevata e persistente viene raggiunta e mantenuta per molto tempo non tanto per azione della vasocostrizione, quanto per il successivo progressivo rimodellamento vascolare.

Vasodilatatori

L'uso dei vasodilatatori (v.) nell'ipertensione polmonare presuppone che la vasocostrizione contribuisca al mantenimento di un elevato regime tensivo e che una diminuzione del post-carico possa migliorare la funzione ventricolare destra. Quindi, anche se persistono le indicazioni teoriche tale trattamento, è necessario giungere ad una diagnosi etiologica quanto mai rigorosa prima di intraprendere terapia, soprattutto dal momento che il trattamento con vasodilatatori in pazienti affetti da i.a.p. non ha ancora dimostrato con certezza un effettivo miglioramento nelle condizioni emodinamiche o nella sopravvivenza.

Nell'ambito delle pneumopatie parenchimali, due sono le condizioni che possono richiedere una terapia vasodilatatrice polmonare:

l'ARDS (*Adult Respiratory Distress Syndrome*) che realizza un quadro di insufficienza respiratoria di tipo I (*ipossiemia acuta*);

la BPCO (in fase di riacutizzazione) che realizza un quadro di insufficienza respiratoria di tipo II (*insufficienza ventilatoria, ipossiemia-iperapnea*).

I meccanismi patogenetici responsabili della insufficienza respiratoria (ipossiemia) sono diversi nelle due condizioni: uno *shunt* nei pazienti con ARDS;

un alterato rapporto ventilazione alveolare/perfusione capillare (V_A/Q_c) nei pazienti con BPCO.

I diversi meccanismi fisiopatologici responsabili delle alterazioni degli scambi gassosi rendono ragione dei diversi effetti sortiti dalla terapia vasodilatatrice.

Poiché la risposta alla terapia è variabile e singole sostanze possono esibire buoni risultati in occasionali pazienti, anche in assenza di sperimentazioni comprovanti la loro efficacia, si è proposto di valutare gli effetti emodinamici acuti di una serie di farmaci (soprattutto la prostaglandina E_1 , la prostaciclina e l'adenosina che sono sostanze relativamente sicure, molto efficaci e dotate di una durata

d'azione molto breve) in ogni caso di i.a.p., con l'obiettivo di selezionare una terapia individualizzata da proseguire nel lungo periodo, nel presupposto che la risposta farmacologica rimanga invariata nel tempo.

La maggior parte dei vasodilatatori non presenta caratteristiche di selettività nei confronti dei vasi polmonari; perciò nella patologia vascolare polmonare le dosi di vasodilatatori necessarie al raggiungimento di effetti farmacologici apprezzabili sono superiori a quelle che sono utilizzate nell'angina e nell'ipertensione arteriosa sistemica.

Nei pazienti con pneumopatie parenchimali la terapia vasodilatatrice per via sistemica non è priva di effetti collaterali: tachicardia, ipotensione, accentuazione della ipossiemia (aumentata perfusione di unità polmonari poco ventilate). Per questo motivo, notevole interesse ha suscitato la possibilità di eseguire una terapia vasodilatatrice per via inalatoria: sia il monossido d'azoto ($v.^{**}$) che la prostaciclina (PGI_2) nebulizzata — entrambi potenti vasodilatatori — si prestano a questo scopo. Con effetti — nelle condizioni cliniche ricordate — diversi: nei pazienti ARDS (con *shunt*) il vasodilatatore per via inalatoria non raggiunge le aree prive di ventilazione e, pertanto non modifica il flusso ematico in queste aree. Al contrario, quando un vasodilatatore per via inalatoria viene somministrato a pazienti BPCO, induce una vasodilatazione (rimozione della vasocostrizione ipossica) in aree con basso rapporto ventilazione/perfusione: con conseguente peggioramento dello scambio gassoso (accentuazione della ipossiemia).

I calcioantagonisti producono una significativa riduzione nelle resistenze vascolari polmonari in circa il 20-30% dei pazienti: questa percentuale relativamente bassa riflette verosimilmente il ruolo variabile che ha la vasocostrizione polmonare nei vari pazienti; i più diffusamente impiegati rimangono la *nifedipina* ed il *diltiazem*. Le varie sperimentazioni cliniche che hanno valutato altri vasodilatatori (idralazina, diazossido, nitrati, ACE-inibitori, antagonisti alfa-adrenergici, agonisti beta-adrenergici) hanno prodotto risultati contraddittori e, nel complesso, deludenti.

Il razionale per l'uso di infusioni endovenose continue di *prostaciclina* in pazienti con i.a.p. è stato basato inizialmente sulla dimostrazione di una sua potente azione come vasodilatatore della circolazione polmonare in animali da esperimento con vasocostrizione polmonare acuta indotta da vari stimoli. Pertanto infusioni di prostaciclina di breve durata sono state utilizzate in passato come metodo per individuare l'esistenza di una componente di reattività vascolare in pazienti con ipertensione polmonare primitiva e quindi per stabilire l'eventuale indicazione ad un trattamento protratto con vasodilatatori. Del tutto recentemente (McLaughlin *et al.*, 1998) è stato confermato che la terapia a lungo termine, con prostaciclina per infusione endovenosa continua, riduce le resistenze vascolari polmonari (mediamente di oltre il 50%) in misura clinicamente significativa.

La dimostrazione di una efficacia prolungata (mediamente oltre un anno) è importante perché fa ragionevolmente supporre che altri fattori (oltre la vasodilatazione) siano responsabili della favorevole risposta: in particolare il rimodellamento vascolare, ancora non del tutto chiarito nei suoi meccanismi di sviluppo, che è il vero elemento distintivo della malattia. Nell'i.a.p., infatti, la vasocostrizione polmonare è solo uno (e quantitativamente non il più importante) dei problemi: la malattia è in larga misura riferibile a intrinseche lesioni vascolari occlusive e al danno anatomico conseguente a processi infiammatori, proliferativi e trombotici. Con questa dimostrazione gli orizzonti terapeutici si estendono al di là della vasodilatazione e lasciano sperare che in un prossimo futuro si possa intervenire farmacologi-

camente sulle risposte proliferative ed obliterative responsabili del rimodellamento vascolare.

Negli ultimi anni ha guadagnato un certo consenso l'uso del *monossido d'azoto* ($v.^{**}$) che, se somministrato per via inalatoria, si è dimostrato in grado di indurre una vasodilatazione tendenzialmente selettiva sul circolo polmonare. La natura gassosa e la rapida inattivazione grazie al legame con l'emoglobina rappresentano i principali vantaggi rispetto alla prostaciclina, consentendo la somministrazione per via inalatoria in assenza di una significativa riduzione delle resistenze vascolari sistemiche. Questo approccio terapeutico però, necessitando di somministrazione praticamente continua, è scarsamente accettato dal paziente, se non per brevi periodi, ed inoltre è emerso il dubbio fondato che l'efficacia diminuisca progressivamente nel tempo: ciò ha fatto sì che attualmente l'utilità di questo vasodilatatore di recente introduzione resti limitata a valutare la presenza di una componente di reattività vascolare. Una ingegnosa associazione terapeutica è stata recentemente proposta per migliorare l'ossigenazione arteriosa in pazienti BPCO: essa prevede l'associazione di monossido d'azoto ($[v.^{**}]$, per via inalatoria) con la somministrazione (per infusione) di *almitrina* ($[v.^{*}]$, uno stimolante dei chemiorecettori carotidei che ha come effetto un rinforzo della vasocostrizione polmonare ipossica). Il razionale di questo intervento terapeutico è illustrato nella fig. 2.

Anticoagulanti

La terapia con anticoagulanti orali a tempo indeterminato rimane raccomandata nell'ipertensione polmonare da malattia tromboembolica. Per quanto riguarda l'ipertensione polmonare primitiva, solo negli ultimi anni uno studio retrospettivo ha risolto l'incertezza nell'indicazione a questo trattamento, dimostrando che la sopravvivenza è significativamente più lunga nei pazienti sottoposti a terapia anticoagulante.

Terapia chirurgica

Nell'ipertensione polmonare dovuta a fenomeni tromboembolici cronici (forma non così rara come sembrava una volta) l'intervento chirurgico di *tromboendarteriectomia* può restituire al circolo polmonare ed al ventricolo destro una funzione pressoché normale. Sfortunatamente tale terapia, non essendo applicabile nella forma embolica disseminata e periferica, è riservata alla presenza di trombi prossimali. Il rischio operatorio è relativamente alto (circa il 10%), ma rimane comunque accettabile se rapportato all'eccellente risultato a distanza in confronto con la prognosi infausta legata alla persistenza di ipertensione polmonare.

Nei casi di ipertensione polmonare che non rispondono alla terapia medica, il *trapianto cuore-polmoni* rimane una risorsa estrema che si è diffusa negli ultimi anni per il miglioramento delle tecniche operatorie e per l'enorme progresso verificatosi nel settore della terapia antirigetto. Le condizioni più frequentemente interessate sono la ipertensione polmonare primitiva, le fibrosi progressive, la fibrosi cistica e le cardiopatie congenite con vasculopatia polmonare irreversibile. Oltre al rigetto le complicanze più temibili sono rappresentate dalle infezioni respiratorie in generale e dalla bronchiolite obliterativa. In particolar modo in questi pazienti il trapianto di un solo polmone rappresenta ormai una valida alternativa al trapianto di entrambi i polmoni o al trapianto cuore-polmoni: infatti consente di evitare la coronaropatia che complica il trapianto cuore-polmoni e di aumentare il numero di pazienti che si possono avvantaggiare della disponibilità di un donatore. La sopravvivenza precoce (da 1 a 3 mesi) è migliore nei pazienti che ricevono il trapianto di entrambi i polmoni, tuttavia la

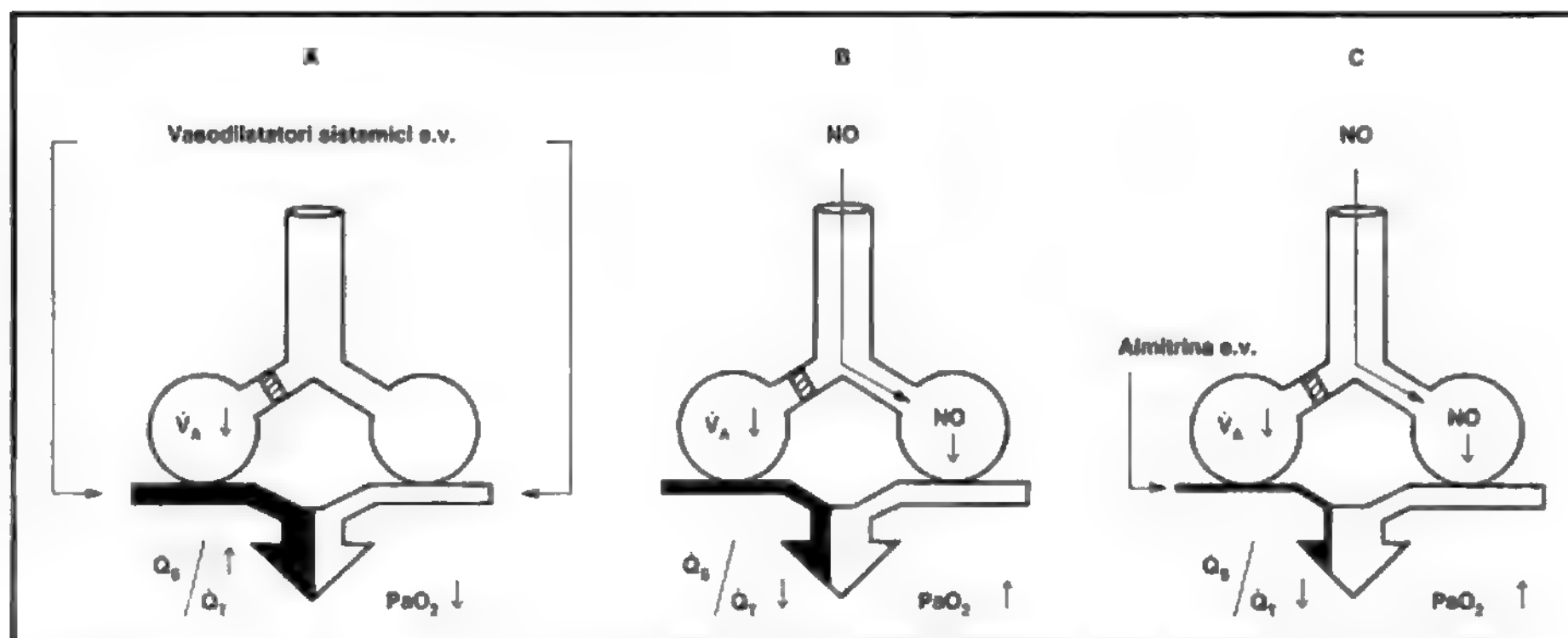


Fig. 2. A) Vasodilatatore per via sistemica (per es. prostaciclina): dilata i vasi polmonari sia a livello delle aree polmonari poco ventilate che di quelle normo-ventilate; l'entità della frazione di shunt intrapolmonare (Q_s/Q_t) aumenta e la PaO_2 si riduce. B) Vasodilatatore per via inalatoria (monossido d'azoto), induce una vasodilatazione preferenzialmente a livello delle aree ben ventilate; lo shunt intrapolmonare si riduce, il rapporto ventilazione/perfusione (V_A/Q) migliora, la PaO_2 aumenta. C) Associazione monossido d'azoto (per via inalatoria) + almitrina (per via endovenosa). L'effetto di rinforzo della vasocostrizione polmonare ipossica (predominante a livello del letto vascolare polmonare sede di shunt) riduce il Q_s/Q_t e migliora (nettamente) la PaO_2 .

sopravvivenza ad 1 anno (circa il 70%) è praticamente sovrapponibile nei pazienti che ricevono un solo o entrambi i polmoni.

Bibliografia

- Auger W. R., *Pulmonary hypertension and cor pulmonale*, in *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 1995, 1, 303-312.
 Derenne J. P., Withelaw W. A., Similowski T. eds., *Acute respiratory failure in chronic obstructive pulmonary disease*, in *Lung biology in health and disease*, vol. 42, 1996, Dekker, New York.
 Higenbottam T., *Chest*, 1994, 105, 7S-11S.
 McLaughlin V. V. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338 (5), 273-277.
 Nichols W. C., Koller D. L., Slovis B. et al., *Nature Genetics*, 1997, 15 (3), 277-280.
 Rich S., Braunwald E., Grossman W., *Pulmonary Hypertension*, in Braunwald E. ed., *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 1997, 5 ediz., Saunders, Philadelphia (Chap. 25, pp. 780-806).
 Vender R. L., *Chest*, 1994, 106, 236-243.
 Weitzenblum E., Kessler R., Oswald M., Fraisse Ph., *Eur. Respiratory J.*, 1994, 7, 148-152.
 Weitzenblum E., Denolin H., *Hypertension artérielle pulmonaire*, 1993, Masson, Paris.

ENRICO BOSCHIETTI, ANTONIO POLITI E VITTORIO GRASSI

IPERTENSIONE PORTALE: V. ASCIPI ** (*621-628); CIRROSI EPATICA* (*1595-1598); CIRROSI EPATICA** (*1210-1214); ESOFAGO* varici esofagee ed emorragie da varici (*2905-2910); ESOFAGO**, varici esofagee (*2093-2097); IPERTENSIONE PORTALE (VIII, 221-244); IPERTENSIONE PORTALE* (*4045-4049).

IPERTRICOSI [v. vol. VIII, coll. 270-274]

IPERTRICOSI CONGENITE DIFFUSE

Ipertricosi lanuginosa congenita

Patologia a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata dalla presenza fin dalla nascita di pelo maturo, nero e spesso, che copre la totalità del corpo. Si ipotizza possa essere dovuta a mutazione di un gene che regola la presenza a livello pilare. Alla pubertà, i peli ascellari e la barba mantengono il loro aspetto lanuginoso.

Ipertricosi congenita generalizzata

L'ipertricosi congenita generalizzata è una patologia rara a trasmissione *X-linked* dominante a penetranza completa. Nel 1984 Macias-Flores *et al.* descrissero per primi questa particolare forma di ipertricosi distinguendola chiaramente dalle altre sino ad allora conosciute. La loro segnalazione riguarda una famiglia messicana composta da 19 individui affetti distribuiti in cinque generazioni.

I soggetti affetti da ipertricosi congenita generalizzata presentano sin dalla nascita un'eccessivo sviluppo di peli caratteristicamente localizzati al volto ed alla porzione inferiore del corpo, escluse le palme delle mani e le piante dei piedi, che aumentano di numero nel primo anno di vita.

Come per altre patologie a trasmissione *X-linked* dominante, anche nella ipertricosi congenita generalizzata i caratteri propri della patologia si trovano completamente espressi nei soggetti di sesso maschile, mentre nei soggetti di sesso femminile sono presenti in misura più contenuta e la distribuzione dei peli in eccesso è meno simmetrica.

Del tutto recentemente (Figuera *et al.*, 1995) è stato possibile identificare il gene dell'ipertricosi congenita generalizzata localizzato nella regione Xq24-q27.1 del cromosoma X.

Bibliografia

- Benker G., *Hormonwerte entscheiden. Diagnostik*, 1985, 18, 28.
 Figuera L. E., Pandolfo M., Dunne P. W., Cantù J. M., Patel F., *Nature Genetics*, 1995, 10 (2), 202.
 Duprè A., Viraben R., *Ipertricosi*, in *Manuale di Dermatologia e Venereologia*, 1993, Masson Italia, Milano, p. 617.
 Kvedar J. C., Gibson M., Krusinski P. A., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1985, 12, 215-225.
 Macias-Flores M. A. et al., *Hum. Genet.*, 1984, 66, 66-70.
 Olsen E. A., *Hypertrichosis*, in Olsen E. A. ed., *Disorders of Hair Growth. Diagnosis and Treatment*, 1994, McGraw-Hill, New York, pp. 315-333.
 Rook A., Dawber R., *Hypertrichosis*, in Rook A., Dawber R. e *Disease of hair and scalp*, 1991, Blackwell Scientific Publications, London.

LUIGI VALENZANO E CARLA VALENZANO

IPOCALCEMIA

f. *hypocalcémie*. - i. *hypocalcemia*. - τ. *Hypocalcémie*. - s. *hypocalcemia*.

SOMMARIO

Definizione (col. 2925). - **Meccanismi di difesa dall'ipocalcemia** (col. 2925). - **Etiopatogenesi dell'ipocalcemia** (col. 2928): *Ipoalcalmia da ipoparatiroidismo*. - *Ipoalcalmia da ipomagnesiemia*. - *Ipoalcalmia da pseudoipoparatiroidismo*. - *Ipoalcalmia da disordini della vit. D*. - *Ipoalcalmia acuta*. - **Quadro clinico e iter diagnostico** (col. 2934). - **Terapia** (col. 2937).

Definizione

L'ipocalcemia [i.] è la diminuzione della calcemia (v.) al di sotto dei valori normali. Il calcio sierico totale oscilla abitualmente tra 8,5 e 10,8 mg/dl e la quota ionizzata tra 4,6 e 5,4 mg/dl: una calcemia inferiore a 7 mg/dl, a cui corrisponde un calcio ionizzato di 3,5 mg/dl, è solitamente sintomatica, purché i livelli plasmatici di albumina siano normali. Se questi ultimi sono ridotti, ad un calcio totale basso non corrisponde una riduzione della frazione ionizzata ed è necessario correggere la calcemia in funzione dei livelli delle proteine plasmatiche. Un metodo pratico e rapido consiste nell'aggiungere ai livelli misurati 0,8 mg/dl per ogni riduzione dell'albumina di 1 g al di sotto dei 4 g/l.

Meccanismi di difesa dall'ipocalcemia

Milioni di anni fa la vita nacque nel mare: la calcitonina (v.; v.*) svolse un ruolo critico per contenere il sovraccarico di calcio a cui sono esposti gli animali marini. Quando la vita si spostò sulla terra, i primi vertebrati ebbero a fronteggiare la situazione opposta: da ciò la necessità di robuste riserve di calcio, come lo scheletro, cui attingere in situazioni di carente apporto, ed un efficace sistema omeostatico per difendersi dal rischio incombente di i.

Questo sistema è articolato su due componenti: la prima

è rappresentata dai sensori cellulari delle paratiroidi in grado di percepire minime variazioni del calcio ionizzato. La seconda componente è un sistema effetore di cellule specializzate nel trasporto del calcio, localizzate nei reni, nelle ossa e nell'intestino e responsive agli ormoni calciotropi (fig. 1). Il *set point* delle paratiroidi è regolato ad un livello di calcio ionizzato di circa 4 mg/dl, quindi al di sotto dei valori normali. In presenza di normocalcemia le cellule paratiroidi sono quindi in uno stato di quiescenza funzionale e dispongono di una enorme riserva funzionale, da erogare per ostacolare lo sviluppo di un'i. È sufficiente una riduzione del calcio ionizzato di appena l'1% (0,04 mg/dl) ad indurre il rilascio immediato del paratormone (PTH): ciò causa fosfaturia, incremento del riassorbimento tubulare distale del calcio ed aumento della sintesi renale di calcitriolo (v. *7579-7593) e quindi dell'assorbimento intestinale di calcio e fosfato. Il PTH ed il calcitriolo favoriscono anche la mobilitazione del minerale dall'osso e quindi quote aggiuntive di calcio, ma anche di fosfato, raggiungono il *pool* extracellulare: tuttavia l'effetto fosfaturico del PTH impedisce che si accumuli un eccesso di fosfato, inopportuno quando il calcio non è destinato alla formazione dell'idrossiapatite.

Vi è una costante progressione nella risposta delle paratiroidi al calo della calcemia: nell'arco di pochi secondi vi è il rilascio dell'ormone preformato, le cui scorte, oltretutto, risultano potenziate da una minore degradazione endocellulare. Se lo stimolo ipocalcemico persiste per qualche ora prende il via la sintesi del PTH e, dopo qualche giorno, la proliferazione di nuove cellule paratiroidi. Il calcitriolo si oppone alla proliferazione delle paratiroidi; ma se i livelli di calcitriolo sono bassi, come accade nell'insufficienza renale, l'iperplasia paratiroidea è massiva e rapida ad instaurarsi.

Il punto debole di questo meccanismo omeostatico sta nell'unicità del sensore del calcio: quando le paratiroidi sono diffusamente danneggiate esso viene colpito al cuore e risulta incapace di contrastare l'insorgenza di un'i. È quanto accade nell'ipoparatiroidismo (*ipo-PTH*) o nelle sindromi

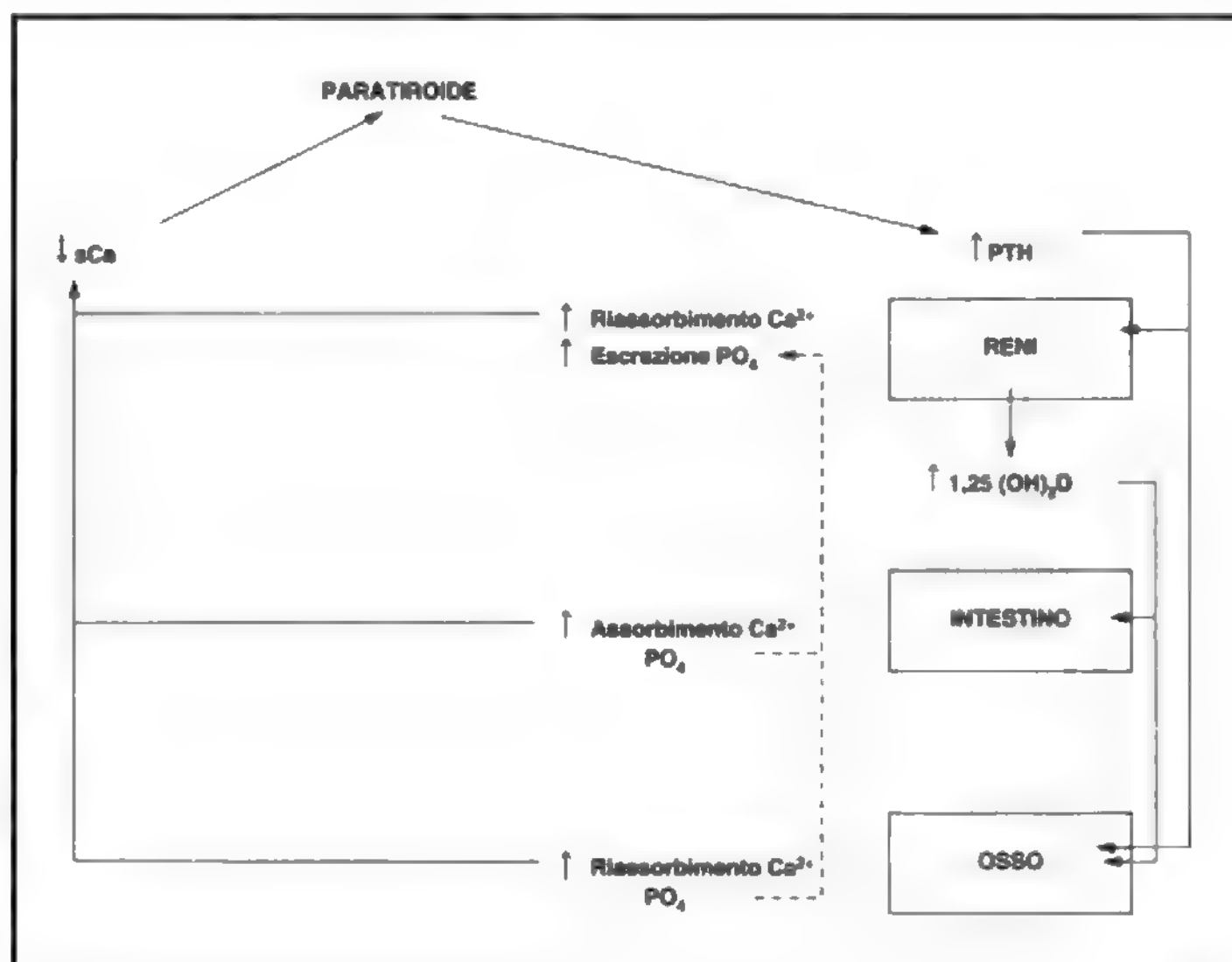


Fig. 1. Difesa dall'i. Un deficit del PTH colpisce alla base il sistema omeostatico preposto alla difesa dell'i.: non sono possibili meccanismi di compenso. Al contrario la riduzione dell'assorbimento intestinale di calcio potrà essere compensata da un più completo riassorbimento del calcio filtrato e dal prelievo di minerale dallo scheletro. sCa) calcio sierico.

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELLE IPOCALCEMIE

- I. Ipoparatiroidismo**
 - A. Ablazione chirurgica
 - B. Infiltrativo
 1. neoplastico
 2. sarcoidosi
 3. emocromatosi
 4. malattia di Wilson
 - C. Radiante
 - D. Idiopatico
 - ad esordio precoce (genetico [tab. II])
 1. isolato persistente neonatale
 2. sindrome di DiGeorge
 3. sindrome polighiandolare autoimmune (I)
 4. altre forme
 - ad esordio tardivo
 1. idiopatico dell'adulto
 - E. Funzionale
 1. transitorio neonatale (iper-PTH materno)
 2. ipomagnesiemia
 3. edema/emorragia
- II. Pseudoipoparatiroidismo**
- III. Disordini della vit. D**
 - A. Deficit di vit. D
 1. nutrizionale
 2. scarsa irradiazione solare
 3. malassorbimento
 - B. Alterato metabolismo della vit. D
 1. farmaci anticonvulsivi
 2. rachitismo vit. D dipendente (tipo I)
 3. insufficienza renale cronica
 - C. Resistenza alla vit. D
 1. malassorbimento
 2. rachitismo vit. D resistente (tipo II)
- IV. Ipocalcemia acuta**
 - A. Pancreatite acuta
 - B. Iperfosforemia
 1. somministrazione di fosfati
 2. lisi tumorale
 3. rhabdmiolisi
 4. insufficienza renale
 - C. Metastasi osteoblastiche
 - D. Sindrome dell'«osso affamato» (*hungry bone*)
 - E. Farmaci
 1. inibitori del riassorbimento osseo
 2. mezzi di contrasto con EDTA
 3. sangue citrato
 4. pentamidina
 5. foscarnet
 - F. Shock tossico e cardiogeno; morbilli

da resistenza al PTH (*pseudoipo-PTH* o *PHP*). Gli effettori del calcio sono invece tre, e se uno di essi è compromesso gli altri due possono supplire. Tuttavia, l'assorbimento intestinale è il sistema fisiologico per apportare calcio all'organismo e quindi il mezzo più vantaggioso: quando esso è inadeguato (*dieta povera di calcio, ipovitaminosi D, malassorbimento*) anche il completo riassorbimento dal nefrone distale non consente di pareggiare le perdite fisse di calcio e quindi di mantenere in equilibrio l'omeostasi minerale. L'organismo è costretto a prelevare calcio dall'osso ed in queste condizioni la difesa dall'i. causerà a lungo andare un eccessivo indebolimento dello scheletro. Per mantenere l'equilibrio minerale sono sufficienti 400-500 mg di calcio a livello di consumo, ma per garantire l'elasticità funzionale, necessaria ad ogni sistema omeostatico, una dieta equilibrata deve apportare non meno di 1000-1500 mg di calcio, ciò consente di fronte varie situazioni, anche transitorie, di mantenere richiesta.

Etiopatogenesi dell'ipocalcemia

Ipocalcemia da ipoparatiroidismo

Si presenta abitualmente come disordine *post-chirurgico* (tab. I): la tiroidectomia totale, la dissezione radicale in corso di patologia neoplastica infiltrativa del collo, ripetuti interventi sulla regione tiroidea, quasi sempre motivati dalla recidiva di un iperparatiroidismo, come purtroppo può accadere nell'iperplasia delle paratiroidi, sono le cause più frequenti di ablazione totale del tessuto paratiroideo. In funzione dell'abilità del chirurgo, l'incidenza dell'ipo-PTH non supera abitualmente il 5-10%. Talora esso è *transitorio*: è necessario qualche giorno perché riprenda a pieno l'attività delle paratiroidi residue sopresse dall'ipercalcemia prodotta da un adenoma paratiroideo. Altre volte sono l'edema o l'emorragia delle paratiroidi conseguenti alla manipolazione chirurgica a produrre un transitorio *knock-out* funzionale. Queste forme di i. *post-chirurgica* possono essere accentuate e prolungate dalla vorace utilizzazione del calcio per la rapida resintesi di osso (*hungry bone*) a seguito della correzione di un iper-PTH o un iper- T_4 che avevano provocato una grave perdita di tessuto. Infine, una ipomagnesiemia è evenienza tutt'altro che eccezionale nel paziente chirurgico: va sempre tenuta presente se si vuole evitare di dover contenere a fatica un'i. con ripetute infusioni di calcio, quando la somministrazione di solfato di Mg risolverebbe rapidamente il problema. All'opposto un danno permanente delle paratiroidi può prodursi per *invasione neoplastica* del collo o ad esito di una *irradiazione «a mantellina»* in corso di una patologia linfomatosa. L'emocromatosi, la sarcoidosi o la malattia di Wilson sono cause infrequenti.

L'*ipo-PTH idiopatico*, decisamente raro, riconosce quasi sempre cause genetiche (tab. II). I progressi degli ultimi anni nel settore della biologia molecolare hanno consentito di identificare per alcuni di questi disordini lo specifico difetto cromosomico (Bassett e Thakker, 1995). L'aplasia delle paratiroidi si osserva quasi sempre nei nati da matrimoni tra consanguinei: essa causa una *i. neonatale persistente*, cosiddetta per distinguerla da quella transitoria dei

TAB. II. IPOPARATIROIDISMO CONGENITO

Disordine	Anomalie associate	Trasmissione
Ipo-PTH persistente neonatale	Nessuna	AD AR ER (X)
Sindrome di DiGeorge	Aplasia del timo	AD
Sindrome di Kenney-Caffey	Bassa statura, osteosclerosi, calcificazione gangli basali, nanofthalmi, iperopia	AD
Sindrome di Barakat	Sordità nervosa, nefrosi	AR
Sindrome di Kearns-Sayre	Oftalmoplegia, retinite pigmentosa, blocco cardiaco	AR
Sindrome polighiandolare autoimmune tipo I	Candidiasi + morbo di Addison, Alopecia, Malassorbimento, Ipo-gonadismo, Diabete Mellito tipo I, Epatiche croniche attive, Anemia perniciosa, Ipotiroidismo, Vitiligine	AR

AD = autosomica dominante; AR = autosomica recessiva; ER = eterosomica recessiva.

neonati da madri affette da iper-PTH. Nella *sindrome di DiGeorge* si associa anche ipoplasia del timo ed un deficit dell'immunità cellulare: un difetto di migrazione del mesenchima della cresta neurale nella 3^a e 4^a tasca branchiale, da cui originano paratiroidi e timo, esita in questa rara sindrome. Il difetto genetico, localizzato a livello del cromosoma 22, può essere anche espressione di una embriopatia diabetica o da retinoidi o di una fetopatia da alcol. Nella *sindrome polighiandolare autoimmune tipo I* (v. POLIENDOCRINOPATIE AUTOIMMUNI) l'esordio dell'ipo-PTH avviene più tardi, tra i 5 ed i 10 anni di età, con una candidiasi delle unghie dei piedi e della mucosa orale. L'i. compare più tardi e solo in una fase successiva si affacciano una malattia di Addison o altri disordini endocrini. Via via vengono individuate e descritte sempre nuove sindromi complesse, ove l'ipo-PTH si associa ad altre anomalie congenite o a disordini dell'immunità (tab. II).

Un danno autoimmunitario, limitato alle paratiroidi e ad esordio tardivo, è la causa non eccezionale del cosiddetto *ipo-PTH idiopatico dell'adulto*.

V. anche IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO (v.; v.*; v.**); PARATORMONE**.

Ipocalcemia da ipomagnesiemia

Del pool totale di magnesio (Mg, 25 mEq/kg) solo l'1% è in sede extracellulare contro il 31% localizzato nell'interno delle cellule; la restante quota è a costituire il minerale dell'osso. La maggior parte del Mg endocellulare è legata alle membrane biologiche: con questa quota è in equilibrio il Mg libero, biologicamente attivo, essenziale per il funzionamento di numerosi sistemi enzimatici, per lo più coinvolti nel trasporto, accumulo ed utilizzazione dell'energia, soprattutto in forma di ATP. Se si considera il ruolo centrale dell'ATP nel metabolismo energetico, si comprende in che modo un deficit di Mg possa avere gravi ripercussioni su svariati processi biologici.

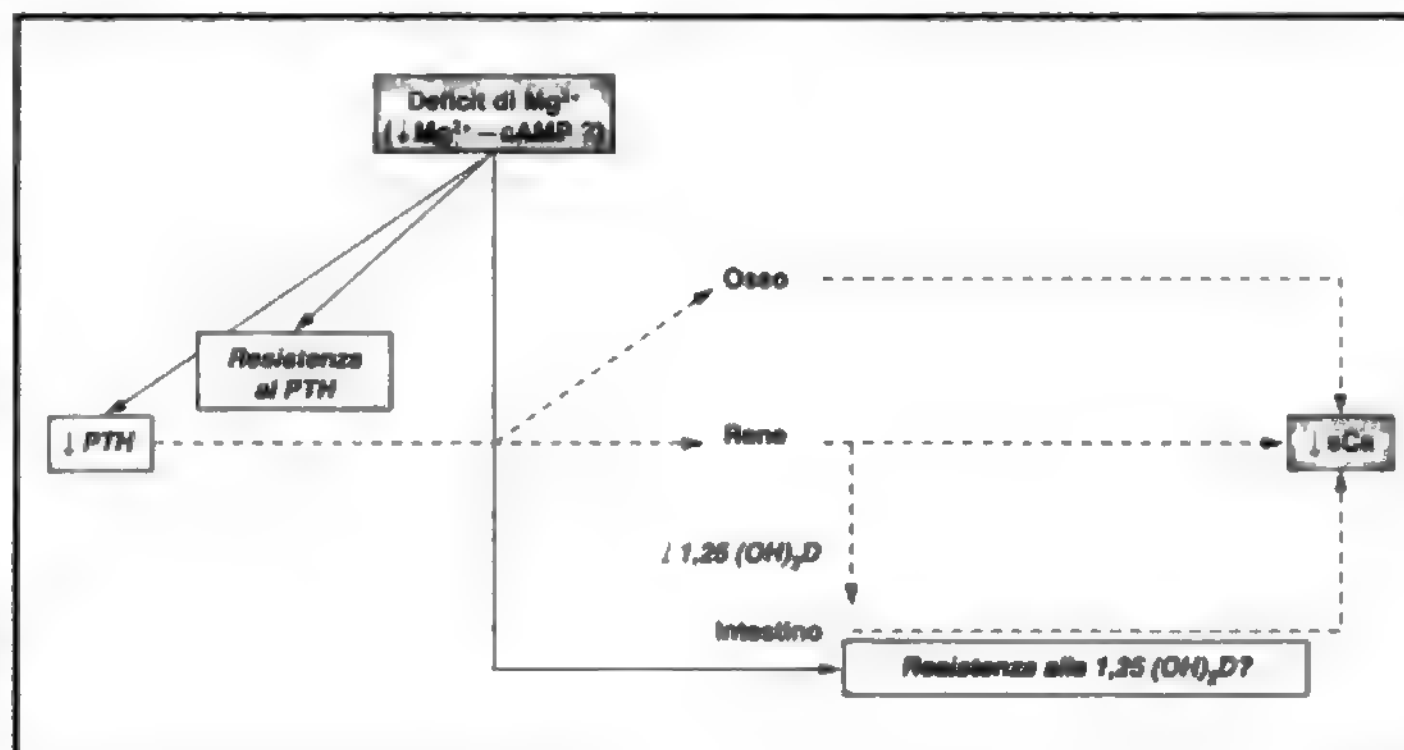
La carenza di Mg è anomalia elettrolitica di frequente riscontro: si calcola che più del 50% dei pazienti ricoverati in un reparto di terapia intensiva presenta un deficit moderato o grave. La tab. III ne elenca le principali cause. Accertare una carenza di Mg di lieve o moderata entità non è sempre agevole, data la preminente localizzazione endocellulare di questo ione. Dunque è buona norma che il medico consideri sempre la possibilità di un simile disordine in ogni paziente che abbia una condizione predisponente, soprattutto se concomita ipopotassiemia.

TAB. III. CAUSE DI DEFICIT DI MAGNESIO

Disordini gastroenterici	Prolungata aspirazione nasogastrica Sindromi da malassorbimento Resezione intestinale estesa Diarrea prolungata (abuso di lassativi) Fistole intestinali e biliari Pancreatite Malnutrizione Alimentazione parenterale Alcolismo
Disordini renali	Alimentazione parenterale Diuresi osmotica Glicoso (diabete) Mannitolo Urea Ipercalcemia Alcol Farmaci Diuretici dell'ansa (furosemi- de, ac. etacrinico) Aminoglicosidi Cisplatino Amfotericina B Pentamidina Digossina (?) Acidosi metabolica Diggiuno prolungato Chetoacidosi Alcolismo Malattie renali Nefropatie croniche Fase poliurica della necrosi tu- bulare Nefropatia postostruttiva Acidosi tubulare renale Trapianto renale Ipomagnesiemia primitiva

La genesi dell'i. da deficit di Mg non è stata definitivamente chiarita ed è probabile che intervengano meccanismi plurimi, anche nello stesso paziente (Rude, 1994) (fig. 2). Non vi è dubbio che la carenza di Mg determina una *compromissione del rilascio (e della sintesi?) di PTH*: la maggior parte dei pazienti presenta livelli bassi o normali, quindi inappropriati in corso di i. Talora, per lo più nelle fasi

Fig. 2. Deficit di Mg e i. Il deficit di Mg è disordine di frequente riscontro, soprattutto nelle unità di terapia intensiva. L'i., una delle complicazioni più gravi, è da riferire principalmente ad ipoparatiroidismo. Nonostante i livelli di calcitriolo possano essere ridotti, la somministrazione di 1,25(OH)₂D non potenzia l'assorbimento intestinale di calcio: dunque vi è resistenza anche all'azione del calcitriolo. La compromissione di molteplici tappe del metabolismo minerale, al pari di numerosi altri processi biologici, potrebbe essere spiegata dalla difficoltà dell'organismo ad utilizzare l'energia (ATP) in corso di deplezione di Mg. In corso e nel reticolo le tappe influenzate dal deficit di Mg. sCa) calcio sierico.



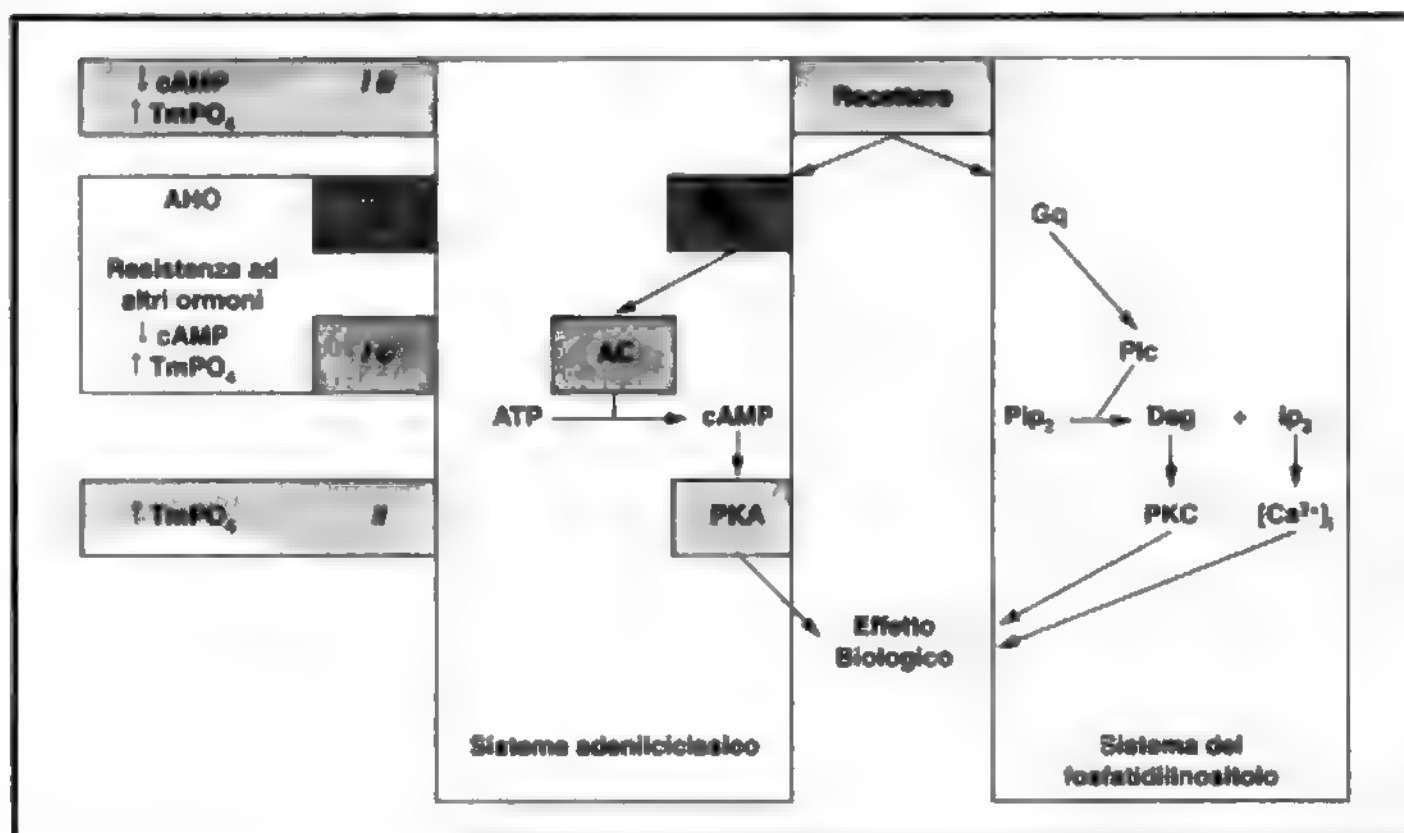


Fig. 3. Il recettore del PTH, localizzato sulla membrana plasmatica, è connesso a due classi di proteine G. La proteina Gs media la stimolazione dell'adenilciclasi (AC) e la produzione di cAMP che, a sua volta, attiva una proteinkinasi A (PKA). La proteina Gq stimola la fosfolipasi C (PLC) a produrre inositotrisfosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) dal fosfatidilinositolo (PIP_2) di membrana. L' IP_3 aumenta il calcio intracellulare e il DAG stimola l'attività della proteinkinasi C (PKC). La stessa retinatura indica, per ciascuna forma di pseudoipoparatiroidismo, la sede accertata o presunta del difetto del sistema recettore-adenilciclasi, cAMP) acido adenilico ciclico; $TmPO_4$) soglia tubulare massima dei fosfati; AHO) osteodistrofia di Albright.

iniziali di una deplezione di Mg, il PTH può risultare addirittura elevato, il che indica *resistenza all'ormone*: a causa di ciò il rimodellamento osseo risulta inadeguato a mobilizzare minerale dallo scheletro per correggere i bassi livelli di calcio; il rene, dal canto suo, controlla con pigrizia le varie tappe dell'equilibrio idro-elettrolitico e diviene incapace di sintetizzare calcitriolo, sicché l'assorbimento intestinale del calcio si fa carente (fig. 2). Sia la secrezione del PTH che la sua piena attività sono mediate dalla disponibilità di cAMP-Mg: è ipotizzabile che a questo meccanismo unitario possano essere ricondotte le anomalie plurime osservate in corso di deficit di Mg. V. anche MAGNESIO [v.; v.*].

Ipopocalcemia da pseudoipoparatiroidismo

Nello pseudoipo-PTH la concomitanza di i. e livelli elevati di PTH indica una resistenza degli organi bersaglio all'ormone. Il recettore del PTH, localizzato sulla membrana plasmatica, è funzionalmente connesso ad una famiglia di proteine che legano il nucleotide guaninico, proteine G (v.**; v. anche RECETTORI [v.; v.*; v.**]): come messaggeri endocellulari vengono sfruttati dal PTH sia il sistema del fosfatidilinositolo (PIP) che quello adenilciclasico (v. SEGNALI CELLULARI**), ma è quest'ultimo ad essere principalmente coinvolto nello pseudoipo-PTH (fig. 3; tab. IV).

Nella forma classica, il tipo I, la resistenza al PTH deriva da un'alterazione genetica (AD) della subunità α della pro-

teina Gs (tipo Ia) o di una diversa componente del sistema recettore/adenilciclasi (tipo Ic) (Levine *et al.*, 1988); in entrambi i casi risulta compromessa la sintesi di cAMP. Sono ridotti soprattutto l'effetto fosfaturico e l'attivazione della 1- α -idrossilasi, azioni che il PTH esplica a livello del tubulo prossimale: ne conseguono iperfosforemia e riduzione della sintesi di calcitriolo. È conservata una parziale attività dell'ormone sul nefrone distale, dato che il riassorbimento distale del calcio viene controllato prevalentemente tramite il sistema del fosfatidilinositolo. I pazienti nei quali il difetto è a livello dell'adenilciclasi (tipi Ia e Ic) sono accomunati da un aspetto fenotipico caratteristico, che va sotto il nome di *osteodistrofia di Albright*, e da *resistenza ad altri ormoni* che sfruttano lo stesso sistema recettoriale: è comune il rilievo di un ipotiroidismo ed un ipogonadismo (tab. IV). In alcuni pazienti sono presenti le classiche anomalie bioumorali dello pseudoipo-PTH, ma *mancano le lesioni osteodistrofiche*, e la *resistenza recettoriale è limitata al solo PTH (tipo Ib)*: ciò è possibile se l'azione dell'ormone è ostacolata in una tappa a monte del sistema adenilciclasico, ad es. a livello del recettore di membrana.

Nel tipo II le anomalie bioumorali si riducono alla sola *assenza dell'effetto fosfaturico*, mentre l'incremento del cAMP in risposta al PTH avviene come di norma, il che implica un difetto genetico a valle dell'adenilciclasi.

Le anomalie renali dello pseudoipo-PTH sono le più

TAB. IV. ASPETTI SALIENTI DELLE VARIE FORME DI PSEUDOIPOPARATIROIDISMO

	AHO	Risposta al PTH		Resistenza ad altri ormoni	$\downarrow$ Gsa	Difetto molecolare	Ereditarietà
		$\uparrow$ uPO_4	$\uparrow$ N-cAMP				
Tipo Ia	Si	No	No	Si	Si	mutazione gene Gsa	AD
Tipo Ic	Si	No	No	Si	No	Adenilciclasi?	AD
Tipo Ib	No	No	No	No	No	recettore PTH?	AD
Tipo II	No	No	Si	No	No	target del cAMP?	sporadico
pseudo-PTH	Si	Si	Si	No	Si	mutazione gene Gsa	AD

AHO = Osteodistrofia di Albright

PTH = Paratormone

N-cAMP = Nucleotide adenilico ciclico ridosso

pseudo-PTH = pseudo e pseudo ipso PTH

note ma hanno un ruolo di secondo ordine nel determinismo dell'i., da riferire principalmente ad una riduzione della mobilizzazione del minerale dall'osso e dell'assorbimento intestinale di calcio, quest'ultimo seriamente compromesso dal momento che l'attività 1- α -idrossilasica risulta deficitaria non solo per il mancato effetto del PTH ma anche per l'azione soppressiva dell'iperfosforemia.

Albright ha descritto le alterazioni fenotipiche che conferiscono ai pazienti affetti dall'la e lc un aspetto caratteristico (*osteodistrofia di Albright*). La bassa statura si associa a faccia rotonda, obesità, lieve ritardo mentale, brachidattilia ed altre alterazioni scheletriche, ossificazioni sottocutanee ed ipoplasia dentale. Vi è una marcata variabilità nell'espressione clinica di queste anomalie anche tra soggetti appartenenti alla stessa famiglia. È classico l'accorciamento del IV metacarpo, che causa un affossamento a livello dell'articolazione metacarpo-falangea quando la mano viene chiusa a pugno. Spesso altri metacarpi sono interessati e talora anche le falangi; vi è ispessimento della teca cranica, il radio può essere incurvato e l'allineamento delle ossa a livello delle articolazioni del gomito, delle anche e delle ginocchia spesso è anormale.

Le alterazioni fenotipiche possono essere evidenti in assenza di qualsiasi anomalia biochimica: questo quadro va sotto il nome di *pseudo-pseudoipo-PTH* (tab. IV).

V. anche PSEUDOIPOPARATIROIDISMO E PSEUDO-PSEUDOIPOPARATIROIDISMO; IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO [v.; v.*; v.**].

Ipocalcemia da disordini della vit. D.

L'assorbimento del calcio può essere compromesso per un deficit di vit. D, di un disordine acquisito o congenito del suo metabolismo ed infine per resistenza all'azione dell'ormone (Filipponi e Cristallini, 1993) (v. sopra, tab. I). In queste condizioni è *inusuale la comparsa di i.*: esse esitano abitualmente nello sviluppo di un rachitismo o di una osteomalacia. Nelle fasi iniziali i livelli di calcio risultano normali; l'unica anomalia biochimica è il riscontro di una ipofosforemia indotta dall'iper-PTH secondario. Solo nelle forme molto severe, decisamente rare, è possibile lo sviluppo di una i.

Il deficit di vit. D non è eccezionale in Italia, ove non vi è ancora la pratica, diffusa in altri paesi, di arricchirne gli alimenti: nei vecchi l'alimentazione può essere carente e l'esposizione ai raggi solari insufficiente, e ciò può favorire lo sviluppo di una osteomalacia. La sprue, le malattie infiammatorie croniche intestinali e la pancreatite cronica compromettono seriamente l'assorbimento della vit. D e possono causare i.

Nella cirrosi biliare primitiva o nell'ittero colostatico ci possono essere problemi di attivazione epatica (25-OHasi); il trattamento cronico con farmaci anticomiziali, soprattutto la fenilidantoina, favorisce il catabolismo epatico della 25(OH)-D. Il rachitismo vit. D dipendente (tipo I) è affezione rara, causata da un deficit congenito (AR) della 1- α -OHasi renale, e ridotta conversione della 25(OH)-D in calcitriolo. Anche le *malattie renali* compromettono precocemente la sintesi di calcitriolo: l'enzima è deficitario sia per la riduzione del parenchima renale sia a causa dell'azione soppressiva dell'iperfosforemia. Il deficit di calcitriolo da un lato, l'i. dall'altro, inducono una sovra-espressione del gene del PTH e quindi un iperparatiroidismo secondario. La proliferazione delle cellule paratiroidi può spingersi sino al punto che una o più ghiandole assumono autonomia funzionale. Questi individui possono essere curati mediante somministrazione di dosi appropriate di calcitriolo, al contrario di coloro, decisamente rari, che hanno un *rachitismo vit. D resistente (tipo II)*, in cui i livelli di calcitriolo

sono enormemente alti. In costoro vi è insensibilità tissutale all'ormone, a causa di un difetto genetico del recettore.

V. anche VITAMINE [v.; v.*; *Il sistema endocrino della vitamina D*, coll. * 7579-7593]; OSTEOMALACIA; RACHITISMO.

Ipocalcemia acuta

Al contrario delle affezioni fin qui elencate, nelle quali l'i. si configura come un disordine cronico, lasciando al medico tempo sufficiente per pensare ed adottare le misure terapeutiche più idonee, talora l'i. può insorgere in forma acuta (Desai *et al.*, 1988). È necessario che si abbia sempre presente l'i. come temibile complicanza di alcune condizioni, affinché non si perdano minuti preziosi nella perplessità evocata dall'inusuale decorso del quadro clinico lasciando il tempo per lo sviluppo di una grave crisi tetanica e talora la perdita del paziente.

Nella *pancreatite acuta* il calcio viene sottratto al circolo per formare saponi con gli acidi grassi liberi, prodottisi dall'azione della lipasi rilasciata nell'omento e nel retroperitoneo dal tessuto pancreatico danneggiato. Nei pazienti nei quali l'affezione è legata ad un alcolismo è frequente una ipomagnesiemia: da ciò la necessità di trattare l'i. con infusione parenterale di calcio e magnesio.

Una *iperfosforemia* deve svilupparsi in tempi brevi ed essere di severa entità perché dia origine ad una i., una complicanza frequente e temibile soprattutto in chi ospita un'insufficienza renale. La somministrazione di fosfati, per via orale, per via parenterale o rettale; la lisi rapida e massiva delle cellule tumorali in corso di chemioterapia, come spesso accade nella leucemia linfoblastica dell'infanzia; l'insufficienza renale acuta in corso di rhabdmiolisi indotta da alcol, traumi o da farmaci e l'insufficienza renale cronica sono le cause più frequenti. La precipitazione di fosfato di calcio nei tessuti molli è il momento patogenetico preminente dell'i. da iperfosforemia. L'eccesso di fosfati deprime, inoltre, la sintesi di calcitriolo, per cui la somministrazione di 1,25(OH)₂-D deve affiancare l'uso di chelanti del fosforo come presidio terapeutico complementare.

Le *metastasi osteoblastiche*, frequenti nel cancro della prostata e della mammella, possono indurre i. per l'eccessivo uptake del calcio a livello dello scheletro. Un meccanismo simile è alla base dell'i. in corso di «sindrome dell'osso affamato» (*hungry bone syndrome*), che può far seguito alla correzione di un iper-PTH primitivo o di un iper-T₄, a motivo della rapida resintesi del tessuto osseo distrutto nella fase attiva della malattia. Simile il meccanismo dell'i. durante l'uso di inibitori dell'attività osteoclastica, come la calcitonina, i bisfosfonati (v. DIFOSFONATI [v.*; v.**]) o la mitramicina, in patologie dello scheletro associate ad elevato turnover (morbo di Paget, metastasi ossee).

Tra i *farmaci* è opportuno ricordare la possibilità di i. in corso di trasfusione di sangue citrato o indotta da mezzi di contrasto che contengono EDTA e/o citrato; al pari di quelle indotte dalla pentamidina (v.) impiegata per il trattamento delle polmoniti da *Pneumocystis carinii* e dal foscarnet per quelle da *Cytomegalovirus* in pazienti affetti da AIDS.

Lo *shock cardiogeno* e lo *shock tossico* in corso di sepsi da gramnegativi possono complicarsi con i., soprattutto se concomita un'acidosi, e lo stesso può accadere nel *morbillo*: la patogenesi è sconosciuta.

Quadro clinico e iter diagnostico

I sintomi della *ipereccitabilità neuromuscolare* sono l'espressione clinica tipica dell'i.; la loro insorgenza è funzione dei livelli sierici di calcio ionizzato e quindi può essere influenzata dalla concomitanza di un'alcalosi (ad es., da iperventilazione), che favorisce il legame del calcio all'albumina,

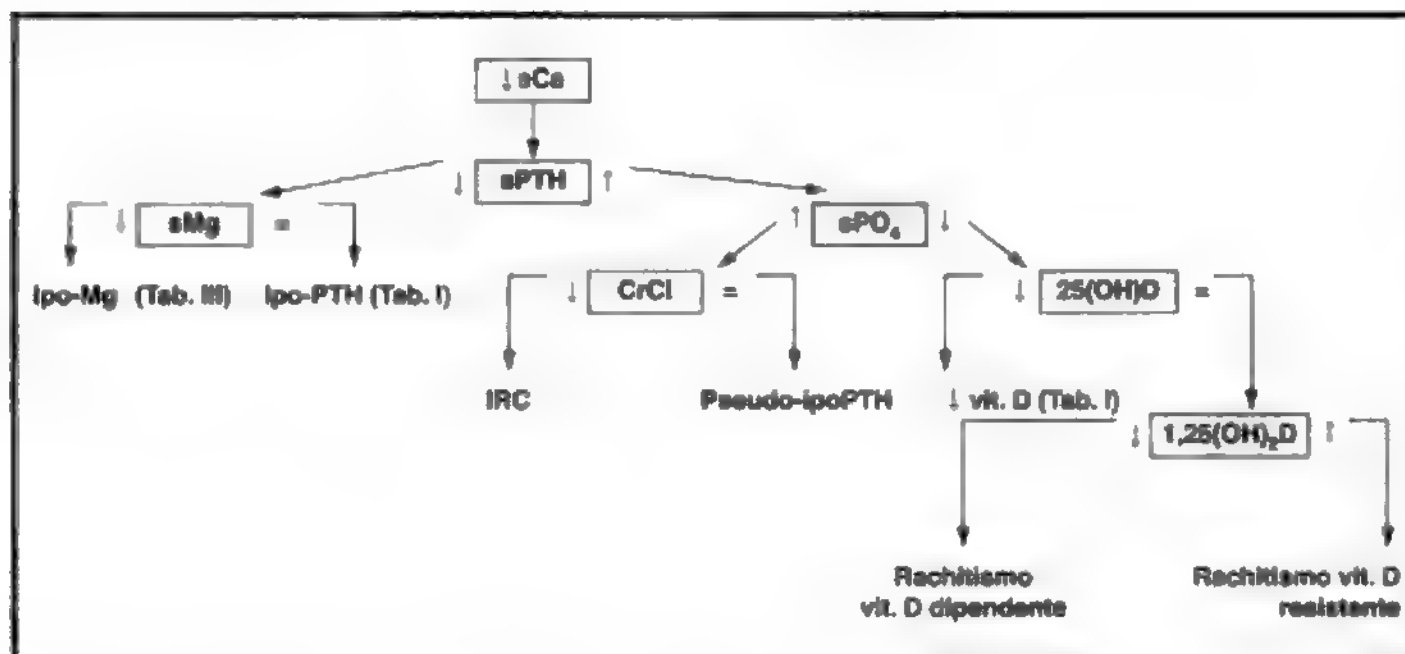


Fig. 4. In presenza di i. ($\downarrow$ sCa) il primo passo consiste nell'escludere la presenza di un ipoparatiroidismo ($\downarrow$ sPTH): in questo ambito va sempre accuratamente ricercato un deficit di magnesio ($\downarrow$ sMg) che richiede misure terapeutiche specifiche. Se il paratormone è elevato (sPTH ↑), la causa dell'i. è da riferire ad un deficit dell'assorbimento intestinale di calcio ($\downarrow$ 25(OH)D) o a resistenza all'azione del paratormone (pseudo-ipoPTH): nel primo caso la fosforemia (sPO₄) sarà ridotta, nel secondo caso elevata, al pari dell'insufficienza renale cronica (IRC). CrCl) clearance della creatinina.

riducendo la quota biologicamente attiva. Ma è certamente importante anche la rapidità con la quale si instaura l'i. e l'eventuale concomitanza di altri disordini elettrolitici, in particolare un'ipomagnesiemia ed un'ipopotassiemia. Come si è detto all'inizio, una calcemia inferiore a 7 mg/dl, a cui corrisponde un calcio ionizzato di 3,5 mg/dl, è solitamente sintomatica, purché i livelli plasmatici di albumina siano normali.

All'inizio possono esservi solo *parestesie* attorno alla bocca ed ai polpastrelli delle dita, mialgie e malessere generale; sono frequenti i *crampi muscolari*, soprattutto a carico della regione lombare, delle gambe e dei piedi. Nelle forme croniche e quando il calcio non è molto ridotto la *tetania* (v.) rimane spesso allo stato latente: essa è svelabile con il segno di Chvostek ed il test di Trousseau. La percussione del facciale all'emergenza dal cranio, subito al davanti del meato uditivo esterno, provoca in alcuni lo stiramento dell'angolo della bocca verso il lato della percussione; ma solo il movimento del solco naso-labiale e dell'angolo esterno dell'occhio sono da considerarsi sicuramente indicativi di ipereccitabilità neuromuscolare (segno di Chvostek). Il test di Trousseau si esegue insufflando un bracciale da sfigmomanometro affinché eserciti una pressione superiore di 20 mmHg a quella sistolica. La comparsa, entro 3-5 minuti, di flessione delle metacarpofalangee, con estensione delle interfalangee ed adduzione del pollice (mano da ostetrico) è considerata positiva per tetania latente. Se il calcio scende al di sotto di 6,5 mg/dl, soprattutto se ciò accade in tempi brevi, si verifica la progressione verso una tetania spontanea: lo spasmo carpo-podalico è seguito dalla contrattura tetanica dei muscoli prossimali degli arti superiori (addotti al tronco e con i gomiti in flessione) ed inferiori, in completa estensione. Il paziente appare ansioso ed irritabile ed episodi convulsivi di ogni tipo possono verificarsi nel corso dell'attacco; è comune il rilievo di ipotensione, di alterazioni ECG (allungamento dei tratti ST e QT) e di disturbi del ritmo cardiaco, per lo più extrasistoli ventricolari. Spesso sono coinvolti anche i muscoli lisci, con disfagia (esofago), dolore addominale (intestino tenue), coliche biliari (sfintere di Oddi) ed asma bronchiale (bronchi). Se il quadro progredisce segue perdita della coscienza ed il paziente può entrare in coma. La mortalità è elevatissima quando il calcio ionizzato scende al di sotto di 2 mg/dl.

Nell'ipoparatiroidismo idiopatico può essere presente una *calcipexia* delle unghie: queste possono essere fissurate longitudinalmente; la cute è secca e desquamante ed i capelli aridi. La cataratta compare in tutte le forme di i. cronica nel giro di 5 o più anni. È comune una calcificazione dei legamenti paravertebrali e vi può essere una andatura

antalgica o una zoppia come conseguenza di pseudofratture osteomalaciche o di una miopatia da ipovitaminosi D. Le calcificazioni dei gangli della base e della corteccia cerebrale e cerebellare possono causare una sindrome extrapiramidale e papilledema. Sono comuni modificazioni del carattere, labilità emotiva e stato confusionale; la cefalea è la regola.

Come sempre è necessaria un'anamnesi accurata, in particolare riferita ad un pregresso intervento sul collo, all'impiego di farmaci sospetti e alla ricerca di sintomi indicativi di un malassorbimento. Una storia familiare di patologia autoimmune, di convulsioni e di bassa statura può orientare verso un ipo-PTH o uno pseudoipo-PTH.

Il livello di PTH è basso o normale in corso di ipo-PTH (fig. 4). Se ne è causa un deficit di Mg l'iter terapeutico dovrà essere mirato alla correzione di tale disordine. Il Mg ha una localizzazione prevalentemente endocellulare, sicché la magnesemia non sempre svela una riduzione modesta o moderata del *pool* del Mg. La determinazione del Mg endocellulare (eritrociti, muscolo striato) non è sempre disponibile, per cui è prudente pensare sempre ad una ipomagnesiemia ogni qual volta siano operanti possibili cause di tale disordine. Un livello di Mg sierico inferiore a 1,5 mg/dl indica una seria deplezione del *pool*; se l'escrezione urinaria è superiore ad 1 mEq/die è in causa una perdita renale. Quando il Mg è normale (1,8-3 mg/dl) ed il PTH è basso si è in presenza di un ipo-PTH.

Al contrario il PTH aumenta quando è sollecitato a compensare un calo della calcemia da cause non paratiroidiche, ad es. nell'ipovitaminosi D; ma ciò accade anche se vi è resistenza all'ormone. In quest'ultimo caso la fosforemia è elevata al pari di quanto si verifica nell'insufficienza renale. Nel sospetto di uno pseudoipo-PTH la responsività all'ormone può essere saggiata mediante il *test di Ellsworth-Howard* (v. IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO**): 200 UI di hPTH (1-34) dissolto in 10 ml di soluzione fisiologica vengono infuse e. v. nell'arco di 10 min. L'escrezione urinaria di cAMP nei 30 min successivi aumenta di 10 volte o più e la soglia tubulare per i fosfati (misurata nei 60 min conseguenti l'infusione) diminuisce di almeno 3 volte. Tutte le forme di pseudoipo-PTH sono caratterizzate dal mancato decremento della TmPO₄; un incremento del cAMP nefrogeno minore di 6 volte rispetto al valore basale è tipico della forma I (a, b, c), ma non della forma II. La fosforemia è ridotta in tutte le forme di ipovitaminosi D, con l'eccezione dell'insufficienza renale cronica. Il dosaggio della 25(OH) D ed in casi selezionati del calcitriolo, consentirà di identificare lo specifico difetto.

Terapia

Se la calcemia è al di sotto dei 7 mg/dl è necessaria la somministrazione parenterale di calcio: questa è obbligatoria anche per livelli superiori a 7 in un paziente con crisi tetanica in corso. In quest'ultimo caso, tuttavia, va tenuta presente la concomitanza di un altro disordine, in particolare una ipomagnesiemia, una ipopotassiemia o un'alcalosi. Due fiale di gluconato di calcio al 10%, pari a 90 mg di Ca elemento ogni 10 ml, diluito in 100 ml di soluzione glicosata al 5% va infuso e. v. nell'arco di 15-30 min. Se necessario questa procedura va ripetuta sino alla regressione della crisi tetanica: se ciò non avviene dopo la seconda infusione è probabile una ipomagnesiemia o una ipopotassiemia o entrambe. In particolare quando si sospetti un deficit di Mg va infuso contemporaneamente, preferibilmente sfruttando un secondo accesso venoso, del solfato di magnesio al 50%, 1 o 2 fiale, pari a 8-16 mEq di Mg elemento, in 100 ml di glicosata al 5% in 15-30 min. A questo punto saranno disponibili i risultati del laboratorio con l'assetto elettrolitico del paziente. Se viene esclusa una carenza di Mg, è opportuno continuare con il calcio gluconato, 45 mg/h, fino alla somministrazione globale di circa 10-15 mg/kg. Nel caso il laboratorio indichi valori di Mg inferiori a 1,5 mEq/l è opportuna l'infusione simultanea di solfato di Mg: 2-3 g nell'arco di 3-5 giorni sono in genere sufficienti a correggere il deficit di questo ione. Nel caso sia presente una iperfosforemia è necessaria l'emodialisi.

Quando l'i. si configura come disordine cronico e non appena le condizioni del paziente lo consentono va associata una terapia orale; la stessa da adottare fin dall'inizio nei casi con calcemia superiore a 7 mg/dl ed asintomatici. Almeno nelle fasi iniziali, al fine di ricostituire il *pool* del calcio, è opportuna una supplementazione orale con 1-2 g al giorno, frazionati durante i pasti. Più oltre non è necessaria la somministrazione di supplementi di calcio, se l'alimentazione ne apporta un quantitativo adeguato (1-2 g/die) e in assenza di un malassorbimento o di una perdita renale. Il preparato di vit. D da impiegare sarà in funzione della causa dell'i. (Filipponi e Cristallini, 1993); tuttavia nei primi giorni si può utilizzare il calcitriolo per ottenere un effetto più rapido. La posologia da impiegare è variabile, abitualmente compresa tra 0,5 e 2 µg al giorno: potrà essere sostituito dal calciferolo o dalla 25(OH)D nei pazienti nei quali non vi è compromissione dell'attività 1-α-idrossilasica.

L'obiettivo del trattamento è quello di mantenere una calcemia compresa tra 7,5 e 9,0 mg/dl: nell'ipo-PTH, ove vien meno l'effetto renale del PTH è preferibile contenere la calcemia ai livelli più bassi di questo *range* al fine di ridurre la calciuria e scongiurare il pericolo di una nefrolitiasi. L'uso di piccole dosi di tiazidici (idrocortiazide, 25 mg/die) contrasta la perdita urinaria, ma può provocare problemi aggiuntivi, come ipotensione, iperuricemia o ipopotassiemia.

Bibliografia

- Bassett J. H. D., Thakker R. V., *Molecular genetics of disorders of calcium homeostasis*, in Thakker R. V. ed., *Clinical Endocrinology and Metabolism*, IX, 1995, Baillière Tindall, London, 581-608.
 Desai T. K., Carlson R. W., Giehl M. A., *Am. J. Med.*, 1988, **84**, 209-214.
 Filipponi P., Cristallini S., *Vitamine, Il sistema endocrino della vitamina D*, in *Enciclopedia Medica Italiana*, Agg. I, coll. 7579-7593, 1993, USES, Firenze.
 Levine M. A., Ahn T. G., Klupt S. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, **85**, 617-621.
 Rude R. K., *Parathyroid function in magnesium deficiency*, in Bilezikian J. P., Marcus R., Levine M. A. eds., *The parathyroids*, 1994, Raven Press Ltd., New York, 829-842.

PAOLO FILIPPONI E SONIA CRISTALLINI

IPOCOLESTEROLEMICI FARMACI [v. voll. VIII, coll. 318-324; Agg. I, coll. 4053-4063]

SOMMARIO

Farmaci inibitori della HMG-CoA riduttasi (col. 2938); *Origine e meccanismo d'azione*. - *Farmacocinetica*. - *Commento*. - **Farmaci ipocolesterolemici e mortalità** (col. 2941).

Farmaci inibitori della HMG-CoA reduttasi

Questi farmaci, globalmente indicati come *statine*, hanno assunto recentemente un ruolo predominante nel trattamento delle ipercolesterolemie determinate dall'aumento del colesterolo trasportato dalle LDL (*low density lipoproteins*). Il loro impiego in monoterapia permette una riduzione sostanziale del colesterolo LDL (20-40%), effetto di entità non raggiungibile con altri farmaci ipocolesterolemici; le statine sono ben tollerate e parimenti efficaci, con qualche differenza di potenza e di farmacocinetica.

Origine e meccanismo d'azione

Una componente della molecola delle statine corrisponde strutturalmente a un metabolita fisiologico, l'acido idrossimetilglutaril coenzima A (HMG-CoA). L'HMG-CoA viene ridotto ad acido mevalonico ad opera della HMG-CoA riduttasi, enzima sul quale si esercita il primo autocontrollo negativo (*feed-back*) del colesterolo sulla propria velocità di sintesi. L'analogia strutturale di parte della molecola delle statine con l'HMG-CoA (fig. 1) permette loro di competere con il metabolita per l'enzima, verso il quale hanno un'affinità (nanomolare) di alcun ordini di grandezza superiore al substrato fisiologico (micromolare) che viene così facilmente spiazzato con conseguente drastica inibizione

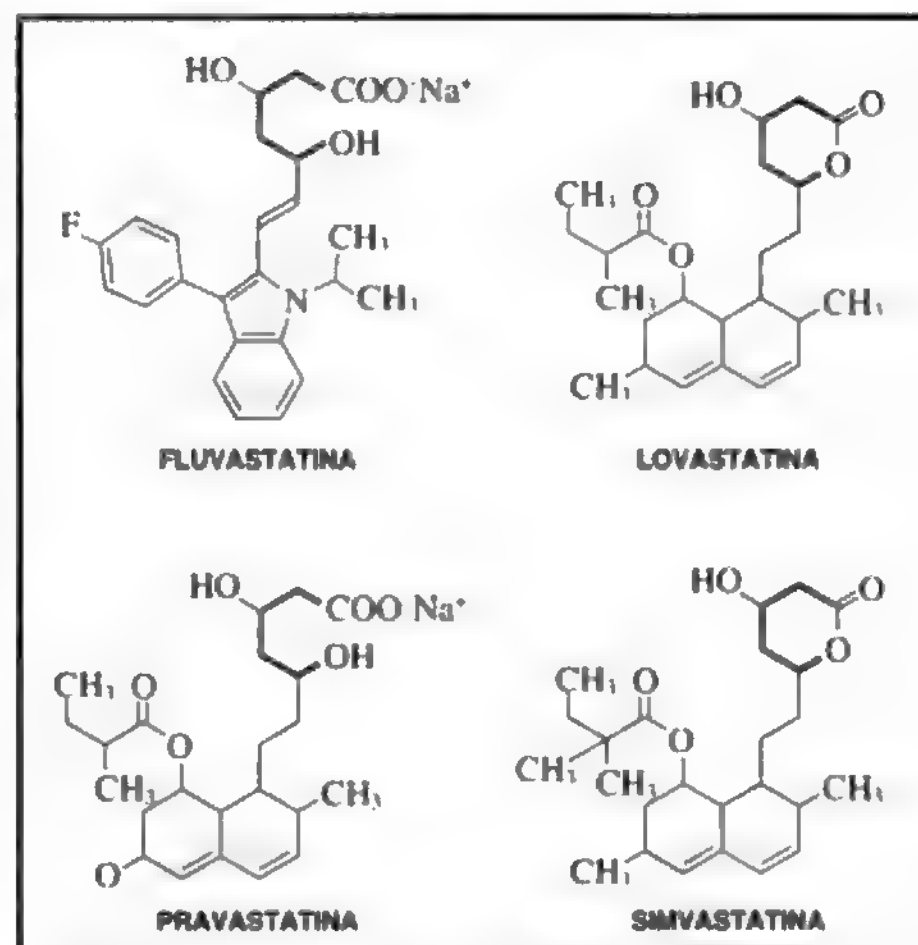


Fig. 1. Formula di struttura di alcuni inibitori della HMG-CoA riduttasi, in grassetto la parte della molecola che ricorda il substrato dell'enzima. Riportiamo i nomi registrati[®] degli inibitori della HMG-CoA riduttasi.

Fluvastatina (Lescol, Primesin, Lipaxan).
 Pravastatina (Aplactin, Prasterol, Pravaselect, Sanaprav, Selectin).
 Simvastatina (Liponorm, Medipo, Sinvacor, Sivastin, Zocor).
 La lovastatina non è ancora registrata in Italia.

IPOCOLESTEROLEMICI FARMACI

della biosintesi di colesterolo. Lo sviluppo di questi farmaci inizia dalle osservazioni sperimentali di autori giapponesi a metà degli anni '70 su metaboliti fungini prodotti dal *Penicillium citrinum*, uno dei quali (la compactina, poi chiamata mevastatina) rappresenta il prototipo di questa categoria di farmaci. Alla scoperta originale ha fatto seguito una serie di ricerche finalizzate all'identificazione e alla sintesi di nuove molecole.

Quattro statine sono attualmente disponibili in clinica: lovastatina (non registrata in Italia), isolata da *Aspergillus terreus* che corrisponde alla mevastatina metilata in posizione 6; pravastatina (Aplactin®), isolata dalle urine di cane come metabolita idrossilato della mevastatina, ora ottenuta per idrossilazione microbica; simvastatina (Sinvacor®), ottenuta per semisintesi a partire dalla lovastatina; fluvastatina (Primesin®), di completa sintesi chimica. Lovastatina e simvastatina sono profarmaci il cui anello lattonico è idrolizzato enzimaticamente *in vivo* nel fegato a dare i corrispondenti composti attivi, mentre pravastatina e fluvastatina sono già in forma attiva.

Le indagini cliniche hanno dimostrato l'efficacia di questi farmaci nel ridurre sia il colesterolo plasmatico totale sia quello LDL, efficacia decisamente superiore a quella degli altri farmaci ipocolesterolemici. L'impiego delle statine (sia in monoterapia sia in associazione con altri farmaci ipolipidemici) induce regressione di lesioni preesistenti, loro diminuita progressione o ridotta comparsa di nuove lesioni aterosclerotiche, e diminuisce l'incidenza di patologie cardiovascolari con aumento della sopravvivenza dei pazienti coronaropatici. L'azione ipocolesterolemica è conseguente al blocco competitivo della HMG-CoA riduttasi, e questo non sorprende se si pensa che circa 2/3 del colesterolo totale dell'organismo è di origine endogena e che tutti i tessuti sono capaci di biosintetizzarlo, in particolare il fegato che rappresenta la sede principale di tale biosintesi nell'organismo adulto. Tuttavia la diminuzione del colesterolo circolante è una conseguenza indiretta dell'inibizione enzimatica propria delle statine. In effetti il fabbisogno di colesterolo dell'epatocita viene soddisfatto in parte dall'apporto esogeno tramite i recettori dei chilomicroni *remnants* (residui dei chilomicroni dopo deplezione del loro contenuto in trigliceridi), ma soprattutto dalla biosintesi e dalla captazione del colesterolo trasportato dalle LDL (*low density lipoproteins*) e dalle IDL (*intermediate density lipoproteins*). Questa captazione avviene tramite i recettori delle LDL (recettori apo B/E) che mediano l'internalizzazione di queste particelle lipoproteiche, la loro degradazione metabolica e la conseguente liberazione di colesterolo che diventa così disponibile per l'omeostasi cellulare. Il colesterolo infatti modula l'espressione e dell'HMG-CoA riduttasi e del recettore apo B/E: quando l'enzima è inibito dalle statine, l'epatocita sopprime al diminuito apporto endo-

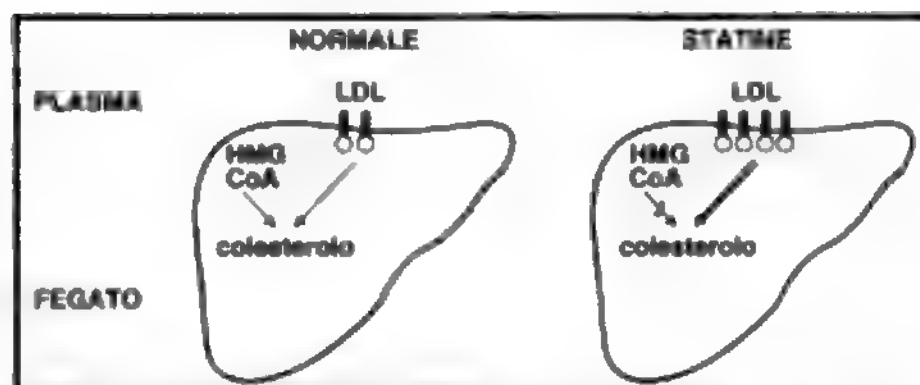


Fig. 2. Meccanismo dell'azione ipocolesterolemica delle statine. L'inibizione della HMG-CoA riduttasi fa aumentare la domanda cellulare di colesterolo che viene soddisfatta da un incremento dell'espressione dei recettori per le LDL. Tale azione è predominante nel fegato perché le statine vi si concentrano, e perché l'epatocita è la sede principale e dell'espressione dei recettori per le LDL e della sintesi di colesterolo.

geno incrementando l'espressione del recettore per le lipoproteine (come testimoniato dall'aumento dello RNA messaggero specifico) e quindi potenziando il rifornimento cellulare di colesterolo a spese di quello circolante (fig. 2). Ne è prova la mancata efficacia delle statine nella ipercolesterolemia familiare omozigote, caratterizzata dall'assenza pressoché totale di recettori apo B/E e il drammatico crollo della ipercolesterolemia determinato dal trapianto di fegato in questi pazienti.

Un possibile contributo all'azione ipocolesterolemica delle statine è rappresentato da una ridotta sintesi di apoproteina B, almeno nei pazienti i cui elevati livelli di colesterolo plasmatico conseguono ad una aumentata produzione epatica di VLDL (*very low density lipoproteins*). L'apoproteina B è infatti una componente proteica delle VLDL, che in circolo vengono in gran parte trasformate in LDL ad opera della lipasi lipoproteica.

Farmacocinetica

La tab. I riassume i principali comportamenti cinetici delle statine attualmente impiegate. In sintesi: a) l'elevata estrazione epatica presistemica riduce nettamente la biodisponibilità nei confronti del rispettivo assorbimento, massimo per la fluvastatina; l'estrazione epatica concentra questi farmaci in biofase, cioè nella loro prevalente sede d'azione; l'estrazione epatica della lovastatina è potenziata significativamente dall'assunzione di cibo; b) con l'eccezione della pravastatina, il legame alle proteine plasmatiche è elevato con conseguente contenuta distribuzione, come indicato dal volume di distribuzione, quando disponibile; c) nel fegato lovastatina e simvastatina vengono attivate per idrolisi dell'anello lattonico ad acido, ed inoltre la loro biotrasformazione genera numerosi metaboliti attivi; i metaboliti della

TAB. I. COMPORTAMENTO CINETICO DELLE STATINE DI IMPIEGO CLINICO

	Assorbimento %	Estrazione epatica % dose assorbita	Legame a P _{pl} %	Vd l/kg	t _{1/2} ore
FLUVASTATINA	> 90	~ 70	> 99	0,4	~ 1
LOVASTATINA	~ 30	~ 70	> 95		1,5-3
PRAVASTATINA	~ 30	40-60	~ 50	0,5	1-3
SIMVASTATINA	40-80	~ 80	≥ 95		1-2

P_{pl} = proteine plasmatiche

Vd = volume apparente di distribuzione

t_{1/2} = emivita biologica, tempo di dimezzamento plasmatico

fluvastatina sono inattivi, quelli della pravastatina sono responsabili di circa 1/4 dell'inibizione della HMG-CoA riduttasi plasmatica dei trattati con il farmaco; d) la via principale di emunzione è quella biliare, e solamente la pravastatina viene in buona parte eliminata immodificata con le urine; l'emivita di eliminazione è generalmente breve.

Commento

Non esistono sostanziali differenze cliniche tra le varie statine. Questi farmaci sono parimenti efficaci come ipocolesterolemici, ma con differenza di potenza, cioè di entità di dose per raggiungere lo stesso effetto sul colesterolo circolante, e in tal senso la simvastatina è forse il farmaco più potente. Le dosi globali comunemente impiegate variano in genere tra 10 e 40 mg/die, in una o due somministrazioni giornaliere. Le statine sono ben tollerate: gli effetti collaterali hanno una bassa frequenza, sono modesti e transeunti, e includono disturbi gastrointestinali, disturbi del sonno, aumento delle transaminasi sieriche e della creatinina. Una miopatia conclamata è rara, ma il rischio aumenta quando la statina è cosomministrata con altri farmaci che possono dare rhabdomiolisi, come ad esempio fibrati, ciclosporina, eritromicina.

Per completezza deve essere segnalato l'interesse attuale per la potenzialità antiaterogena diretta di parete delle statine, che si concretizza nella loro capacità di inibire proliferazione e migrazione di miociti vasali umani e animali e di ridurre la formazione di cellule schiumose (*foam cells*) in una serie di modelli sperimentali; tali azioni, potenzialmente complementari a quella ipocolesterolemica, sono al vaglio clinico.

Farmaci ipocolesterolemici e mortalità

Vari studi epidemiologici, in particolare il Framingham Heart Study, mostrano che i valori della colesterolemia sono inversamente correlati alla durata della vita. Tuttavia numerosi studi clinici basati sull'impiego di farmaci ipocolesterolemici o di diete e designati essenzialmente per la valutazione della mortalità per cause cardiovascolari, hanno messo in evidenza, accanto ad una riduzione di colesterolo-LDL e di colesterolemia totale ed in parallelo a una diminuita incidenza di eventi coronarici e di mortalità cardiovascolare, dati discordanti sull'incidenza di mortalità totale.

Una meta-analisi (cioè una valutazione comparata su base statisticamente corretta che rende confrontabili studi pur disomogenei) di 4 studi clinici di prevenzione primaria: *World Health Organization* (clofibrato), *Lipid Research Clinics* (colestiramina), *Helsinki Heart Study* (gemfibrozil) e *Veterans Administration* (dieta), ha dimostrato una tendenza all'aumento della mortalità totale. Nella stessa valutazione una meta-analisi di 8 studi di prevenzione secondaria, cioè condotti in pazienti con cardiopatia coronarica in anamnesi, ha tuttavia dimostrato che la riduzione del colesterolo circolante diminuiva la mortalità totale, anche se in modo non statisticamente significativo.

Queste osservazioni devono ora essere integrate con lo studio di prevenzione secondaria 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*, 1994) consistente in una indagine clinica multicentrica in doppio cieco, randomizzata e contro placebo, designata specificamente per la valutazione dell'effetto della simvastatina sulla mortalità totale. All'uopo furono arruolati 4444 soggetti di entrambi i sessi, di età compresa tra 35 e 70 anni, con storia pregressa di *angina pectoris* e di infarto del miocardio, con colesterolemia totale di 212-309 mg/dl e trigliceridemia inferiore a 222 mg/dl dopo dieta, seguiti in media per 5,4 anni. Il farmaco (alla dose iniziale di 20 mg/die, portata poi a 40 mg nel 37% dei soggetti del gruppo trattato) ha ridotto del 25% il colesterolo totale, del 35% il colesterolo LDL, del 10% i trigliceridi, e

aumentato dell'8% il colesterolo HDL; in questo profilo lipidico favorevole si è osservata una riduzione e della mortalità cardiovascolare (42%) e della mortalità globale (30%) che costituiva, ricordiamolo, l'obiettivo primario dello studio, senza differenze significative nella mortalità per cause non cardiovascolari. Una recente meta-analisi (1995) di 42 studi clinici di prevenzione primaria o secondaria con controllo dietetico e/o farmacologico della colesterolemia ha sottolineato una correlazione positiva e statisticamente significativa tra riduzione della colesterolemia e mortalità cardiovascolare e totale, con i risultati migliori ottenuti con le statine.

Più recentemente ancora (novembre 1995, Shepherd *et al.*) un ampio studio di prevenzione primaria con pravastatina (*West of Scotland Study*, 6595 maschi ipercolesterolemici con colesterolo totale medio di 272 mg/dl, 45-65 anni di età, 4,9 anni di osservazione) ha confermato la ridotta morbosità e mortalità cardiovascolare, senza differenze statisticamente significative nella mortalità per cause non cardiovascolari.

Questi due ultimi studi clinici dimostrano in modo incontrovertibile che l'incidenza di cardiopatia coronarica può essere ridotta di circa un terzo in pazienti a rischio per ipercolesterolemia con o senza precedenti coronarici, e che l'entità del beneficio è analoga per pazienti modestamente ipercolesterolemici (213-250 mg/dl) o con ipercolesterolemia più marcata (250-310). Un altro messaggio di rilievo è la rapida comparsa del beneficio entro il primo o secondo anno di trattamento rispetto ai 3-4 anni degli studi precedenti, probabilmente perché con le statine si raggiungono diminuzioni di colesterolemia inaccessibili agli altri farmaci. Questa rapida risposta è ipotizzata conseguire ad una migliorata funzionalità dell'endotelio vasale osservata durante l'effetto ipocolesterolemico dei farmaci. Un'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente è stata infatti dimostrata nelle coronarie di pazienti con arteriosclerosi e nelle arterie periferiche di pazienti diabetici o ipercolesterolemici. La diminuzione del colesterolo circolante induce il ripristino funzionale del vaso legato, almeno in parte, alla produzione di monossido d'azoto (v.^{**}) (vasodilatante, antiaggregante piastrinico, antimitotico sui miociti vasali) ad opera dell'endotelio.

Bibliografia

- Blum C. B., *Am. J. Cardiol.*, 1994, 73, 3D.
- Corsini A. *et al.*, *Pharmacol. Res.*, 1995, 31, 9.
- Endo A. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1976, 72, 323.
- Holme I., *Am. J. Cardiol.*, 1995, 76, 10C.
- Kronmal R. A. *et al.*, *Arch. Intern. Med.*, 1993, 153, 1065.
- Oliver M. F., *Lancet*, 1995, 346, 1378.
- Plosker G. L., McTavish D., *Drugs*, 1995, 50, 334.
- Raiteri M. *et al.*, *Ann. Med. Int.*, 1995, 10 (suppl.), 35S.
- Rossouw J. E., Gotto A. M. jr., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 1993, 7, 789.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, *Lancet*, 1994, 344, 1383.
- Shepherd J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 1301.
- Stroes E. S. G. *et al.*, *Lancet*, 1995, 346, 467.

REMO FUMAGALLI

IPOGLICEMIZZANTI FARMACI: V. DIABETE MELLITO* (*2134-2136); DIABETE MELLITO** (**1555); IPOGLICEMIZZANTI FARMACI (VIII, 403-411); INSULINA (VII, 2063-2080); INSULINA* (*3863-3867); INSULINA** (**2788-2793).

IPOURICEMIA

F. *hypouricémie*. - I. *hypouricemia*. - T. *Hypourikämie*. - S. *hipouricemia*.

Condizioni responsabili di ipouricemia

Si definisce *ipouricemico* un soggetto con una concentrazione di ac. urico nel siero, determinata con un metodo

colorimetrico, inferiore a $149 \mu\text{M}$ ($2,5 \text{ mg/dL}$) se maschio o a $125 \mu\text{M}$ ($2,1 \text{ mg/dL}$) se femmina. L'ipouricemia [i.] è una condizione relativamente rara, rilevabile nello 0,18% della popolazione, che spesso si trasmette come un carattere autosomico recessivo (*i. ereditaria renale*).

Altri difetti ereditari del trasporto renale dell'ac. urico che possono dar luogo ad i. fanno parte di sindromi più complesse che coinvolgono un disturbo generalizzato del trasporto di membrana, come la sindrome di Hartnup (v. HARTNUP, MALATTIA, VII, 996), la sindrome di Fanconi-De Toni-Debré (v. FANCONI-DE TONI-DEBRÉ, SINDROME DI, VI, 668) e i disordini metabolici correlati a quest'ultima sindrome (morbo di Wilson, cistinosi, galattosemia, intolleranza ereditaria al fruttosio). Un'i. di origine metabolica può essere dovuta a xantinuria ereditaria (v. XANTINURIA, XV, 2332), a deficit di purinucleoside fosforilasi (v. IMMUNODEFICIENZE*, col. *3633) od a carenza del cofattore per il molibdeno, la *molibdotterina*, con conseguente deficit combinato di xantina ossidasi, sulfito ossidasi e aldeide ossidasi (v. XANTINURIA, XV, 2332).

Un'i. acquisita di origine renale può essere presente in pazienti con un aumento dei liquidi extracellulari (ad es., per una *inappropriata secrezione dell'ormone antidiuretico* [v. VII, 1703; *3706]). Altre condizioni che possono portare ad i., inducendo la tubulopatia caratteristica della sindrome di Fanconi-De Toni-Debré, sono alcune malattie neoplastiche (quali il mieloma multiplo, il linfoma e il carcinoma polmonare) ed alcuni stati di intossicazione (avvelenamenti da metalli pesanti o da derivati delle tetracicline). Il morbo di Hodgkin può portare ad i. per difetto di riassorbimento postsecretorio dell'ac. urico. Un'i. di natura iatrogena può derivare dalla somministrazione di allopurinolo (v.) in casi di gotta primitiva o metabolica o per prevenire un'urolitiasi nel corso di un intervento terapeutico aggressivo su neoplasie.

Ipouricemia renale ereditaria

Questo è un difetto ereditario del trasporto dell'urato attraverso le membrane, che si manifesta nell'eterozigote con una modesta diminuzione dell'uricemia e un moderato ma significativo aumento della clearance renale dell'ac. urico. Nell'omozigote si osserva un'i. più marcata, un notevole aumento della clearance renale accompagnato ad iperuricosuria, ad ipercalcemia (nel 21% dei casi) ed a urolitiasi con presenza di calcoli misti di ac. urico ed ossalato di calcio (nel 25% dei casi). Sono stati descritti diversi tipi di i. renali ereditarie distinguibili sulla base della risposta della clearance frazionata dell'ac. urico alla pirazinamide ([v.; XI, 2181; *5827] un inibitore della secrezione) e al probenecid ([v.] un inibitore del riassorbimento). Il più comune è un difetto del riassorbimento presecretorio. Meno frequentemente è stato osservato un difetto totale di trasporto (coinvolgente sia il riassorbimento che la secrezione dell'ac. urico) o un difetto totale del riassorbimento. In alcuni rari casi l'alterazione ereditaria consiste in un aumento della secrezione renale di ac. urico.

V. anche: URICEMIA, XV, 1200; URICO ACIDO, XV, 1202.

Bibliografia

- Taguchi M., Sakuta N., Ueda K. et al., *J. Inherited Metab. Dis.*, 14, 1991.
 Sprafkin O., *Hereditary Renal Hypouricemia*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7 ed., McGraw-Hill, New York, 1995.

CONSULENZA MEDICA

ISAACS, SINDROME DI

Sin.: neuromiotonia.

SOMMARIO

Definizione e classificazione (col. 2944). - **Quadro clinico** (col. 2944). - **Etiologia** (col. 2945). - **Fisiopatologia** (col. 2946). - **Reperti neurofisiologici** (col. 2946). - **Diagnosi differenziale** (col. 2947). - **Anatomia patologica** (col. 2947). - **Terapia** (col. 2947).

Definizione e classificazione

La sindrome di Isaacs [s. di I.] è un raro disordine neuromuscolare caratterizzato, secondo la descrizione originale di Isaacs (Isaacs, 1961), da mioclimie generalizzate, rigidità, crampi muscolari e ipersudorazione. Questo A. denominò tale associazione sintomatologica come «sindrome di attività muscolare continua». Nelle descrizioni successive sono stati impiegati numerosi eponimi quali «pseudomiotonia» (Sigwald et al., 1966), «miocimia con difetto di rilassamento muscolare» (Gardner-Medwin e Walton, 1969), «neurotonia» (Warmolts e Mendell, 1980). Attualmente si preferisce la denominazione *neuromiotonia*, introdotta per la prima volta da Mertens e Zschocke nel 1965, al fine di enfatizzare l'origine neurogena dei disturbi e allo stesso tempo la loro affinità clinica con malattie di natura mio- genica.

La neuromiotonia può configurarsi come quadro clinico autonomo o in associazione con altre patologie (tab. I). Una prima distinzione viene effettuata a seconda che il quadro sindromico si iscriva in un contesto clinico di neuropatia. In questo caso vengono distinte forme ereditarie e forme sporadiche secondarie all'esposizione a tossine, a neuropatie di tipo infiammatorio o in corso di neoplasia più frequentemente a localizzazione timica o bronchiale. Qualora la s. di I. si manifesti in assenza di segni clinici o neurofisiologici di neuropatia vengono distinte una forma idiopatica, una forma che si presenta in corso di trattamento con sali d'oro e, infine, una forma paraneoplastica. La tab. I riassume questa classificazione (modificata da Auger, 1984).

La *corea fibrillare di Morvan*, descritta per la prima volta da Morvan nel 1890, viene considerata una variante della s. di I. con la presenza di sintomi aggiuntivi quali eritema cutaneo degli arti e sintomi psichiatrici.

Quadro clinico

Il quadro clinico è dominato dalla presenza di mioclimie, rigidità muscolare, crampi muscolari e ipersudorazione.

TAB. I. SCHEMA RIASSUNTIVO DELLA CLASSIFICAZIONE ETIOLOGICA DELLA SINDROME DI ISAACS

Non associata a neuropatia

- Ereditaria
- Sporadica
 - Idiopatica
 - Terapia con sali d'oro
 - Paraneoplastica

Associata a neuropatia

- Ereditaria
- Sporadica
 - Idiopatica
 - Esposizione a tossine
 - Neuropatie infiammatorie
 - Paraneoplastica

L'età di esordio va dai primi anni di vita, specialmente nelle forme ereditarie, alla senescenza.

Sono prevalentemente colpiti i muscoli degli arti, ma in alcuni casi viene riferito il coinvolgimento della muscolatura bulbare e della muscolatura respiratoria con secondaria compromissione delle funzioni respiratorie.

Le *miochimie*, costituite da contrazioni fascicolari involontarie, vengono avvertite dal paziente come contrazioni spontanee e continue tali da produrre una continua ondulazione della superficie cutanea soprastante ai muscoli coinvolti. Sono frequentemente generalizzate ma possono presentarsi in forma localizzata specialmente nelle fasi iniziali della malattia. Le miochimie sono visivamente molto simili alle fascicolazioni e persistono durante il sonno.

La *rigidità* muscolare costituisce un altro punto cardinale della s. di I. Clinicamente affine alla miotonia, si presenta come una difficoltà di rilassamento dopo contrazioni sostenute, è sempre prevalente a livello degli arti e distalmente, può essere indotta dall'esercizio. In maniera caratteristica la percussione non evoca miotonia a differenza di quanto osservabile nelle sindromi miotoniche. La rigidità muscolare può condizionare la comparsa di posture anomale intermittenti o permanenti quali lo spasmo carpo-pedale o deformità più evidenti con coinvolgimento di tutto l'arto.

I *crampi muscolari* compaiono frequentemente nel contesto del quadro clinico. Sono usualmente generalizzati con prevalente coinvolgimento dei muscoli distali degli arti inferiori.

L'*ipersudorazione*, quasi sempre presente, viene attribuita al continuo esercizio muscolare in grado di provocare sia un aumento diretto della traspirazione che un incremento del metabolismo basale.

In molti casi si instaura atrofia muscolare mentre in alcuni pazienti si sviluppa ipertrofia dei muscoli degli arti inferiori principalmente della muscolatura flessoria della gamba.

I riflessi osteotendinei vengono riportati molto ridotti o assenti nella maggior parte dei casi.

Astenia muscolare e facile stancabilità possono far parte del quadro clinico.

Possono essere presenti sintomi sensitivi quali parestesie e disestesie con frequente coinvolgimento dei segmenti distali degli arti.

Il quadro clinico della neuromiotonia in presenza di evidente neuropatia non si differenzia dai casi idiopatici se non per la presenza di sintomi aggiuntivi legati alle dirette conseguenze della neuropatia stessa.

Etiologia

L'etiologia di questa malattia rimane ancora dibattuta. L'effetto tossico diretto di insetticidi (Greenhouse, 1967) o dei

sali d'oro è stato sospettato ma non dimostrato. La possibile associazione con neoplasie bronchiali o timiche o con patologie a genesi autoimmune quali la *myasthenia gravis* prospetta una probabile natura autoimmune del disturbo. Tale dato viene confermato dal frequente reperto di immunocomplessi e di bande oligoclonali nel siero di pazienti affetti da neuromiotonia confermando un ruolo rilevante dell'immunità nella genesi di tale patologia (Van Engelen *et al.*, 1995). Infine l'efficacia di trattamenti quali la plasmaferesi (Sinha *et al.*, 1991) e gli steroidi (Elalaoui-Faris *et al.*, 1993) sembrano confermare questa ipotesi.

Fisiopatologia

Già dalle prime descrizioni la natura neurogena periferica del disturbo era risultata evidente (Isaacs, 1961; Mertens e Zschocke, 1965). Il blocco anestetico del nervo periferico non influenza infatti il quadro di iperattività. La scomparsa immediata dell'attività muscolare continua dopo curarizzazione del muscolo esclude definitivamente una natura miogena del disturbo, differenziando così la neuromiotonia dalla miotonia vera (V. MIOTONICHE SINDROMI**; MIOTONIA CONGENITA). Quest'ultima non viene influenzata, infatti, dal blocco neuromuscolare essendo il disturbo primitivo a carico della fibra muscolare.

Numerosi dati suggeriscono che l'attività abnorme responsabile della neuromiotonia insorga a vari livelli lungo il decorso del nervo periferico (Oda *et al.*, 1989; Isaacs, 1961).

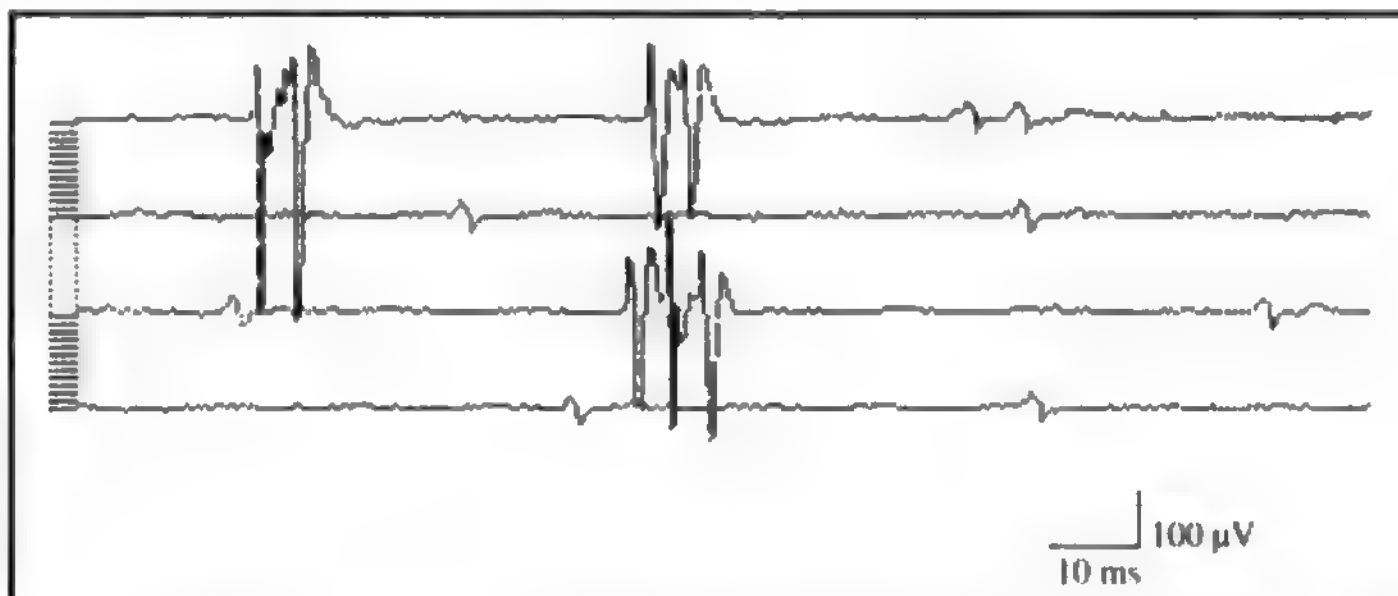
Reperti neurofisiologici

All'esame elettromiografico, con ago-elettrodo concentrico, le miochimie appaiono come attività elettrica continua e spontanea, presente anche quando il paziente è perfettamente rilassato e sono caratterizzate da scariche di unità motorie in doppiette, triplete o poliplotte (fig. 1). Spesso tali unità motorie sono di piccola ampiezza e breve durata e presentano una frequenza di scarica variabile tra 50 e 300 Hz.

Un'altra caratteristica elettromiografica della neuromiotonia è rappresentata da treni di unità motorie pseudoritmici denominati «scariche iterative» o «neurotoniche». Le unità motorie all'interno di queste sequenze scaricano con frequenza variabile. Tali treni di potenziali di unità motoria compaiono e terminano in modo brusco.

I tracciati elettromiografici da attivazione volontaria vengono riportati normali fatta eccezione per i casi di neuromiotonia in corso di neuropatia franca in cui i tracciati sono primariamente influenzati dalla neuropatia stessa. La risposta F ed il riflesso H sono seguiti da extrascariche (Auger, 1994). Il periodo silente che precede la risposta F ed il riflesso H è assente.

Fig. 1. Registrazione elettromiografica con ago-elettrodo concentrico in un caso di s. di I. (muscolo opponente del pollice). Si noti la presenza di unità motorie che scaricano in «doppiette» o «triple» (osservazione personale).



Diagnosi differenziale

La neuromiotonia comprende una vasta gamma di quadri clinicamente eterogenei e i criteri diagnostici clinici e strumentali non sono ancora ben definiti. La presenza di miocimie e di pseudomiotonia sembra rappresentare il solo criterio obbligatorio di inclusione.

Problematiche di diagnostica differenziale si pongono con disturbi correlati con l'ipocalcemia e l'iperventilazione quali la tetania. In questi casi gli attacchi presentano una breve durata, un'insorgenza e un termine bruschi.

Miocimie ristrette all'ambito della muscolatura facciale pongono dei problemi di diagnostica differenziale con la sclerosi multipla.

La miotonia vera viene distinta principalmente per gli aspetti strumentali elettromiografici dalla s. di I.

Infine le distonie focali (v. DISTONIE**) potrebbero essere prese in considerazione nella diagnostica differenziale con la neuromiotonia nel caso in cui siano presenti posture anormali quali lo spasmo carpo-pedale. Le indagini neurofisiologiche, in particolare l'elettromiografia, possono essere dirimenti in quanto nella s. di I. documentano la scarica ritmica o pseudoritmica di unità motorie che perdurano anche durante il sonno dimostrandone l'origine a livello del sistema nervoso periferico.

Anatomia patologica

Per quanto concerne le forme idiopatiche di s. di I., il quadro istologico dei muscoli studiati non presenta caratteristiche peculiari. Vengono riportati casi di aspetto normale del muscolo (Mertens e Zschocke, 1965; Nakanishi *et al.*, 1975) o più frequentemente caratterizzati da modeste e aspecifiche anomalie quali incrementata variabilità di taglia delle fibre muscolari o quadri di lieve atrofia delle fibre di tipo II (Isaacs, 1961; Coers *et al.*, 1981; Baron e Heffner, 1979; Oda *et al.*, 1989).

Lo studio biptico del nervo surale non ha mai evidenziato anomalie significative.

L'aspetto patologico di muscolo e nervo, in caso di neuromiotonia in corso di neuropatia, è direttamente legato alla patologia di base.

Terapia

I trattamenti considerati in passato più efficaci nel trattamento della neuromiotonia si basavano sull'impiego di carbamazepina e difenilidantoina (Isaacs, 1961; Mertens e Zschocke, 1965). Questi farmaci inducono una riduzione sensibile e in qualche caso una completa risoluzione della sintomatologia.

Attualmente, avvalorando l'ipotesi patogenetica autoimmune, viene preferito l'impiego di plasmateresi, immunoglobuline ad alte dosi (Ishii, 1994) o di steroidi (Elalaoui-Faris *et al.*, 1993) con buoni risultati.

Farmaci classicamente attivi a livello del sistema nervoso centrale quali il diazepam non hanno dimostrato un'attività soddisfacente nel controllo della sintomatologia.

Bibliografia

- Auger R. G., *Muscle & Nerve*, 1994, **17**, 1250.
 Baron S. A., Heffner R. R., *Arch. Neurol.*, 1979, **36**, 520.
 Coers C. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1981, **38**, 282.
 Elalaoui-Faris M. *et al.*, *Rev. Neurol.*, 1993, **149**, 426.
 Greenfield Medwin D., Walton J., *Lancet*, 1969, **1**, 127.
 Greenhouse A. H., *Neurology*, 1967, **17**, 263.
 Isaacs R., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1961, **24**, 319.
 Isaacs R., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1994, **57**, 840.
 Isaacs R., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1994, **57**, 840.
 Isaacs R., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1994, **57**, 840.
 Mertens H. G., Zschocke S., *Klin. Wochenschr.*, 1965, **43**, 917.
 Nakanishi I. *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 1975, **26**, 599.
 Oda K. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 1989, **25**, 340.
 Sigwald C. *et al.*, *Rev. Neurol.*, 1986, **115**, 1003.
 Sinha S. *et al.*, *Lancet*, 1991, **338**, 7.

Van Engelen B. G. *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1995, **58**, 393.

Warmolts J. R., Mendell J. R., *Ann. Neurol.*, 1980, **7**, 254.

LAURA BERTOLASI

ISCHEMICO PRECONDIZIONAMENTO DEL CUORE

1. ischemic preconditioning of the heart.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2948). - La riduzione del danno ischemico miocardico (necrosi) come risultato del preconditionamento (col. 2948). - Protezione da parte del preconditionamento ischemico contro le aritmie ventricolari minacciose insorgenti durante ischemia e ripercussione (col. 2951). - Protezione tramite preconditionamento nei confronti della disfunzione contrattile post-ischemica (col. 2952). - Il preconditionamento è un fenomeno generale? (col. 2952). - Il cuore umano può essere preconditionato? (col. 2953). - Possibili meccanismi coinvolti nel preconditionamento ischemico (col. 2956). - Protezione miocardica ritardata tramite preconditionamento ischemico (col. 2958). - Possibile utilizzo farmacologico del preconditionamento ischemico e suo potenziale terapeutico (col. 2959).

Introduzione

Il preconditionamento ischemico del cuore [p. i.] può essere definito come un fenomeno attraverso il quale brevi episodi di ischemia miocardica reversibile suscitano una aumentata tolleranza ad episodi più tardivi, prolungati e potenzialmente fatali. Questa aumentata tolleranza, o protezione, si manifesta principalmente in tre modi. Primo, così come descritto originariamente, una riduzione del metabolismo nel miocardio ischemico in cuori preconditionati conduce ad un inizio ritardato del danno cellulare irreversibile e ad una limitazione della zona infartuale, premesso che il prolungato periodo di ischemia si concluda con una ripercussione tempestiva. Secondo, e potenzialmente anche di maggiore importanza, si assiste ad una marcata riduzione nella gravità delle aritmie ventricolari minacciose che compaiono durante ischemia (e ripercussione) in quei cuori che siano stati preconditionati da uno o più brevi periodi di ischemia. Terzo, il p.i. suscita un migliore recupero della funzione contrattile durante la ripercussione che fa seguito ad un prolungato periodo di ischemia: in altre parole si ha un minor grado di stordimento miocardico. Queste tre manifestazioni del p.i. sono state chiaramente dimostrate nella maggior parte delle specie, incluso l'uomo. Vi è ancora un certo dibattito teso a chiarire se il preconditionamento protegga cellule diverse dai miociti cardiaci. Esiste qualche evidenza che le risposte cardiache agli stimoli del sistema nervoso autonomo siano preservate nei cuori preconditionati, mentre alcuni studi indicano anche la preservazione della funzione vascolare endoteliale coronarica in condizioni di p.i., con una migliore conservazione della risposta vasodilatatrice coronarica a vasodilatatori endotelio-dipendenti ed una minore perdita progressiva di riserva coronarica rispetto a quanto accade solitamente dopo l'interruzione di una ischemia prolungata.

La riduzione del danno ischemico miocardico (necrosi) come risultato del preconditionamento

Questa fu dimostrata per la prima volta nei fondamentali esperimenti di Murry, Jennings e Reimer nel 1986 (Murry *et al.*, 1986). Se un'arteria coronaria viene occlusa per 40 minuti in cani anestetizzati vi è ampia evidenza di danno irreversibile: i nuclei delle cellule endoteliali mostrano fenomeni di marginazione, praticamente tutti i mitocondri presenti nei miociti cardiaci contengono addensamenti di matrice amorfa ed il sarcolemma si separa dal suo punto di

impianto sulla linea zeta. In contrasto, se il prolungato periodo di occlusione è preceduto da una serie di brevi (ad es. 4 periodi di 5 minuti) occlusioni preconditionanti, il danno irreversibile non è più così uniforme come osservato nei cuori di controllo. Anche una singola occlusione preconditionante di 5 minuti, seguita 10 minuti più tardi da un'occlusione di 60 minuti e quindi da 6 ore di riperfusione, riduce marcatamente le dimensioni dell'infarto in relazione all'area a rischio ($29,8 \pm 4\%$ nei controlli senza preconditionamento ma solo $3,9 \pm 1,3\%$ in quegli animali sottoposti ad una singola occlusione preconditionante) (Li *et al.*, 1990).

L'ampiezza di tale protezione dipende sia dal numero che dalla durata delle occlusioni preconditionanti. Tale concetto è illustrato, attraverso gli studi effettuati su conigli da Tetsuji Miura, in fig. 1. La dimensione dell'infarto, come percentuale dell'area a rischio, in animali di controllo non preconditionati è intorno al 40-50% in questo modello. Questa percentuale viene significativamente ridotta da una singola occlusione preconditionante di 3 o 5 minuti, da due occlusioni di 2 minuti ed in particolar modo da 4 occlusioni di 5 minuti. In questo particolare studio la dimensione dell'infarto e l'area a rischio sono stati determinati istologicamente (per quanto riguarda la misurazione della dimensione dell'infarto) e con una tecnica a fluorescenza (per la misurazione dell'area a rischio). Periodi maggiori di ischemia, ad es. 15 minuti, non hanno effetto protettivo ma producono essi stessi necrosi focali; allo stesso modo un periodo di preconditionamento di soli 2 minuti non produce alcun effetto. La fig. 1 illustra anche la natura transitoria di questa protezione. Se il periodo di intervallo tra lo stimolo preconditionante e l'occlusione prolungata è aumentato (in questo particolare esperimento a 25 o 35 minuti) allora la protezione è perduta.

Riassumendo, la riduzione della dimensione dell'infarto tramite il p.i. è *potente* (tanto da causare il 70% di riduzione nel danno ischemico) ma *transitoria*. Inoltre non si ha alcuna protezione a meno che, alla fine del prolungato periodo di ischemia, il miocardio non sia riperfuso. Questo «decadimento» dell'effetto protettivo del p.i. appare essere di più lunga durata nei cuori di cane e di maiale che in quelli di coniglio o di ratto. Una significativa tolleranza all'infarto è stata in questo modo dimostrata anche due ore dopo il p.i. in cuori di cane, indicando una «memoria» alquanto sostanziale del p.i.

Vi sono tre aspetti particolari di questa protezione che meritano attenzione. Primo, il cuore sembra sviluppare una tolleranza a numerosi, ripetuti stimoli di p.i. Sebbene il cuore di coniglio possa essere protetto con un singolo breve periodo di ischemia, se questi cuori ricevono 40-65 occlusioni ripetute di 5 minuti per 3-4 giorni prima dell'occlusione prolungata, allora la protezione risulta attenuata. Tuttavia, questa tolleranza può essere recuperata; il miocardio può essere ri-precondizionato se viene concesso un intervallo di tempo abbastanza lungo per il recupero. Secondo, il p.i. ritarda o rallenta la morte cellulare piuttosto che prevenire la necrosi. Infatti, mentre la dimensione dell'infarto si riduce, ad esempio nel cane, se un'occlusione prolungata di 40 minuti è seguita dalla riperfusione, non è rilevabile alcuna protezione se il periodo di occlusione è prolungato fino a 3 ore. Terzo, non è necessario occludere completamente un'arteria coronaria al fine di preconditionare il miocardio. La protezione può anche essere ottenuta attraverso una parziale occlusione coronarica, un *pacing* cardiaco o uno stiramento prodotto, per esempio, da un carico volumetrico acuto ventricolare. Questo potrebbe suggerire che il periodo di ischemia, di per sé, non è fondamentale ai fini della cardioprotezione.

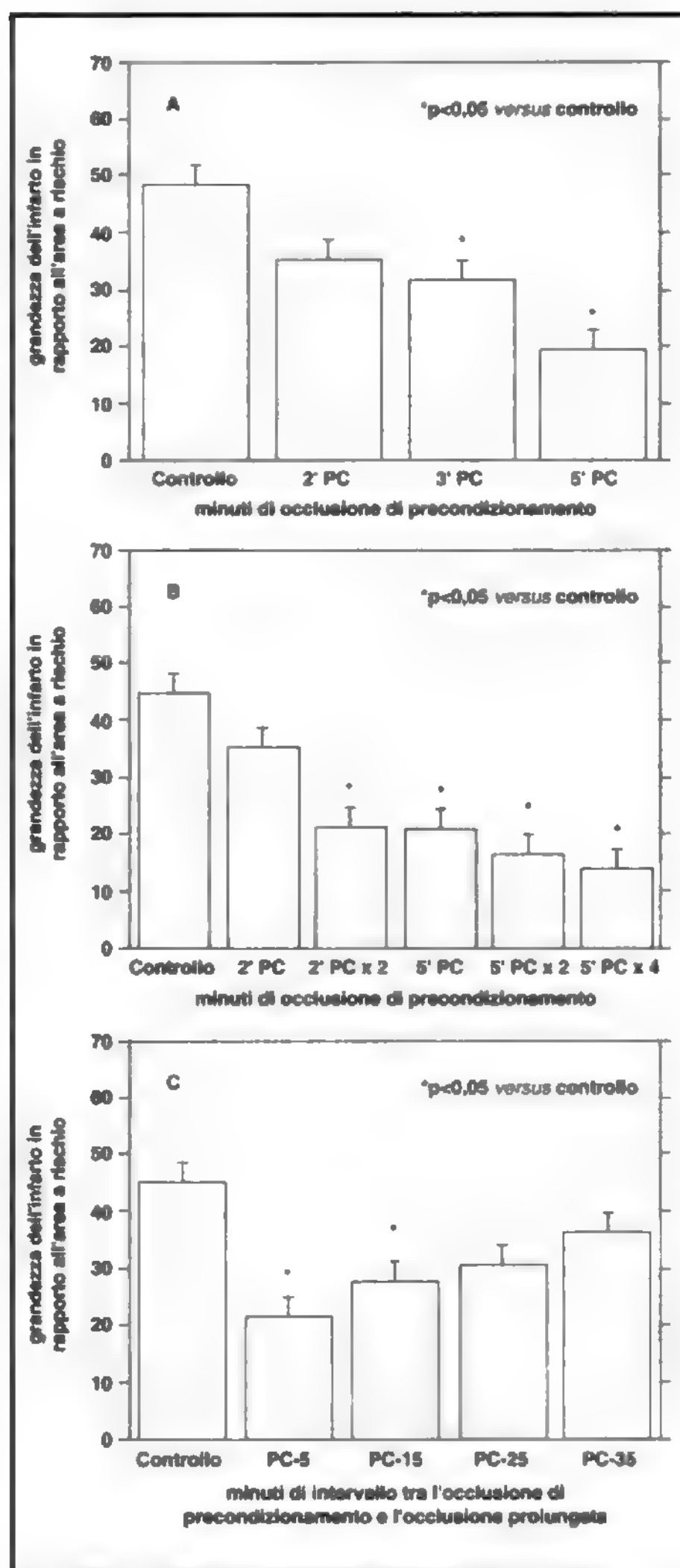


Fig. 1. Determinanti dell'effetto del preconditionamento ischemico nel limitare le dimensioni dell'infarto nei conigli. L'infarto fu ottenuto mediante un'occlusione di 30 minuti dell'arteria coronaria sinistra, seguita da riperfusione. La dimensione dell'infarto e l'area a rischio vennero determinate rispettivamente istologicamente e con particelle fluorescenti 72 ore dopo la riperfusione. Il grafico A mostra che un periodo di preconditionamento di 3 o 5 minuti (ma non di 2) ridusse la dimensione dell'infarto miocardico. Il grafico B mostra che la protezione è rafforzata da occlusioni multiple preconditionanti, mentre il grafico C illustra la natura transitoria della protezione, che è perduta se l'intervallo di tempo tra l'occlusione preconditionante e quella prolungata è aumentato a 25 o 35 minuti. (Da Miura, 1996, riprodotta con il permesso dell'Autore, ridisegnata).

Protezione da parte del preconditionamento ischemico contro le aritmie ventricolari minacciose insorgenti durante ischemia e riperfusione

La scoperta che brevi periodi di ischemia possono avere un effetto protettivo nei confronti di quelle aritmie che insorgono durante un prolungato periodo di occlusione coronarica fu per la prima volta dimostrata da Sadayoshi Komori nel Dipartimento di Strathclyde, usando un modello che produce aritmie ventricolari attraverso occlusione coronarica in topi anestetizzati a torace aperto. Komori e colleghi (Vegh *et al.*, 1992) dimostrarono che un'occlusione coronarica di 30 minuti produceva una marcata attività ectopica ventricolare, ma che questa era notevolmente soppressa se tale prolungata occlusione era stata preceduta, ad esempio 10 minuti prima, da un singolo, breve (3 o 5 minuti, mentre un minuto non era efficace) periodo di ischemia. Il p.i. riduceva in questo modello l'incidenza di fibrillazione ventricolare durante ischemia dal 40% a solo il 10%, con una marcata riduzione nell'incidenza e durata di tachicardie ventricolari e del numero di battiti ventricolari prematuri (riduzione maggiore dell'80%). La soppressione di episodi di fibrillazione ventricolare, sia durante ischemia che riperfusione, è dimostrata anche in un modello canino, come illustrato nella fig. 2. Riassumendo, questi esperimenti mostrarono quanto segue.

a) La protezione nei confronti delle aritmie operata dal p.i. è spiccata e concreta, nel senso che le aritmie non sono spostate ad un differente periodo di tempo. Questo fu dimostrato prolungando il periodo di occlusione da 30 a 60 minuti; anche durante un'occlusione così prolungata il numero di battiti prematuri ventricolari risultò assai ridotto ed ancora non si registrarono episodi di fibrillazione ventricolare durante l'intero periodo. Questo particolare aspetto della protezione nei confronti delle aritmie si localizza separatamente dalla riduzione nelle dimensioni dell'infarto sottolineata in precedenza. Lo sviluppo della necrosi miocardica è semplicemente ritardata; la protezione dalle aritmie è effettiva durante tutto il periodo di occlusione.

b) La protezione nei confronti delle aritmie è transitoria. Se l'intervallo di tempo fra lo stimolo di preconditiona-

mento e l'occlusione prolungata è aumentato (ad esempio da 20 minuti ad 1 ora nel modello canino), la maggior parte della protezione viene perduta.

c) Si è avuta qualche evidenza che la sopravvivenza dopo un insulto ischemico associato a riperfusione è aumentata dal preconditionamento. Anche questo concetto è illustrato nella fig. 2. Così come la modificazione operata dal preconditionamento sul danno ischemico miocardico, la protezione dalle aritmie può essere ottenuta anche da brevi periodi di *pacing* cardiaco (Vegh *et al.*, 1991). Questa procedura provoca probabilmente anch'essa una forma di ischemia, in particolare del subendocardio, ma di un grado assai minore rispetto ad un'occlusione coronarica. Esistono ad ogni modo altre spiegazioni per la cardioprotezione osservata in seguito a *pacing* cardiaco.

Protezione tramite preconditionamento nei confronti della disfunzione contrattile post-ischemica

Questo particolare aspetto di protezione miocardica mediante p.i. appare in qualche modo più controverso. Vi sono evidenze, in alcuni modelli sperimentali, che brevi periodi di ischemia globale migliorano il recupero della funzione ventricolare sinistra durante la riperfusione che segue un periodo protratto, più prolungato di ischemia globale (fig. 3). Questa protezione è efficace nei confronti della disfunzione postischemica sia sistolica che diastolica ed è associata ad una attenuazione dell'acidosi in cuori preconditionati, probabilmente quale risultato di un metabolismo rallentato in corso di ischemia. Alcuni hanno suggerito che il miglioramento acuto nel periodo postischemico della funzione ventricolare sinistra si manifesti in seguito alla riduzione del danno ischemico, come dimostrato da un più lento rilascio dei markers enzimatici di integrità di membrana come la creatin-chinasi e la lattato-deidrogenasi, e da variazioni meno evidenti a livello epicardico del tratto S-T.

Il preconditionamento è un fenomeno generale?

Sebbene la maggior parte dell'attenzione da parte dei ricercatori sia stata posta nei riguardi della capacità di brevi periodi di ischemia di proteggere il miocardio, sono in au-

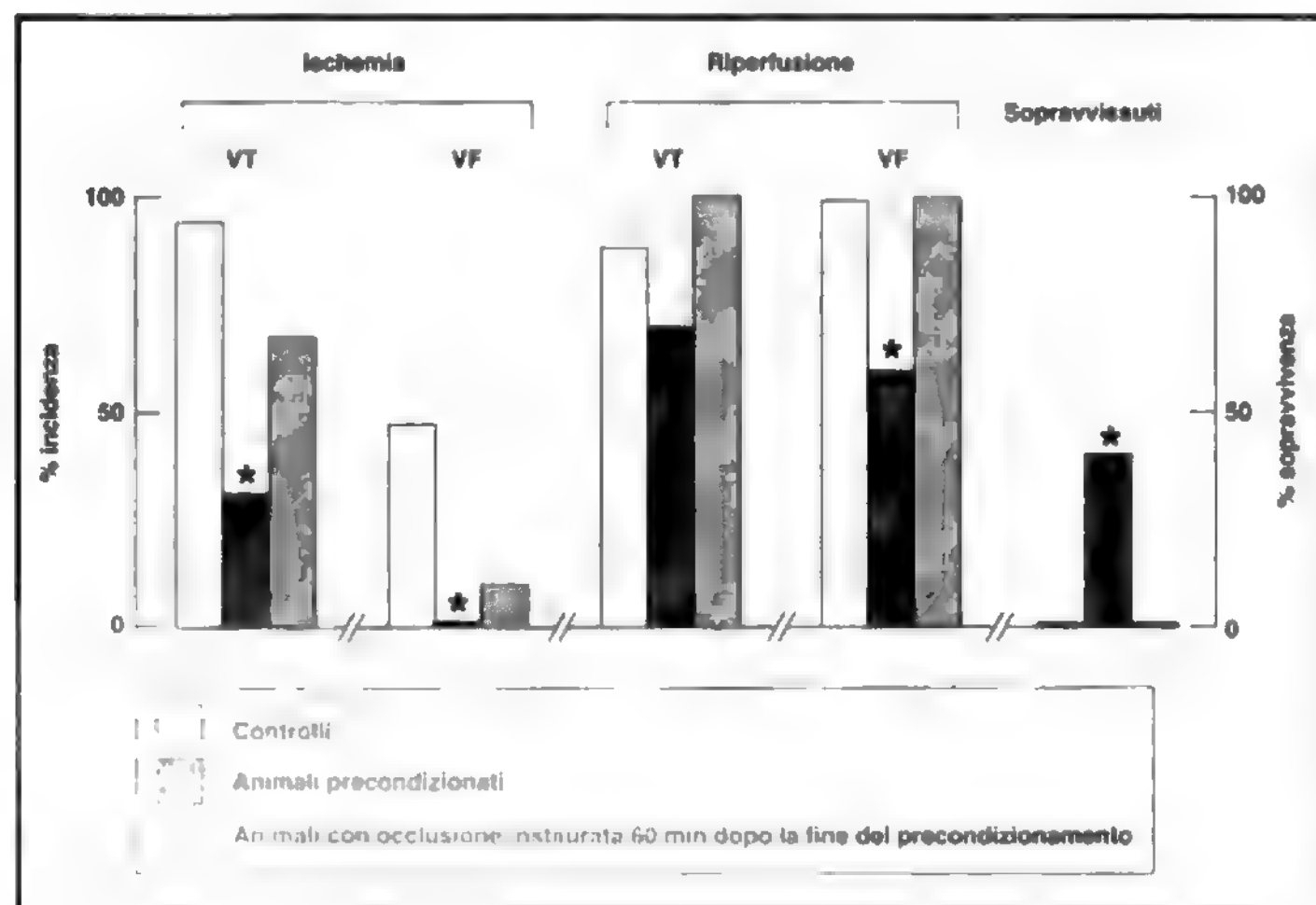
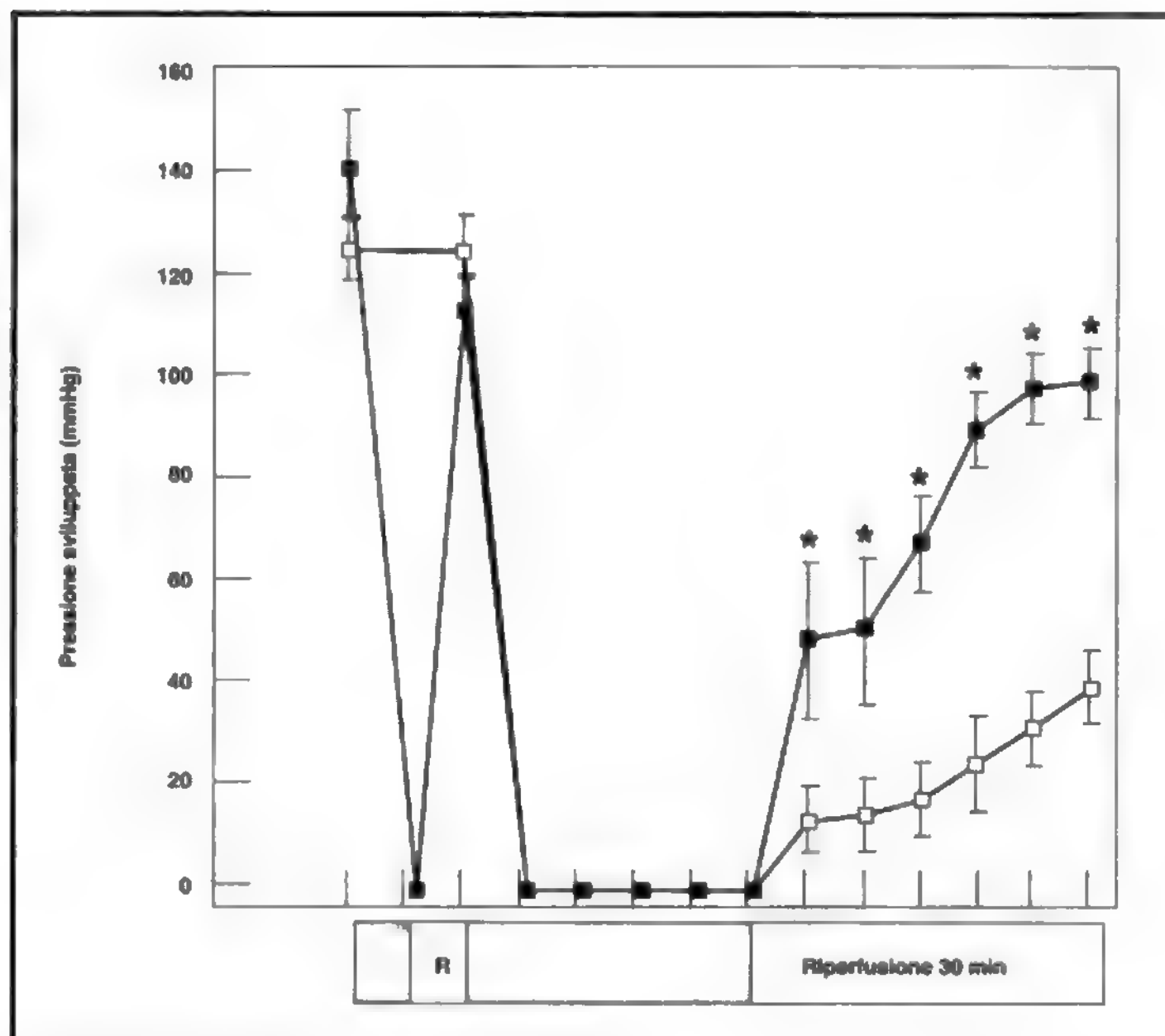


Fig. 2. La potente ma transitoria natura degli effetti antiaritmici del preconditionamento ischemico. Incidenze della tachicardia ventricolare (VT) e della fibrillazione ventricolare (VF) durante un'occlusione di 25 minuti della discendente anteriore in cani anestetizzati e durante la successiva riperfusione. Una riduzione nell'incidenza di VT e VF (ed un incremento nella sopravvivenza) si ebbe in quei cani che erano stati preconditionati da 2 occlusioni di 5 minuti premesse che l'intervallo fra lo stimolo preconditionante e l'occlusione prolungata fosse di 20 minuti. La marcata protezione venne meno quando trascorsero 60 minuti tra la fine dello stimolo preconditionante e l'inizio dell'occlusione prolungata (*: $p < 0,05$). (Da Vegh *et al.*, 1992, riprodotta con il permesso dell'Autore, ridisegnata).

Fig. 3. Incremento del recupero della funzione contrattile indotto dal preconditionamento dopo un periodo prolungato di ischemia globale in assenza di flusso. Il recupero della pressione sviluppata fu significativamente maggiore nei cuori che erano stati preconditionati da 5 minuti di ischemia globale e 5 minuti di ripertusione prima del periodo ischemico prolungato (■); * $p < 0,05$ rispetto ai controlli (□). (Da Cave A. C., J. Molec. Cell. Cardiol., 1995, 27, 969, riprodotta con il permesso dell'Autore, ridisegnata).



mento le prove sperimentali che individuano il preconditionamento come un fenomeno più ampio, per il quale altri organi e tessuti diversi da quello miocardico possano essere protetti da brevi periodi di ischemia. Ciò è stato dimostrato nel rene, nel cervello e nel muscolo scheletrico. Questo sembrerebbe indicare che la protezione origina dalla parete vascolare, ed è parte di un più generale, fisiologico, meccanismo protettivo contro le conseguenze di una riduzione di flusso ematico. Un concetto collegato riguarda la possibilità o meno di proteggere un particolare organo producendo uno stato ischemico in un altro. Questo «precondizionamento a distanza» è stato dimostrato per la prima volta da Karin Przyklenk e Robert Kloner i quali hanno evidenziato che brevi occlusioni di un ramo principale dell'arteria coronaria sinistra (ad es. la circonflessa) proteggono il miocardio irrorato da un'altra branca principale (ad es. la discendente anteriore). Questo significa che brevi periodi di ischemia a carico di un letto vascolare possono proteggere o preconditionare zone distanti di miocardio intatto nei confronti di un successivo infarto. Questa idea è stata ampliata con l'intrigante osservazione che anche una breve ischemia renale protegge il cuore nei confronti di un prolungato periodo di occlusione di un'arteria coronaria, un fenomeno di «precondizionamento a lunga distanza». Le spiegazioni ipotizzabili per questa forma di protezione sono il rilascio di qualche sostanza protettiva da parte del rene ischemico (forse chinine plasmatiche) o l'attivazione riflessa di vie nervose stimolanti l'inibizione della neurotrasmissione simpatica a livello cardiaco.

Il cuore umano può essere preconditionato?

Un adattamento in senso protettivo nel cuore umano si manifesta in un certo numero di situazioni cliniche ma non

è chiaro se in ognuna di queste la causa sia realmente un p.i. ischemico. Sarebbe tuttavia sorprendente se il cuore umano si dimostrasse il primo fra quelli delle molte specie sino ad ora studiate ad essere incapace di preconditionamento. Le dimostrazioni disponibili scaturiscono da studi che coinvolgono procedure di angioplastica coronarica, di *bypass* aorto-coronarico e da analisi retrospettive di pazienti con angina precedente l'infarto miocardico.

L'angioplastica coronarica con palloncino sembrerebbe essere un modello clinico alquanto conveniente di p.i. L'angioplastica provoca un danno ischemico reversibile, piuttosto che irreversibile, ed è abituale l'utilizzo di episodi ripetuti di questo modello di ischemia regionale in condizioni di stretto controllo. Nello studio preliminare di Deutsch *et al.* (1990), i pazienti furono sottoposti ad insufflazioni del palloncino della durata di 90 secondi sulla discendente anteriore. L'ischemia prodotta fu meno severa nel corso della seconda e delle successive insufflazioni rispetto alla prima, come dimostrato dal dolore toracico meno intenso, da una minore variazione del tratto S-T sull'ECG di superficie e da un incremento meno marcato della pressione in arteria polmonare. La produzione di lattato a livello miocardico si dimostrò inoltre inferiore in alcuni pazienti nel corso della seconda insufflazione. Questi cambiamenti «protettivi» non furono osservati con insufflazioni della durata di 60 secondi indicando, come nel preconditionamento classico, che esiste una soglia di durata dell'ischemia richiesta per innescare la protezione. Sembra che nella situazione clinica questa soglia minima sia piuttosto bassa. È possibile, inoltre, che parte della protezione osservata sia dovuta al reclutamento di collaterali coronarici.

Tentativi di studiare il p.i. durante interventi cardiocirurgici hanno sfruttato ripetuti episodi di ischemia (globa-

le) indotti clampando l'aorta. In uno studio che comprendeva la disamina degli effetti di due episodi di ischemia di 3 minuti (ognuno seguito da 2 minuti di riperfusione) sul metabolismo dei fosfati ad alta energia durante un successivo periodo di clampaggio di 10 minuti, le biopsie miocardiche mostrarono che i cuori «precondizionati» disponevano di un più alto contenuto di adenosin trifosfato rispetto ai controlli. Naturalmente questa rappresenta una indicazione molto indiretta del possibile manifestarsi di un p.i. durante interventi di cardiocirurgia; attualmente vengono ricercate le prove di un miglior recupero della funzione contrattile, di periodi di ricovero postoperatori più brevi e, fondamentalmente, di una riduzione della mortalità a lungo termine.

La questione se precedenti episodi anginosi comportino un qualche grado di protezione miocardica in pazienti che vanno incontro ad infarto miocardico è tuttora controversa. Alcuni studi (Matsuda *et al.*, 1984; Ottani *et al.*, 1995) ed un'analisi retrospettiva dei dati scaturiti dal *trial* TIMI II (Kloner *et al.*, 1995), suggeriscono che i pazienti che hanno avuto angina per più di una settimana prima dell'infarto hanno un decorso meno complicato, ed una tendenza ad una mortalità inferiore intraospedaliera. In realtà, in quei pazienti con angina limitata alle 24 ore precedenti l'infarto, la necrosi era meno estesa, come indicato da un minore rilascio in circolo di creatin chinasi, la funzione contrattile ventricolare migliore e le variazioni elettrocardiografiche residue meno marcate. La presenza di circolo collaterale non era differente fra quelli con e quelli senza episodi an-

ginosi precedenti. Sebbene il vero p.i. potrebbe giocare un ruolo anche nel fenomeno del «riscaldamento» osservato nei pazienti con angina (dopo un primo episodio anginoso, il secondo interviene per uno sforzo di durata maggiore rispetto al primo, N.d.T.), una spiegazione più probabile risiede in una variazione del flusso ematico collaterale. Una situazione simile si manifesta in pazienti sottoposti a ripetuti episodi di ischemia indotti tramite *pacing*, nei quali il consumo di ossigeno miocardico e la produzione di lattato durante un secondo periodo di *pacing* risultano minori rispetto al primo. Per una discussione più esauriente sulla possibilità che il p.i. si manifesti nell'uomo, si rimanda il lettore all'editoriale di Lawson sull'argomento (1996).

Possibili meccanismi coinvolti nel preconditionamento ischemico

Almeno 20 differenti meccanismi sono stati proposti per spiegare l'effetto protettivo del p.i. Quello più probabile coinvolge il rilascio di «sostanze protettive endogene miocardiche» (Parratt, 1993), con effetti successivi su specifici recettori di membrana dei miociti cardiaci e meccanismi di trasduzione di segnale che includono la traslocazione della protein chinasi C dal citosol alla membrana e la fosforilazione ATP-dipendente dei canali del potassio. Questa ipotesi è riassunta nella fig. 4.

In condizioni di ischemia miocardica, comprese quelle che si presentano durante le occlusioni preconditionanti, si assiste al rilascio di una varietà di sostanze endogene sia da parte dei miociti cardiaci ischemici (come l'adenosina) che

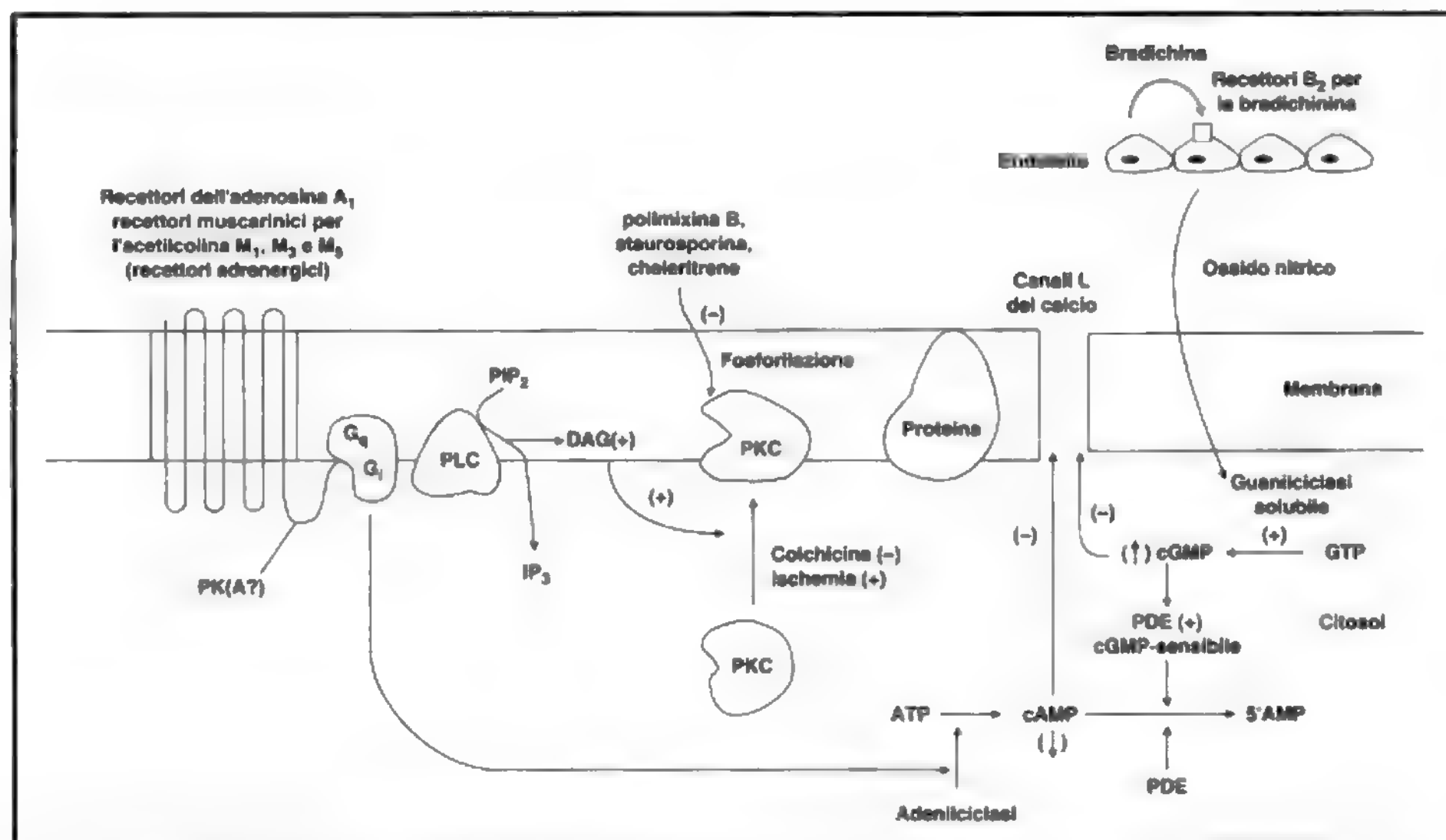


Fig. 4. Possibile meccanismo di trasduzione coinvolto nel preconditionamento ischemico. La bradichinina rilasciata dalle cellule endoteliali stimola la cessione di ossido nitrico dall'endotelio (e possibilmente anche dai miociti cardiaci) che stimola a sua volta la guanilato ciclasi solubile nel citosol, producendo un aumento del cGMP. Questo potrebbe inibire la corrente lenta del calcio in ingresso diretta nei miociti, stimolando una fosfodiesterasi (PDE) cGMP-dipendente a diminuire i livelli di cAMP. L'attivazione della fosfodiesterasi cGMP-dipendente porta alla formazione di 1,2-diacylglicerolo (DAG) ed alla traslocazione della protein-chinasi C (PKC) dal citosol alla membrana, dove viene successivamente attivata. Questa a sua volta fosforila una proteina di membrana che potrebbe essere un canale del calcio o un canale ATP-dipendente. IP₃ inositolo 1,4,5-trifosfato; PIP₂ fosfatidilinositolo 4,5-difosfato; PKA protein-chinasi A (recettore della *luteal* e della *secretin*).

delle cellule endoteliali (come prostaciclina, ossido nitrico e bradichinina). L'evidenza di un ruolo dell'adenosina nel mediare la riduzione delle dimensioni dell'infarto in seguito al preconditionamento appare particolarmente convincente. Le prove sperimentali (Miura, 1996) in questo senso, sono rappresentate dal fatto che:

a) la riduzione dell'estensione della necrosi, che fa seguito ad un'occlusione coronarica ed alla successiva riperfusione in animali preconditionati, viene abolita od attenuata da droghe che bloccano gli effetti dell'adenosina su specifici recettori (A_1);

b) il pretrattamento con la stessa adenosina, o con agonisti selettivi per i recettori dell'adenosina (A_1), mima la riduzione delle dimensioni dell'area infartuale ottenuta con il p.i.;

c) la protezione fornita dal p.i. può essere rinforzata da inibitori del trasporto di nucleosidi come il dilazep o la draflazina, e da «agenti regolatori dell'adenosina» come l'acadesina. Queste sostanze abbassano tutte la «soglia» richiesta per il p.i.; in questo modo periodi di ischemia troppo brevi per indurre preconditionamento sono sufficienti in presenza di tali droghe. Altri mediatori endogeni possono prendere il posto o fare le veci dell'adenosina in certe specie. Questi includono la bradichinina e, forse, la noradrenalina.

Un'ipotesi alternativa è che la bradichinina, che si sa essere rilasciata durante procedure di angioplastica con palloncino, stimoli i recettori B_2 sulla superficie delle cellule endoteliali a rilasciare ossido nitrico e prostaciclina. L'ossido nitrico prodotto in queste condizioni diffonde verso i miociti cardiaci, stimola la guanil ciclasi solubile ed eleva i livelli di GMP ciclico all'interno di queste cellule. Questo porta all'inibizione dell'ingresso del calcio (attraverso i canali del calcio di tipo L), ad una riduzione dei livelli di cAMP (attraverso la stimolazione di una fosfodiesterasi di tipo cAMP-PDE₂ sensibile al cGMP) e ad una riduzione dello stato contrattile dei miociti con conseguente diminuzione della domanda di ossigeno. Tale meccanismo appare simile a quello attraverso il quale, in pazienti con sepsi, l'ossido nitrico contribuisce alla depressione della funzione miocardica.

I meccanismi di trasduzione di segnale nel p.i. coinvolgono probabilmente, in seguito alla stimolazione di appropriati recettori (adenosina, bradichinina), la traslocazione fisica della protein chinasi C (PKC), presente nel citosol cellulare in forma inattiva, al doppio strato lipidico di membrana. Il collegamento tra la stimolazione recettoriale e la traslocazione della PKC implica un ruolo svolto dalle proteine regolatrici trasportatrici del nucleotide guanina (proteine G), che sono in grado di trasdurre l'informazione dai recettori attivati ad effettori di vario tipo, come enzimi o canali ionici. Le proteine G sono presenti in natura in una grande famiglia di isoforme la cui funzione è mediata dalla capacità di rilasciare il nucleotide guanina e legare il guanosin trifosfato (GTP). Le proteine G eterotrimeriche sono composte di tre subunità (α , β , γ) che si combinano a formare differenti tipi di proteine G, ognuna delle quali è attivata da uno specifico recettore. Ad esempio, i recettori A_1 per l'adenosina attivano la forma G_i (inattivata dalla tossina della pertosse) mentre gli adrenorecettori α_1 attivano la forma G_q (insensibile alla tossina della pertosse). Nel corso di p.i. il complesso proteina G-GTP attiva la fosfolipasi C (PLC) che metabolizza il fosfatidilinositolo-4,5 difosfato all'interno della membrana cellulare producendo diacilglicerolo (DAG), i quali entrambi attivano la PKC ed un prodotto intermedio che viene fosforilato ad inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃).

La conferma che la protein chinasi C è coinvolta nel p.i. scaturisce da studi nei quali l'attività della PKC è stata

bloccata dalla staurosporina, che inibisce il sito di legame per l'ATP della PKC, dalla polimixina B, che impedisce ai cofattori fosfolipidici di legarsi all'enzima e che risulta specifica tra le varie chinasi per la PKC e dal cheleritrene, un antagonista altamente selettivo della PKC, che inibisce competitivamente il recettore fosfato dell'enzima. Il fatto che ognuna di queste sostanze blocchi gli effetti del p.i., almeno per quanto riguarda la riduzione delle dimensioni dell'infarto miocardico e la prevenzione delle aritmie in cuori di ratto, è fortemente suggestivo per un coinvolgimento della PKC negli effetti protettivi a livello miocardico del preconditionamento. Che la traslocazione della PKC rappresenti un punto critico è inoltre supportato da esperimenti effettuati con la colchicina che scinde i microtubuli necessari alla PKC per essere fisicamente trasportata dal citosol all'interno della membrana. Ciò ugualmente previene l'effetto protettivo sul cuore da parte del p.i.

Non è chiaro come la traslocazione della PKC nella membrana cellulare porti all'effetto protettivo sul miocardio. La spiegazione più probabile è il successivo coinvolgimento dei canali del potassio ATP-dipendenti, che sono inibiti dall'adenosin-trifosfato intracellulare. In condizioni normali questi canali hanno una scarsa probabilità di trovarsi in uno stato di apertura, ma questa aumenta non appena i livelli di ATP si riducono. Alcuni farmaci in grado di aprire questi canali (ad es. il nicorandil) esercitano effetti benefici in condizioni di ischemia e riperfusione, e tali effetti possono essere bloccati dalla sulfonilurea gliburide, dal 5-idrossidecanoato di sodio e dal meclofenamato dell'acido antranilico. Queste tre sostanze prevengono tutte l'effetto cardioprotettivo di riduzione delle dimensioni infartuali del preconditionamento, suggerendo il coinvolgimento dei canali del potassio ATP-dipendenti (K_{ATP}). Esse prevengono anche gli effetti protettivi della stimolazione dei recettori per l'adenosina (A_1). Sembra così che la proteina che viene fosforilata dalla traslocazione della protein chinasi C nella membrana coinvolga direttamente, o indirettamente, i canali K_{ATP} . Tuttavia, ciò non prova che questi canali siano effettivamente gli effettori finali per la semplice ragione che tuttora non si conosce quale cascata biochimica di eventi faccia seguito all'apertura dei canali K_{ATP} ; per varie ragioni essa probabilmente non è associata con un accorciamento del potenziale d'azione. Un importante oggetto di ricerca sarebbe la precisa comprensione di come i canali K_{ATP} intervengano nel preconditionamento.

Protezione miocardica ritardata tramite preconditionamento ischemico

Il problema di fondo associato con il possibile utilizzo terapeutico del p.i. ischemico risiede nella natura transitoria della protezione. Nella maggior parte dei modelli sperimentali questa viene perduta se l'intervallo di tempo fra lo stimolo preconditionante e l'inizio dell'insulto ischemico è aumentato da diversi minuti ad 1 o 2 ore. Tuttavia esistono attualmente prove che la protezione risultante dal p.i. viene riacquisita diverse ore dopo lo stimolo, suggerendo la possibilità che il cuore possa essere protetto contro le conseguenze dell'ischemia per un più lungo periodo di tempo, ore o forse anche giorni dallo stimolo iniziale. Una varietà di stimolazioni differenti possono indurre una protezione miocardica ritardata. Queste includono brevi periodi di ischemia, un rapido *pacing* cardiaco, *stress* termici, infezioni batteriche coinvolgenti il rilascio di endotossine, derivati atossici della componente attiva lipidica A di endotossine batteriche, come il derivato monofosforilato del lipide A (MPL-C), l'ipossia cronica ed una varietà di sostanze comprendenti catecolamine, la prostaciclina e suoi derivati stabili come la 7-oxo-prostaciclina. Il fenomeno della prote-

zione miocardica ritardata è stato recentemente riesaminato (Parratt e Szekeres, 1995). Tale protezione «ritardata» può durare per diverse ore. La protezione fornita da brevi periodi di occlusione coronarica porta ad una limitazione dell'area infartuale dopo un prolungato periodo di ischemia e successiva riperfusione, fino a 48 (talvolta anche 96) ore dopo lo stimolo iniziale, definendo così una sorta di «seconda finestra di protezione» (Yellon e Baxter, 1995). Un periodo di protezione simile nei confronti delle aritmie ventricolari indotte da ischemia è ottenuto da un rapido *pacing* cardiaco (Kaszala *et al.*, 1996). In entrambi i casi il miocardio può essere ulteriormente protetto, ed anche per un periodo di tempo più prolungato, se un altro stimolo preconditionante è indotto durante il periodo di «indebolimento» della protezione scaturita dallo stimolo iniziale. Sebbene questo fenomeno abbia chiaramente una maggiore potenzialità di utilizzo ai fini terapeutici e farmacologici rispetto alla protezione transitoria fornita dal «classico» p.i., i meccanismi coinvolti sono ben lontani da essere compresi. La spiegazione più probabile, tenuto conto che la protezione risulta bloccata, in alcuni modelli, da inibitori della sintesi proteica, è che lo stimolo porti alla formazione di una varietà di proteine con funzione protettiva attraverso l'incremento di attività di alcuni oncogeni, in particolare il *c-fos*. L'attivazione di questo gene potrebbe essere ottenuta mediante un aumento della concentrazione del cAMP o tramite il coinvolgimento di qualche recettore localizzato sul sarcolemma, forse il recettore per il prostanoide IP. Un'altra possibilità è la traslocazione di alcune isoforme della PKC all'interno del nucleo. Gli enzimi protettivi e le proteine implicate sembrano includere la pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP}$ dipendente, varie isoforme dell'enzima fosfodiesterasi od un'augmentata riserva miocardica antiossidante.

Possibile utilizzo farmacologico del preconditionamento ischemico e suo potenziale terapeutico

Numerose possibilità sono state proposte a tale riguardo (Parratt, 1995). Queste comprendono l'idea di riprodurre la o le sostanze endogene coinvolte nella protezione miocardica, ad esempio analoghi stabili dell'adenosina, il rinforzo degli effetti protettivi dei mediatori endogeni attraverso una modulazione del loro rilascio, trasporto, recupero o metabolismo (ad es. inibitori del trasporto nucleotidico, inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina), la manipolazione delle proteine G (un possibile obiettivo futuro per nuovi farmaci nel trattamento della patologia cardiovascolare), manipolazione e traslocazione della protein-chinasi C, modulazione dei canali del potassio ATP-dipendenti (K_{ATP}) e stimoli atossici tramite i quali ottenere l'induzione di proteine ed enzimi cardioprotettivi. Sebbene sia ancora troppo presto per giungere ad una definitiva conclusione riguardo il possibile utilizzo farmacologico del p.i., esso rappresenta un fenomeno protettivo di tale potenza che, in un futuro non troppo distante, dovrebbe essere possibile escogitare strategie che coinvolgendo questo meccanismo portino ad una terapia in grado di ridurre la gravità e le conseguenze della cardiopatia ischemica.

Bibliografia

- Deutsch E., Berger M., Kussmaul W. G. *et al.*, *Circulation*, 1990, **82**, 1041.
 Kaszala K., Vegh A., Papp J., Gy, Parratt J. R., *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 1996, **28**, 2085-2095.
 Kuzumaki A., Kuzumaki T., Kuzumaki K. *et al.*, *Circulation*, 1995, **16**, 99.
 Lawson C. S., *Preconditioning at the human heart: Fact or fantasy?*, in Wainwright C. L., Parratt J. R. eds., *Myocardial Preconditioning*, 1996, Springer Verlag, Berlin, pp. 1-5.
 Li G. C., Vasquez J. A., Gallagher K. P. *et al.*, *Circulation Res.*, 1995, **77**, 1099.

- Matsuda Y., Ogawa H., Moritani K. *et al.*, *Am. Heart J.*, 1984, **198**, 955.
 Miura T., *Preconditioning against myocardial infarction in its features and adenosine-mediated mechanism*, in Wainwright C. L., Parratt J. R. eds., *Myocardial Preconditioning*, 1996, Springer, Berlin, pp. 1.
 Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A., *Circulation*, 1986, **74**, 1124.
 Ottani F., Galvani M., Ferrini D. *et al.*, *Circulation*, 1995, **91**, 291.
 Parratt J. R., *Cardiovasc. Res.*, 1993, **27**, 693.
 Parratt J. R., *Trends in Pharmacological Sciences*, 1994, **15**, 19.
 Parratt J. R., Szekeres L., *Trends Pharmacol. Sciences*, 1995, **16**, 351.
 Parratt J. R., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1995, **27**, 991.
 Vegh A., Komori S., Szekeres L., Parratt J. R., *Cardiovasc. Res.*, 1992, **26**, 487.
 Vegh A., Szekeres L., Parratt J. R., *Cardiovasc. Res.*, 1991, **25**, 1051.
 Yellon D. M., Baxter G. F., *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 1995, **27**, 1023.
 Wainwright C. L., Parratt J. R., *Myocardial preconditioning*, 1996, Springer Verlag, Berlin.

JAMES R. PARRATT

ISEPAMICINA

F. isépamicine. - I. isepamicin.

SOMMARIO

Introduzione (col. 2960). - **Attività antimicrobica** (col. 2960). - **Farmacocinetica** (col. 2961). - **Indicazioni e dosaggio** (col. 2962). - **Effetti collaterali** (col. 2962).

Introduzione

L'isepamicina [i.] è il derivato semisintetico 1-N-S- α -idrossi- β -aminopropionilico della gentamicina B, contenente un anello 2-desossistreptamino-aminociclitico (fig. 1) (Nagabushan *et al.*, 1978). Differisce dalla gentamicina B per una catena laterale in R₁ che la rende simile all'amikacina e per un gruppo -NHCH₃ in R₂ che, a differenza dell'amikacina, le conferisce resistenza anche all'enzima 6'-aminoacetil-transferasi I (AAC 6-I).

Si presenta sotto forma di polvere bianca, molto idrosolubile.

Attività antimicrobica

Battericida in modo concentrazione-dipendente come gli altri aminoglicosidi (v.*). L'i. penetra all'interno del germe mediante un meccanismo attivo energia- e ossigeno-dipendente e si lega alle subunità ribosomali 30S interferendo o con l'inizio della sintesi proteica o determinando un'errata lettura dell'RNAm. Se l'alterazione della sintesi proteica è sufficiente ne consegue un aumento della permeabilità cellulare e quindi della captazione di ulteriore antibiotico, la perdita dei costituenti cellulari e la morte del germe.

L'i. presenta *in vitro* uno spettro d'azione eguale o superiore a quello dell'amikacina nei confronti di *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e micobatteri (fig. 2), mentre è sovrapponibile nei confronti di *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Pro-*

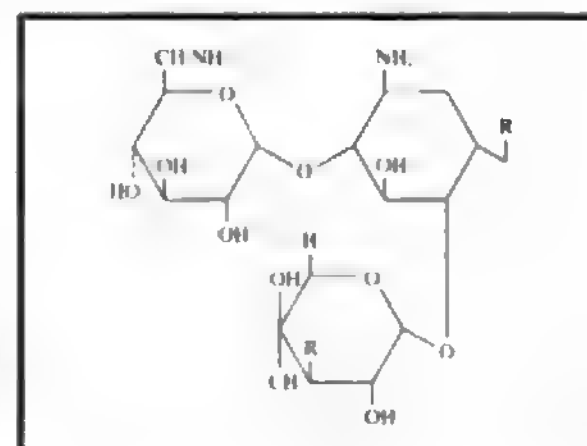


Fig. 1. Struttura chimica dell'i. R₁-NH-CO-CHOH-CH₂-NH₂; R₂-NHCH₃.

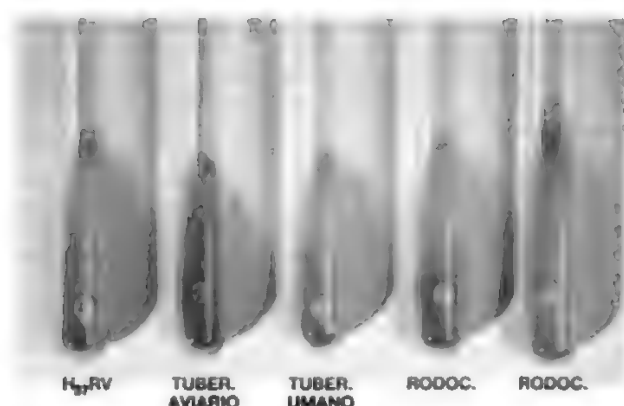


Fig. 2. Alone di inibizione determinato dalla i. (30 mcg) su un ceppo di micobatterio tubercolare umano di collezione, su un ceppo aviario, su un tubercolare umano di recente isolamento e su due ceppi di *Rhodococcus* sp. isolati da soggetti con AIDS (i rodococchi sono scarsamente sensibili). (Osservazione Bonucchi e Velluti).

teus vulgaris, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* con MIC₅₀ (concentrazione minima inibente) che oscillano tra 1,1 e 8,5 µg/ml. Anche gli stafilococchi si sono dimostrati sensibili (Guimaraes *et al.*, 1985), mentre sono resistenti enterococchi, streptococchi, gli anaerobi, *Xantomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes* spp., *Vibrio* spp., *Neisseria* spp.

La resistenza all'i. è dovuta, come per gli altri aminoglicosidi, oltre che ad alterazioni della permeabilità di parete del germe, alla produzione mediata da plasmidi principalmente di tre enzimi modificanti: la 4'-adeniltransferasi I [ANT (4')-I] sintetizzata dagli stafilococchi, la 4'-adeniltransferasi II [ANT (4')-II] sintetizzata dai gramnegativi ed una rara 3'-fosfotransferasi III [APH (3')] prodotta dai germi grampositivi. Questi ultimi due inattivano anche l'amikacina (Jacoby *et al.*, 1990). Per la modificazione introdotta nella molecola in posizione 3' l'i. è stabile nei confronti dell'enzima AACG-I (Thornsberry *et al.*, 1980), il principale inattivatore dell'amikacina da parte dei gramnegativi (Miller *et al.*, 1995). Pertanto l'uso dell'i. è indicato in quelle aree dove *Pseudomonas aeruginosa* e le enterobatteriacee presentano un elevato grado di resistenza alla amikacina mediato da tale enzima.

Un effetto sinergico completo è stato osservato *in vitro* nell'associazione con penicilline semisintetiche e con alcune cefalosporine; è meno evidente con l'imipenem. I più ciprofloxacina hanno un effetto additivo o indifferente (Jones *et al.*, 1991).

Farmacocinetica

Solubile in acqua, ma molto meno nella maggior parte dei solventi organici, l'i. deve essere somministrata per via parenterale. Dopo 30 min dalla iniezione i.m., l'assorbimento è completo; le massime concentrazioni sieriche (C_{max}) sono però inferiori del 40% rispetto quelle ottenute dopo infusione e.v. (Barr *et al.*, 1995), ma vengono raggiunte dopo 90 min. Nei 12 casi da noi studiati la somministrazione di i. in monodose giornaliera di 15 mg/kg di peso ha permesso di raggiungere un picco sierico di 63 ± 15 mcg/ml e una valle di $0,77 \pm 0,70$ mcg/ml. In circolo è scarsamente legata alle proteine plasmatiche (4-6%). Il volume di distribuzione si aggira tra il 21 ed il 27% del peso corporeo perché l'antibiotico si concentra più velocemente degli altri aminoglico-

sidi quasi esclusivamente nel compartimento extracellulare. L'i. non è sottoposta ad inattivazione metabolica: dopo la somministrazione di una dose singola viene recuperata quasi completamente immodificata nelle urine delle successive 24 ore. Pertanto, come per gli altri aminoglicosidi, la clearance dell'i. si riduce in modo proporzionale a quella della creatinina. L'età avanzata ne influenza l'eliminazione renale in quanto abbassa la clearance della creatinina. Gli intervalli fra le dosi vanno perciò determinati in base alla riduzione della funzionalità renale.

La concentrazione degli aminoglicosidi nel plasma e nell'interstizio aumenta in maniera proporzionale alle dosi. Nel rene e nell'orecchio interno invece l'accumulo è saturabile, non cresce cioè con le dosi e la tossicità dipende dal tempo per cui tale saturazione viene mantenuta in questi organi.

Poiché l'efficacia degli aminoglicosidi è dose- e concentrazione-dipendente e poiché possiedono un evidente effetto post-antibiotico (Spivey *et al.*, 1981), viene consigliata la somministrazione di i. un'unica volta al giorno. Si ottengono in tal modo picchi sierici elevati, molto superiori alle MIC per i vari germi sensibili che vengono rapidamente uccisi. La successiva rapida eliminazione del farmaco ne abbassa le concentrazioni plasmatiche al di sotto dei valori raggiunti nel rene e nell'orecchio interno dai quali l'antimicrobico comincerà ad essere precocemente dismesso e non si accumulerà (Gilbert, 1991). Da notare che la fase di eliminazione terminale lenta dell'i. (fase γ) è considerevolmente più breve ($t_{1/2} \gamma = 34$ ore) di quella di tutti gli altri aminoglicosidi.

Una minore emivita γ non influenza l'attività antibatterica mentre permette ai tessuti di eliminare più rapidamente il farmaco con evidenti vantaggi in termini di tossicità.

Indicazioni e dosaggio

Le indicazioni dell'i. sono quelle della gentamicina e dell'amikacina nei casi in cui occorra la stabilità ad alcuni enzimi batterici inattivanti l'antibiotico (v. sopra). Più specificatamente le indicazioni nell'adulto immunocompromesso od immunocompetente e in età pediatrica sono: le gravi infezioni, spesso nosocomiali, delle basse vie respiratorie e del tratto urinario, quelle intraddominali, della cute e tessuti molli, le setticemie, sostenute da germi gramnegativi o da stafilococco aureo sensibili all'i. ed eventualmente resistenti all'amikacina.

L'efficacia clinica nei confronti dello stafilococco aureo e della maggior parte dei gramnegativi sensibili è pari a quella dell'amikacina (Covi e Velluti, 1995).

In vari studi è stata associata ad antibiotici β -lattamici (ceftriazone, nell'infezione da *Pseudomonas*; imipenem; ceftriazone), a metronidazolo (nelle infezioni intestinali), a fluorochinoloni, a teicoplanina e a vancomicina (funzionalità renale permettendo) in caso di infezioni da stafilococco aureo.

La dose consigliata varia in base alla severità dell'infezione da 7,5 a 15 mg/kg in monosomministrazione giornaliera (Miller *et al.*, 1995). In caso di insufficienza renale si raccomanda la somministrazione di 7,5 mg/kg ad intervalli di tempo correlati alla riduzione della clearance della creatinina.

Effetti collaterali

I più comuni riportati sono: flebiti, cefalea, compromissione renale con aumento della creatinina sierica, vertigini. Molto bassa l'insorgenza di ototossicità valutata con i metodi audiometrici.

Bibliografia

- Barr W. H., Colucci R., Radwanski E. *et al.*, *J. Chemother.*, 1995, 7, suppl. 2, 53-61.
 Covi M., Velluti G., *J. Chemother.*, 1995, 7, suppl. 2, pp. 137-142.
 Gilbert D. N., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35, 399-405.
 Guimaraes M. A., Sage R., Noone P., *J. Antimicrob. Chemother.*, 1985, 16, 555-561.
 Jacoby G. A., Blaser M. J., Santaman P. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, 34, 2381-2386.
 Jones R. N., Johnson D. M., Barret M. S., Erwin M. E., *J. Chemother.*, 1991, 3, 289-294.
 Miller G. H., Sabatelli F. J., Naples L. *et al.*, *J. Chemother.*, 1995, 7, suppl. 2, 31-44.
 Nagabhushan T. I., Cooper A. B., Tsai H. *et al.*, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1978, 31, 681-687.
 Spivey J. M., *Clin. Pharmacol.*, 1992, 11, 865-875.
 Thornberry C., Barry A. L., Jones R. N. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 18, 338-345.

MARISA COVI E GIORGIO VELLUTI

ISOLAMENTO [v. voll. VIII, coll. 531-544; Agg. I, coll. *4194-4195]

SOMMARIO

Premessa (col. 2963). - **Legislazione italiana** (col. 2963). - **Tipologie di isolamento** (col. 2965). - **«Reverse isolation»** (col. 2966).

Premessa

Le importanti novità intervenute sull'argomento negli ultimi anni sono tutte improntate alla massima valorizzazione di altre misure di profilassi verso le malattie infettive e parassitarie, riducendo invece al minimo gli interventi di *isolamento* fisico vero e proprio, inteso come *separazione del soggetto in questione e preclusione di qualsiasi contatto con ogni altra persona, eccezion fatta per il personale strettamente adibito ai compiti dell'assistenza*; tale personale, particolarmente esperto nell'epidemiologia di queste malattie, sarà stato rafforzato con pratiche immunitarie rivolte verso le principali di esse ed eventualmente protetto con chemioprophilassi specifica, oltreché ovviamente con adeguati mezzi fisici e meccanici di barriera.

Questa impostazione risponde, in pratica, alle moderne esigenze di sicurezza sanitaria, col minimo pregiudizio per la rapidità e la facilità degli interscambi (commerciali, turistici, etc.) da una parte all'altra del globo.

Il perseguimento di tale traguardo è legato, in primo luogo, alla larga sdrammatizzazione del rischio di infezione per le intervenute conoscenze sulla durata della contagiosità, che hanno portato una notevole riduzione del periodo di i. in numerose malattie, oltreché alla migliorata organizzazione sanitaria, almeno nei Paesi progrediti, ed alle possibilità di intervento delle istituzioni internazionali, con rapide ed affidabili metodiche di laboratorio, con mezzi antimicrobici e di lotta contro gli eventuali vettori e col ricorso agli specifici presidi immunitari.

È però da tenere in conto che, mentre si è ridotto l'elenco delle malattie infettive per le quali si impone ancora l'i. dei malati o comunque di coloro che possono diffondere l'infezione nella collettività (v. CONTUMACIA IV, 1019; **1395-1396), nuove e/o più spiccate esigenze di ricorrere a questa drastica misura si pongono con un altro intendimento, quello cioè di difendere pazienti ospedalizzati dal rischio di superinfezioni e/o infezioni crociate, specialmente per l'espandersi delle condizioni di immunodepressione, naturale o ancor più che naturali.

Legislazione italiana

La normativa italiana prevede oggi l'obbligo del ricorso all'i. oltreché per le classiche malattie esotiche (peste, colera, febbre gialla e tifo esantematico) e per le emergenti e

temute febbri emorragiche virali, pure esse d'importazione, solo per alcune delle malattie endemo-epidemiche sottoposte a notifica e non più per tutte quelle contemplate negli elenchi, di tanto in tanto aggiornati, delle malattie infettive e contagiose.

È da precisare, al riguardo, che anche le più recenti Circolari Ministeriali (n. 65 del 18/8/83 e n. 14 del 31/3/92), come del resto la precedente n. 56 del 1975, fanno riferimento alle indicazioni provenienti dagli Organismi Internazionali e da Istituzioni di universale riconoscimento, quali il *Center for Disease Control* (CDC) di Atlanta, attraverso il filtro operato dal Consiglio Superiore di Sanità, per l'applicabilità alla situazione italiana.

L'ultima Circolare-base (n. 65/83) è certamente ben dettagliata anche se non del tutto esaustiva: mancano, ad esempio, indicazioni per alcune importanti malattie esotiche, quali la febbre gialla e la peste, tanto che per quest'ultima una apposita integrazione si è resa necessaria in occasione della recente epidemia che ha colpito il subcontinente indiano (*Linee guida per la prevenzione e il controllo della peste* - 28/9/94). Altre opportune integrazioni sono state talvolta apportate sia per specifiche problematiche nelle quali erano nel frattempo intervenute nuove e sostanziali acquisizioni (è il caso delle epatiti virali), sia per drammatiche ed improvvise circostanze epidemiologiche, quali l'esplosione dell'epidemia di colera in Albania, con interessamento della nostra Puglia (*Linee guida per la prevenzione del colera* - 17/9/94), e di quella da virus Ebola nello Zaire (Circ. M. San. del 26/5/95 ad oggetto *Aggiornamento linee-guida per la gestione dei soggetti con sospetta infezione da virus Ebola*).

La Circolare 65/83, modificata poi per le epatiti virali dalla C. M. 14/92, elenca tutti i provvedimenti da adottare di fronte a talune malattie diffuse, che richiedono l'i. o altre misure, quali la sorveglianza sanitaria, nei confronti del paziente e dei conviventi e contatti: queste malattie sono: colera, difterite, dissenteria bacillare e salmonellosi, epatiti virali A, B ed altre epatiti virali, febbre tifoide, meningite meningococcica, morbillo, parotite, pertosse, poliomielite, rosolia, scarlattina ed altre streptococcie acute, varicella, pediculosi, scabbia, tigna, febbri emorragiche virali e tubercolosi polmonare contagiosa.

Affinché l'i. del malato venga a coincidere con il reale periodo di contagiosità e diffusività dell'agente infettivo, la sua durata, alla luce delle nuove conoscenze indicate in premessa, viene pertanto ad essere:

- a) a partire dalla comparsa della sintomatologia clinica, 5 giorni in caso di morbillo, 7 giorni per l'epatite di tipo A e per la varicella, 10 giorni per la poliomielite e almeno 21 giorni, salvo diverse indicazioni, per le febbri emorragiche virali;
- b) a partire dall'inizio di un adeguato trattamento antibiotico, 24 ore in caso di scabbia, 48 ore per la meningite meningococcica, 3 giorni per la scarlattina e le altre streptococcie acute e 7 giorni per la pertosse;
- c) fino alla completa guarigione clinica in caso di parotite;
- d) anche oltre la guarigione clinica in caso di colera, febbre tifoide, dissenteria bacillare e salmonellosi (almeno nei casi in cui l'Autorità Sanitaria ritenga di ricorrere al ricovero ospedaliero), malattie nelle quali l'i. deve perdurare fino alla negativizzazione di 3 coproculture successive, eseguite a giorni alterni, dopo almeno 3 giorni dal termine della terapia appropriata. L'i. va poi oltre la guarigione clinica anche in caso di difterite, fino alla negativizzazione di 3 esami batteriologici, effettuati ad intervalli di almeno 24 ore dopo il termine della antibiotico-terapia, ed anche nel caso di tubercolosi polmonare in fase contagiosa, fino al riscontro di negatività dell'esame dell'espettorato.

Nella stessa Circolare 65/83 vengono inoltre date indicazioni per alcune misure contumaciali da applicare alle varie possibili sorgenti di infezione, in altre malattie infettive o comunque diffuse, che comportino rischi particolari in determinate situazioni o nelle collettività, oppure per determinate categorie. È il caso ad esempio di rosolia, pediculosi e tigna, malattie nelle quali non è prevista nessuna restrizione per il malato: per la rosolia vi è però la giusta raccomandazione di evitare il contatto di donne gestanti con il paziente, mentre per le altre due patologie è previsto l'obbligo di un adeguato trattamento farmacologico ed il ricorso ad altre misure contumaciali quali la disinfestazione e l'educazione sanitaria (v. CONTUMACIA IV, 1019; **1395-1396).

Il ricorso ad altre misure contumaciali diverse dall'i. (sorveglianza sanitaria, accertamenti diagnostici, informazione ed educazione sanitaria, etc.) è anche previsto dalla già citata C. M. 14/92 per le epatiti virali.

Tipologie di isolamento

In questi ultimi anni si è assistito ad una continua evoluzione delle tipologie di i.: non trova, infatti, più applicazione l'i. *domiciliare con piantonamento*, mentre è pienamente valorizzato l'i. *domiciliare fiduciario*, affidato al controllo del medico di famiglia, misura che viene in pratica a coincidere con le esigenze di termostatazione connesse con l'accudimento terapeutico del paziente.

Anche l'i. *ospedaliero*, che resta tassativamente obbligatorio per le malattie «quarantenarie» e per le febbri emorragiche virali, è andato incontro ad interessanti novità.

Per talune malattie particolarmente gravi, aereodiffuse o a trasmissione non del tutto conosciuta, è ad esempio indicato l'i. *ospedaliero assoluto*, che dovrà essere effettuato a partire dal trasporto dei pazienti, utilizzando barrelle di i. pressurizzate e dotate di filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air*); questi pazienti saranno quindi inviati in ospedali specializzati, provvisti di strutture di i. altamente qualificate e specifiche, cui si accede attraverso ingressi appositi. Tali unità sono costituite da stanze di degenza singole, dotate di dispositivi speciali di ventilazione e caratterizzate 1) da pressione d'aria negativa nella stanza in rapporto all'anticamera, 2) da zone filtro, anch'esse a pressione negativa rispetto ai corridoi, 3) da servizi igienici separati, 4) da interfono per le comunicazioni con l'esterno e 5) da filtrazione dell'aria in uscita (almeno 6 ricambi orari) con filtri HEPA; il personale adibito a questo reparto non potrà, inoltre, essere utilizzato in altre mansioni nosocomiali.

Poiché gli ospedali che rispondono a questi requisiti, e che devono essere dotati anche di laboratorio ad alta sicurezza (tipo P3), sono in numero limitatissimo sul territorio nazionale, nelle altre situazioni l'i. *ospedaliero* viene effettuato in Reparti o Divisioni di malattie infettive e comunque in camere separate, singole o a più letti (per la stessa malattia), valorizzando al massimo con le odierne tecniche di progettazione gli accorgimenti e i nuovi presidi strutturali (pareti divisorie in cartongesso, o pareti a vetri intercambiabili, etc.); allo stesso scopo, nella veduta attuale di *isolare la malattia più che il paziente*, è sempre più diffuso il ricorso ai cosiddetti «dispositivi di barriera» individuali (guanti, mascherine, etc.).

Il CDC di Atlanta ha perciò emanato, fin dal 1984, come supporto agli sforzi legislativi e organizzativi internazionali in materia, alcune direttive per l'applicazione di un efficace i. *ospedaliero*: sono state così suggerite due diverse e alternative modalità di i. e cioè quello a) *per categoria* e quello b) *per malattia specifica*.

a) Il primo sistema poggia sul raggruppamento delle malattie infettive in sette *categorie*: quattro di queste sono previste come *procedure specifiche* (i. stretto, i. da contatto, i. respiratorio e i. per tubercolosi) per le quali è richiesto l'i. dei pazienti in camera separata; le rimanenti tre, denominate *precauzioni* (*precauzioni enteriche*, *precauzioni drenaggio-secrezioni* e *precauzioni sangue-liquidi biologici*), non individuano, invece, l'uso obbligatorio di una camera separata.

L'attribuzione all'una o all'altra categoria dei soggetti da isolare è ovviamente compito prioritario dei sanitari, in base alla conoscenza della patogenesi e delle modalità di contagio proprie di ciascuna malattia infettiva e diffusa.

Nel 1989 lo stesso CDC ha poi opportunamente previsto che le misure contemplate nella specifica «precauzione sangue-liquidi biologici» debbano assumere rilievo generale, per una loro applicazione universale di profilassi anti-infettiva, anche al di fuori della situazione di i.

b) L'altro sistema, quello per *malattia specifica*, prende in considerazione, al contrario, tutte le singole malattie, così da identificare per ciascuna di esse le procedure di i. più idonee; naturalmente questo sistema è più preciso e affidabile del precedente, ma comporta notevoli difficoltà per il personale, associandosi a costi troppo spesso eccessivi, in rapporto al reale beneficio.

«Reverse isolation»

Come già accennato nelle premesse, oltre alle tipologie di i. con finalità volta verso le possibili sorgenti umane delle classiche e temibili malattie infettive, oggi il ricorso a questa pratica contumaciale è sempre più perseguito nel tentativo di proteggere — i. *protettivo* o *reverse isolation* — pazienti immunocompromessi (neonati prematuri, soggetti trapiantati, o leucemici, o comunque sottoposti a forti terapie antitumorali e/o immunodepressive, oppure immunodepressi per cause naturali, etc.) e particolarmente esposti (ricoverati per gravi ustioni, per terapie intensive o rianimatorie, etc.); anche in questi casi, nei quali la finalità è quella di prevenire l'insorgenza di infezioni nosocomiali, la tendenza attuale è sempre più indirizzata verso la semplicità e praticità, con la massima valorizzazione delle misure funzionali e dell'educazione sanitaria.

È stata certamente l'esplosione dell'infezione da HIV che ha posto poi l'accento sull'esigenza della contestuale protezione del personale sanitario contro il rischio del contagio virale e del malato stesso dai numerosi agenti di infezione opportunistica (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.*; v.**]). Anche in tal caso l'i. *protettivo* è più frequentemente non assoluto ed imperniato soprattutto sui mezzi di barriera e sulla educazione sanitaria del soggetto e del personale di assistenza.

Come già accennato, nella attuazione pratica delle odierne modalità di i., viene in ogni caso ad assumere massima rilevanza l'adozione delle cosiddette *precauzioni universali*, che rappresentano misure comportamentali alle quali devono attenersi sia il personale, sia i visitatori e possibilmente i pazienti e che configurano l'essenza stessa dell'i. *funzionale*.

Tali precauzioni universali sono: 1) il lavaggio attento e metodico delle mani, prima e dopo l'accudimento del malato; 2) l'utilizzazione di guanti, camici e grembiuli, per evitare il contatto con liquidi biologici e secrezioni; 3) l'impiego di mascherine e occhiali coprivolto, per la protezione delle mucose nei confronti dei «droplet nuclei»; 4) l'allontanamento dall'opera di assistenza di quei sanitari che presentano lesioni di continuo, specialmente se infette, della cute e delle mucose, con rischio di sanguinamento; 5) l'uso routinario di materiale monouso, con particolare attenzione agli strumenti taglienti e pungenti.

Bibliografia

- Bennett J. L., Brachman P., *Infezioni ospedaliere*, 1992, Piccin Ed., Padova.
- Moro M. L., *Infezioni ospedaliere: prevenzione e controllo*, 1993, Centro Scientifico Editore, Torino.
- Moroni M., Esposito R., DeLalla F., *Manuale di malattie infettive*, 1994, 4 ed., Masson Ed., Milano.
- Pagano A., Previtera G., *Le infezioni ospedaliere. Prevenzione*, 1994, Intramed Communications Ed., Milano.
- Rapporto del Comitato sulle Malattie Infettive. Red Book of American Academy of Pediatrics*, 1993, C.I.S. Ed., Milano.

GIUSEPPE ARMANI E LUIGI ROSSI

ISTERISMO [v. vol. VIII, coll. 629-643]

Inquadramento attuale dell'isterismo in base al DSM-IV

Parlare al giorno d'oggi di *isteria* e, a maggior ragione, parlare di *isterismo*, comporta la necessità di prendere le mosse dalle nuove acquisizioni che, negli ultimi due decenni, sono state raggiunte in campo nosografico-classificativo, soprattutto attraverso la compilazione del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, nelle sue ultime edizioni (DSM-III, DSM-III-R e DSM-IV).

Per diversi decenni l'interesse degli studiosi si era concentrato maggiormente su altri argomenti psichiatrici, diversi dalla nosografia, giungendo da parte di alcune correnti più radicali (antipsichiatria) a sostenere l'inutilità, o peggio la dannosità della diagnosi psichiatrica, e da parte di altri AA. (correnti psicodinamiste) a sostenere il sostanziale imparentamento, sia come etiologia, sia come patogenesi, e dunque anche per quello che riguarda i rimedi, tra quasi tutti i quadri clinici di interesse psichiatrico.

Sfumavano a questo modo, ad es., i confini tra i quadri psicotici e quelli psiconevrotici, tra i quadri psiconevrotici strutturati e i disturbi della personalità o del carattere, e via dicendo.

Sul successivo mutamento di questa impostazione ha certamente influito anche la scoperta o messa a punto di tutta una serie di nuovi farmaci ben più specifici di quelli prima a disposizione per il trattamento delle malattie psichiatriche.

E comunque la classificazione dei quadri isterici in particolare ha subito una decisa evoluzione, al punto che il termine *isterismo* potrebbe forse essere utilizzato oggi solamente nell'accezione di «stile isterico», e cioè di un connotato del tutto qualitativo che collega tra loro quadri psicopatologici diversi per espressività sintomatologica e per meccanismi patogenetici, e che sono, nell'ottica nosografica *multiassiale*, di pertinenza di almeno due assi su cinque (il primo, quello dei disturbi fenomenologicamente più conclamati, ed il secondo, quello dei disturbi e dei tratti particolari di personalità), se non di tre assi su cinque, e cioè anche del terzo asse, quello delle malattie fisiche, deputato dagli estensori del DSM a raccogliere i quadri che in passato venivano definiti *psicosomatici*.

I 5 assi, del DSM, rappresentano delle specifiche «classi di informazioni»: il primo riguarda la diagnosi psichiatrica «sindromica»; il secondo le notizie su eventuali tratti patologici di personalità o problemi di ritardo mentale; il terzo le concomitanti patologie fisiche; il quarto i fattori psico-sociali di stress; il quinto il grado di menomazione del funzionamento del soggetto.

Per inciso, il DSM-IV ha opportunamente abolito anche il termine «psico-organico» che, come quello di «psicosomatico», era diventato, rispetto alle conoscenze odierne, del tutto obsoleto e confusivo, perché nessuno studioso aggiornato potrebbe oggi sostenere che un disturbo propriamente organico (o somatico) non sia condizionato anche da fattori squisitamente psichici e viceversa (ottica bio-psico-sociale).

L'altra premessa che dobbiamo fare è la seguente: già il DSM-III (edizione americana 1980, edizione italiana 1983) aveva ritenuta opportuna la eliminazione dalla *classificazione* di qualsivoglia capitolo unitario riguardante la *psiconevrosi*. Erano infatti stati acquisiti sufficienti dati e conoscenze per porre fine all'imparentamento tra gruppi di disturbi mentali non omogenei per fenomenologia sintomatologica, meccanismi patogenetici, e sensibilità ai vari tipi di intervento terapeutico. Essi si pensano ai *disturbi d'ansia* rispetto ai *disturbi psico-sessuali*, ai *disturbi somatoformi* rispetto ai veri e propri *disturbi di personalità*, alla *distimia* o

depressione neurotica rispetto ai *disturbi dell'adattamento* o *da stress*, e cioè ai disturbi mentali reattivi).

Per quel che riguarda dunque l'*isteria*, possiamo senz'altro dire che se ne sono andati via via meglio precisando i confini: adiacenti ad essa ma chiaramente *fuori di essa*, stanno al giorno d'oggi: la gran parte dei *disturbi somatoformi* (disturbo di somatizzazione, disturbi algici o da dolore psicogeno, ipocondria, disturbo da dismorfismo corporeo o dismorfofobia); i *disturbi d'ansia* come gli *attacchi di panico* (v. PANICO, ATTACCO DI*) con sintomi fisici; certe disfunzioni sessuali; i *disturbi fittizi* (v. FITTIZI DISTURBI**) con sintomi psicologici, fisici o combinati, che sono caratterizzati dal bisogno del soggetto di assumere e mantenere il ruolo di malato; la *simulazione*, che comporta la scelta cosciente e deliberata di apparire malati per conseguire scopi evidenti; i *disturbi acuti da stress* e *post-traumatici da stress*, e i *disturbi vari dell'adattamento* (che corrispondono nel loro insieme ai *disturbi reattivi* delle precedenti classificazioni), questi ultimi nelle loro varianti: con *umore depresso*, con *ansia mista* (cioè con ansia ed umore depresso), con *alterazioni della condotta*, e con *alterazioni miste della emotività e della condotta*.

Ai confini del *disturbo isterico (istrionico) della personalità* stanno invece gli altri *disturbi di personalità* del Gruppo B (che potremmo chiamare il Gruppo «marginale», per distinguerlo dagli altri due gruppi, uno più vicino alla psicosi, l'altro più classicamente «psiconevrotico»), come il *borderline*, l'*antisociale*, il *narcisistico*, ed anche il *dipendente*, che fa capo invece al terzo raggruppamento.

Questo per quel che riguarda i compartimenti nosografici confinanti.

All'interno invece di un informale raggruppamento dedicato alle categorie diagnostiche corrispondenti ai *quadri isterici* andranno annoverati:

1) il *disturbo di conversione*, classificato nella sezione dei *disturbi somatoformi* (e cioè dei disturbi psichici ad espressività somatica), nelle sue varianti:

- a) con sintomi o deficit motori;
- b) con attacchi epilettiformi o convulsioni;
- c) con sintomi o deficit sensitivi;
- d) con sintomatologia mista;

2) la maggior parte dei *disturbi dissociativi*, e cioè di quei disturbi che hanno come caratteristica essenziale la sconnessione delle funzioni, solitamente integrate, della coscienza, della memoria, dell'identità, e della percezione dell'ambiente, vale a dire le categorie diagnostiche seguenti:

- a) amnesia dissociativa (o psicogena);
- b) fuga dissociativa (o psicogena);
- c) disturbo dissociativo dell'identità (chiamato in passato «personalità multipla»).

V. a tal proposito la voce DISSOCIATIVE SINDROMI DI CONVERSIONE (ISTERICHE)** coll. **1617-1624.

A parte, va considerato, a nostro avviso, il *disturbo di depersonalizzazione* (v. DEPERSONALIZZAZIONE; DISSOCIATIVE SINDROMI DA CONVERSIONE**, *disturbo di depersonalizzazione*), che può manifestarsi in collegamento con vari disturbi appartenenti ad altre Sezioni della Classificazione. La pseudociesi (gravidanza isterica) viene classificata come *disturbo somatoforme non altrimenti specificato*.

La «personalità isterica» della trattatistica classica si ritrova essenzialmente nella Categoria del *disturbo istrionico di personalità* (e relativi tratti), anche se importanti AA., come O. Kernberg, propendono per il mantenimento di una differenziazione tra *personalità isteriche* (neurotiche in base alle concezioni psicopatologiche classiche) e *personalità istrioniche* (più vicine ai quadri *borderline*).

Va da sé che la presenza in un soggetto delle caratteristiche fondamentali o di alcuni tratti di personalità isterico-

istronici condiziona il più delle volte patoplasticamente anche l'espressione sintomatologica e il decorso di altri eventuali disturbi o alterazioni psichiche concomitanti.

Per quanto riguarda la soglia tra normale e patologico, i criteri del DSM si basano essenzialmente sul concetto descrittivo della presenza di menomazione del funzionamento mentale o di disagio clinicamente significativi, facendo propria quell'idea di *continuum* tra normale e patologico già sostenuta in passato da molti studiosi dell'isteria.

Rimane pertanto, sullo sfondo, il grande criterio dinamico unificativo della *isteria*: l'alterazione delle modalità comunicative e relazionali al fine di risolvere una situazione altrimenti insostenibile sul piano emotivo.

Bibliografia

- AA. VV., *Enciclopédie Médico-Chirurgicale*, 1985, 10, Paris.
 AA. VV., *Trattato Italiano di Psichiatria*, 1992, 1 ed., Masson Italia, Milano.
 American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*, DSM-III, 1980, Washington D.C.
 American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*, DSM-III-R, 1987, Washington D.C.
 American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*, DSM-IV, 1994, Washington D.C.
 Giberti-Rossi, *Manuale di Psichiatria*, 1983, Piccin-Vallardi, Padova.
 Michels et al., *Psychiatry, Revised Edition*, 1991, Lippincott, Philadelphia.

ROMOLO ROSSI, ROBERTA SANTINI E FRANCESCO JACOPO SCARSI

ISTEROSCOPIA

F. *hystéroscope*. - I. *hysteroscopy*. - T. *Histeroskopie*. - S. *histeroscopia*.

SOMMARIO

INTRODUZIONE SULLA ISTEROSCOPIA DIAGNOSTICA E OPERATORIA

col. 2969

ISTEROSCOPIA DIAGNOSTICA

col. 2970

Strumentazione (col. 2970): *Sistema ottico*. - *Sistema di illuminazione*. - *Sistema di distensione*. - **Indicazioni** (col. 2971): *Anomali sanguinamenti uterini*. - *Sterilità o infertilità primaria o secondaria*. - *Dismorfismi uterini*. - *Polipi e fibromi sottomucosi uterini*. - *Altri esami anomali*. - *Miomi uterini*. - «*Lost IUD*» e corpi estranei endouterini. - *Profilassi delle sinechie*. - *Monitoraggio delle iperplaste endometriali*. - *Valutazione prechirurgica del carcinoma endometriale*. - **Esecuzione dell'esame** (col. 2976). - **Controindicazioni** (col. 2977). - **Effetti collaterali** (col. 2978). - **Complicanze** (col. 2978).

ISTEROSCOPIA OPERATORIA

col. 2979

Chirurgia isteroscopica tradizionale (col. 2979). - **Chirurgia isteroscopica resettoscopica** (col. 2981). - **Chirurgia isteroscopica laser** (col. 2982). - **Complicanze** (col. 2983). - **Tipo di intervento** (col. 2983): *Rimozione di lost IUD o di altri corpi estranei endouterini*. - *Biopsia mirata*. - *Sinechiolisi*. - *Polypectomia*. - *Miomectomia*. - *Catterizzazione tubarica*. - *Metroplastica*. - *Ablazione endometriale*.

INTRODUZIONE SULLA ISTEROSCOPIA DIAGNOSTICA E OPERATORIA

L'isteroscopia [i.] è la metodica endoscopica che consente la diretta visione del canale cervicale, della cavità uterina, dell'endometrio e degli osti tubarici. Diversamente dalle altre tecniche endoscopiche (in gran parte già diffuse da decenni), anche se la esecuzione della prima i. risale al 1869, ad opera del Pantaleoni, tale metodica ha iniziato la sua diffusione su larga scala solamente a partire dagli anni '80 (Hamou, 1980).

Gli ostacoli alla esecuzione della i. erano prevalentemente di natura anatomica: il ridotto calibro del canale cervicale, le ridotte dimensioni della cavità uterina e la difficoltà della sua distensione a causa dell'elevato spessore e

della natura muscolare delle sue pareti, il facile sanguinamento delle mucose endocervicali ed endometriali.

È negli anni '80 che il miglioramento delle strumentazioni e delle tecniche di esecuzione hanno conferito alla i. una semplicità di esecuzione a livello ambulatoriale, la accettabilità da parte della paziente, la buona sicurezza e la elevata affidabilità diagnostica. Tutto ciò ha determinato delle profonde modificazioni nella realtà clinica, e attualmente la metodica isteroscopica si sostituisce alle tradizionali tecniche di valutazione della cavità uterina (*curettaggio*) e ad alcune procedure chirurgiche sull'utero (come la *metroplastica* per l'utero setto): l'i. è cioè divenuta una tecnica chirurgica vera e propria.

ISTEROSCOPIA DIAGNOSTICA

Strumentazione

La esecuzione della i. richiede particolari strumenti appositamente concepiti.

Sistema ottico

Storicamente, lo strumento che ha determinato la diffusione della tecnica, racchiudendo in un telescopio ottico di ridotta sezione tutte quelle caratteristiche di visione in grado di renderlo idoneo all'agevole superamento del canale cervicale e alla corretta valutazione delle strutture endouterine, è stato il microcolpoisteroscopia di Hamou (fig. 1). Tale strumento presenta un diametro di 4 mm e una lunghezza di 25 cm, un ampio angolo di campo (90°) e una visione foro-obliqua di 30°. Tramite appositi prismi ottici, è possibile ottenere con tale strumento ingrandimenti che vanno da $\times 1$ a $\times 150$ (Hamou, 1983). A fianco a tale tipo di *telescopio rigido*, ve ne sono altri caratterizzati da *ottiche sottili* (< 3 mm) che, al vantaggio del ridotto calibro, associano però una maggiore fragilità e deteriorabilità ed una minore luminosità e capacità visive (Valle, 1983). Esistono inoltre *ottiche flessibili*: ideali per meglio seguire il decorso del canale cervicale e l'angolazione dei recessi tubarici, a fronte di maggiori costi e di caratteristiche ottiche (luminosità, risoluzione, angolo di campo) inferiori ad ottiche rigide di pari calibro, non sembrano mantenere i vantaggi promessi in termini di facilità di esecuzione della tecnica.

Sistema di illuminazione

L'illuminazione viene fornita tramite una sorgente esterna a luce fredda (alogeno o xenon) e convogliata al sistema ottico tramite cavi a fibre ottiche o a cristalli liquidi. La potenza di illuminazione necessaria deriva dalle condizioni di impiego: 150 watts di potenza sono sufficienti per la diretta visione oculare attraverso l'ottica, almeno 250 watts sono consigliabili con l'impiego di telecamere endoscopiche.



Fig. 1. Isteroscopia diagnostica (microcolpoisteroscopia di Hamou) con isteroinsufflatore per il controllo elettronico dell'erogazione della CO₂.

ISTEROSCOPIA

Sistema di distensione

La cavità uterina è una cavità virtuale, e quindi la sua osservazione ne richiede una adeguata distensione. I mezzi di distensione vengono introdotti dall'esterno attraverso l'intercapedine creata dalla applicazione, intorno al telescopio ottico, di una guaina metallica (camicia diagnostica, del diametro esterno di 5 mm, od operativa, del diametro esterno di 6-7 mm).

I mezzi di distensione utilizzabili in isteroscopia possono essere liquidi o gassosi. In passato largo uso è stato fatto dei mezzi liquidi per la distensione, ad alto peso molecolare (hyskon) od a basso peso molecolare (soluzioni saline, soluzione di glicoso 5%). Impiegando tali mezzi l'erogazione può avvenire semplicemente per caduta libera o tramite siringa connessa con la camicia diagnostica. I mezzi liquidi tuttavia sono stati progressivamente abbandonati nella diagnostica isteroscopica per gli svantaggi da cui sono caratterizzati nella visione endoscopica rispetto ai mezzi gassosi: miscibilità col sangue (per i mezzi liquidi a basso peso molecolare), riduzione dell'ampiezza del campo di visione, alterazione della cromaticità delle strutture osservate, artefatti legati alla fluttuazione di lembi mucosi (effetto alga), etc. (Baggish, 1989). Unico vantaggio offerto da tali mezzi, impiegati con strumenti di recente produzione in grado di garantire un continuo lavaggio, è il mantenimento della visione (pur con i limiti ricordati) anche in presenza di sanguinamento.

Il mezzo di distensione utilizzato oramai d'elezione nell'i. diagnostica è l'anidride carbonica (CO_2). Tale mezzo gassoso è fisiologico per l'organismo (viene rapidamente assorbito) e garantisce la migliore visione endoscopica, poiché non altera in alcun modo l'immagine intrauterina, permettendo di studiare la struttura endometriale nei minimi particolari. Il suo uso, introdotto in endoscopia nel 1972 da Lindemann (1971), ha finalmente consentito di ottenere la visione idonea per il corretto impiego della i. diagnostica. Gli incidenti inizialmente segnalati quando la CO_2 veniva erogata in utero in maniera non controllata sono oramai solamente un ricordo del passato (Porto, 1974), grazie all'adozione di strumenti di erogazione appositamente dedicati per l'impiego in i. (isteroinsufflatori). Tali strumenti sono capaci di erogare la CO_2 con flussi e pressioni regolabili e controllati in maniera automatica, in grado di impedire eventuali pericoli legati alla erogazione del mezzo gassoso.

Le figg. 2 e 3 riportano il quadro fisiologico del canale cervicale e della cavità uterina.

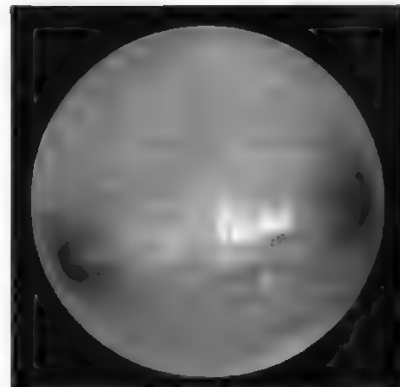
Indicazioni

Inizialmente limitate quasi esclusivamente agli anomali sanguinamenti uterini ed alla infertilità, la diffusione della i. nella pratica clinica ha visto progressivamente estendersi i casi in cui tale indagine si dimostra di estrema utilità.

Anomali sanguinamenti uterini

Qualunque sanguinamento uterino al di fuori della mestruazione rappresenta indicazione alla esecuzione dell'esame isteroscopico (Sieglar, 1983). Le ipermenorree, le menorragie, le metrorragie con estrema frequenza riconoscono come fattore causale la presenza di miomi sottomu-

Fig. 3. Cavità uterina (quadro fisiologico).



cosi, di grossi polipi endometriali, di quadri iperplastici dell'endometrio. A ciò si aggiunge, nel periodo perimenopausale, la possibile presenza di neoplasie endometriali. Ancora più l'i. è indicata quando il sanguinamento si verifica dopo la menopausa: senza necessità di sottoporre la paziente a narcosi, sin dal primo comparire del sintomo sanguinamento, abbiamo la possibilità di verificare se esso è causato da spiccata atrofia dell'endometrio o dalla presenza di patologia endocavitaria (polipi, miomi, iperplasie, neoplasie). Anche lo spotting inter- o perimenziale della giovane età riconosce più spesso quale fattore causale la presenza di patologia di pertinenza isteroscopica (flogosi e poliposi endocervicale od endometriale, miomi sottomucosi) più che un quadro disfunzionale. In ogni caso quindi, prima di procedere con terapie mediche supponendo situazioni disomoni, è opportuno escludere l'esistenza di patologia endouterina per impedire che la ritardata diagnosi ne consenta l'ulteriore evoluzione.

Sterilità o infertilità primaria o secondaria

Sterilità e infertilità possono essere determinate da fattori uterini quali sinechie, miomi sottomucosi, flogosi (fig. 4), poliposi uterina, dismorfismi, metaplasia ossea dell'endometrio, corpi estranei (March, 1983; Mazzon, 1985; Menaglia *et al.*, 1988). Queste lesioni possono interferire sia con il concepimento (ostacolando il transito dei gameti [Gubini *et al.*, 1991], obliterando gli osti tubarici, rendendo inidoneo l'endometrio per l'impianto della gravidanza) che con l'evoluzione della gravidanza (attraverso modificazioni meccaniche, vascolari, peristaltiche della cavità uterina). L'i. è l'unico mezzo diagnostico in grado di evidenziarle con certezza valutando l'eventuale possibile effetto negativo sulla fertilità. Anche le pazienti candidate a tecniche di fecondazione assistita (v.***) debbono effettuare tale valuta-

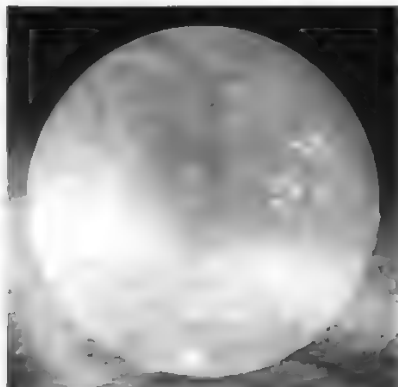
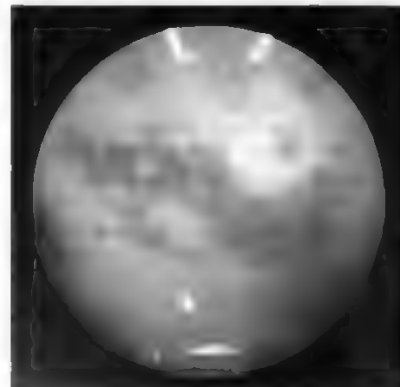


Fig. 2. Canale cervicale (quadro fisiologico). Sulla parete anteriore è presente il decorso del canale.

Fig. 4. Endometrio: area focale di flogosi (spiccata iperemia con punteggiatura bianca riferibile agli sbocchi ghiandolari) a carico della parete anteriore.



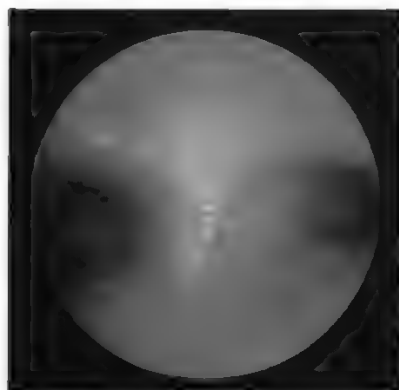
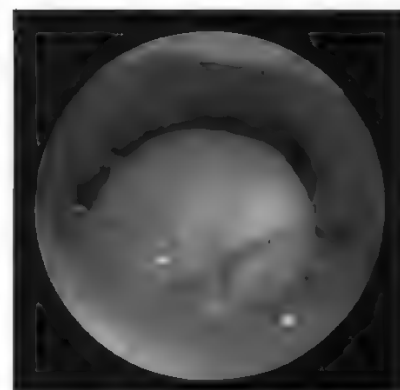


Fig. 5. Cavit  uterina (dismorfismo congenito): presenza di setto uterino che rende duplice la met  superiore della cavit .

Fig. 7. Cavit  uterina: mioma sottomucoso della parete posteriore a totale sviluppo endocavitario.



zione, per verificare la idoneit  della cavit  uterina ad ospitare la eventuale gravidanza (Golan *et al.*, 1992; Dicker *et al.*, 1992).

Dismorfismi uterini

In presenza di dismorfismo uterino (evidenziato tramite isterosalpingografia od ecografia) l'i. (fig. 5) consente di meglio valutare il tipo di alterazione morfologica e la eventuale presenza di concomitante patologia endocavitaria, in modo da avviare la paziente ad un corretto trattamento, che in caso di utero setto sar  rappresentato dalla metroplastica isteroscopica (Itzkowic e Bennett, 1988).

Polipi o fibromi sottomucosi uterini

In presenza di polipi (fig. 6) o di fibromi sottomucosi uterini diagnosticati con altre indagini (ecografia, curettage, isterosalpingografia) l'i., oltre a confermarne con certezza la presenza, consente di determinarne il volume, il numero, i rapporti con la cavit  uterina e con gli osti tubarici. Tali elementi consentono di decidere il trattamento chirurgico (isteroscopico o tradizionale) pi  consono e vantaggioso (Loffer, 1990).

Altri esami anomali

Il ricorso all'i. si rende necessario nel caso di:

a) in presenza di un quadro ecografico endometriale ispessito e/o disomogeneo all'ecografia pelvica, di immagini ecografiche deponenti per dismorfismi o neoformazioni endocavitarie;

b) in caso di citologie endometriali sospette o dubbie;

c) in caso di citologia cervicale con presenza di cellule endometriali od istiociti;

d) in presenza di irregolarit  o difetti di riempimento alla isterosalpingografia;

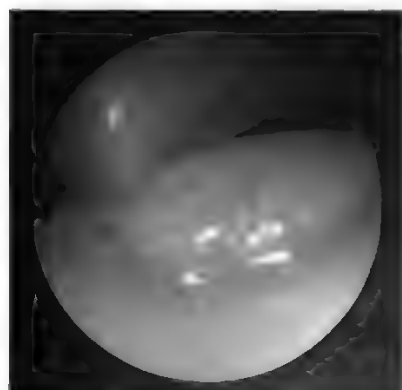
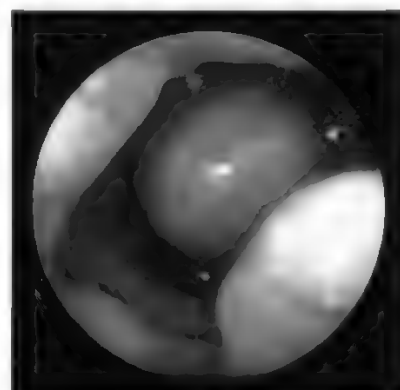


Fig. 6. Cavit  uterina: polipo endometriale adagiato sulla parete posteriore.

Fig. 8. Cavit  uterina sovrvertita dalla presenza di miomi multipli sottomucosi con vario livello di sviluppo intramurale.



e) dopo curettage diagnostico negativo o dubbio.

Miomi uterini

In presenza di miomi uterini, comunque diagnosticati, l'i. consente (oltre alla identificazione di eventuale concomitante patologia endocavitaria) di valutare i rapporti fra il mioma e la cavit  uterina (figg. 7 e 8), al fine di impostare il trattamento chirurgico pi  idoneo (Corson e Brooks, 1991).

«Lost IUD» e corpi estranei endouterini

La diretta visione endoscopica consente di rilevare la presenza in utero di «lost IUD» (fig. 9) o di altri eventuali corpi estranei (frammenti di cannula di Karman, fili di sutura non riassorbiti dopo isterotomia, lamelle di metaplasia ossea, etc.), i loro rapporti con la cavit  e le pareti uterine (eventuale parziale indovamento intraparietale), la coesistenza di processi flogistici o di altra patologia endocavitaria. Nella maggioranza dei casi l'i. consente di passare dalla fase diagnostica a quella terapeutica, permettendo la immediata rimozione ambulatoriale del corpo estraneo per via isteroscopica (tramite micropinze da presa).

Profilassi delle sinechie

Nelle pazienti desiderose di conservare la capacit  procreativa   utile, 1 o 2 cicli dopo un raschiamento endouterino (diagnostico o post-abortivo) od altri traumatismi chirurgici capaci di indurre l'insorgenza di sinechie endocavitarie (isterotomie, miomectomie, chirurgia resettoscopica endouterina), l'esecuzione di una valutazione isteroscopica per evidenziare l'eventuale comparsa di sinechie (fig. 10): la precocit  del controllo consente di identificare le eventuali sinechie ancora «lasse», in via di evoluzione, facilmente lisabili con l'estremit  distale dell'isteroscopio (Finikiotis, 1990).

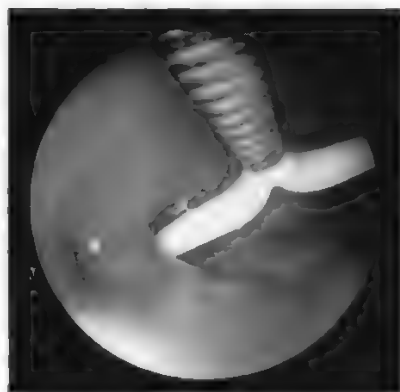
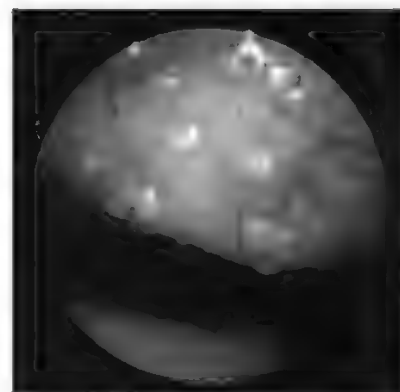


Fig. 9. Cavit  uterina: presenza di dispositivo intrauterino (IUD) con parziale penetrazione del braccetto laterale destro nella parete uterina, a livello del fondo (lateralmente ad esso   visibile l'ostio tubarico destro).

Fig. 11. Endometrio: atrofia cistica (spessore ridotto con visualizzazione dei vasi della componente stromale e rilievi di microcisti superficiali) a carico della parete anteriore



Monitoraggio delle iperplasie endometriali

L'i., eventualmente associata a prelievo biotico, consente di valutare l'effetto terapeutico delle terapie mediche sugli stati iperplastici endometriali o l'eventuale persistenza od evoluzione di essi (Loverro *et al.*, 1994), comprese le eventuali atrofie (fig. 11).

Valutazione prechirurgica del carcinoma endometriale

Anche se la stadiazione della neoplasia endometriale   solamente quella post-chirurgica, ottenibile sul pezzo operatorio, la i. pu  offrire alcuni elementi di valutazione utili per l'orientamento del successivo trattamento chirurgico.

a) *Infiltrazione neoplastica del canale cervicale* (differenziazione fra I e II stadio); la diretta visione dell'endocoll consente di evidenziare la integrit  delle mucose endocervicali o, in caso di presenza a tale livello di materiale neoplastico, se si tratta semplicemente di materiale neoplastico in espulsione dalla cavit  (non infiltrante) o di reale diffusione neoplastica endocervicale (Kohorn, 1988).

b) *Estensione endocavitaria della neoplasia*; la diretta visione endoscopica consente di valutare l'estensione della superficie endometriale interessata dal carcinoma (fig. 12). In base a tale valutazione la neoplasia endometriale confinata alla cavit  uterina (I stadio) pu  venire suddivisa (Gubbini *et al.*, 1988), in I alfa (estensione < 1/3 della superficie endometriale), I beta (estensione compresa fra 1/3 e 2/3 della superficie endometriale), I gamma (estensione superiore ai 2/3 della superficie endometriale). Esistendo un rapporto fra la maggiore estensione superficiale della neoplasia e l'interessamento miometriale e linfonodale, tale elemento pu  assumere il valore di fattore prognostico od orientare sulla maggiore o minore radicalit  del trattamento chirurgico.

Esecuzione dell'esame

In et  fertile, la *fase del ciclo* pi  indicata per la esecuzione dell'esame   la fase proliferativa media (7^o-12^o giorno) sia per evitare il rischio di trovarsi di fronte ad una gravidanza iniziale sia perch  il canale cervicale   pi  permittente (pi  stenotico sarebbe nella fase secretiva), il muco cervicale meno denso (la presenza di muco cervicale pu  ostacolare la visione e il deflusso della CO₂) e la mucosa endometriale pi  sottile.

La paziente non necessita di norma di alcuna preparazione farmacologica o di pratiche anestetiche od analgesiche, ma soltanto di una corretta informazione rassicurante riguardo all'esame che si sta per eseguire.

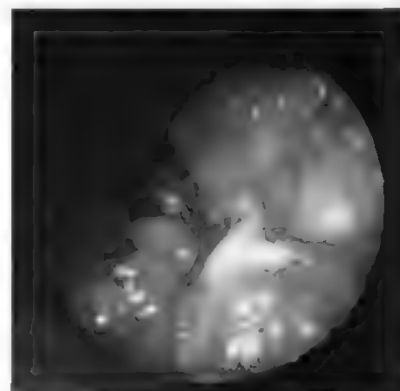
Con la paziente in posizione ginecologica e dopo aver eseguito la visita bimanuale si inserisce lo *speculum* per la corretta visualizzazione della *portio*, che viene detersa con soluzione fisiologica dalle mucosit . A questo punto l'isteroscopia esplora le pareti vaginali e la cervice uterina, e penetra attraverso l'orificio uterino esterno. Sotto costante controllo visivo si procede al transito attraverso il canale cervicale, angolando appropriatamente lo strumento a seconda della anti- o retroversione del corpo uterino. Tale tempo pu  presentare difficolt  legate alla visione for-obliqua dell'ottica ed alla estremit  aguzza (a «becco di clarino») dello strumento che, se mal manovrato, pu  causare traumatismi, dolore, sanguinamento. A livello dell'istmo si attende qualche istante per consentire alla CO₂ di distendere la cavit  uterina, in modo da penetrare in essa senza il rischio di ledere eventuali formazioni endocavitarie.

Raggiunta la cavit  si procede alla esplorazione panoramica di essa, soffermandosi con visione pi  ravvicinata in caso di lesioni patologiche. Sempre vanno visualizzati gli



Fig. 10. Cavit  uterina estese sinechie che obliterano la cavit  destra

Fig. 12. Endometrio: neoplasia endometriale diffusa



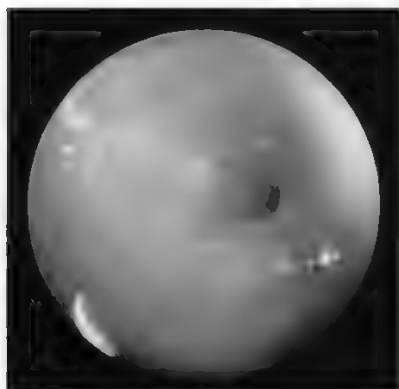


Fig. 13. Ostio tubarico sinistro (quadro fisiologico).

osti tubarici (fig. 13), anche in età senile, in modo da garantire la completa esplorazione della superficie endometriale, anche dei recessi tubarici. Durante la estrazione dello strumento si provvede ad una rivalutazione del canale cervicale.

Inutile è l'ausilio della pinza da collo: necessaria nel transito attraverso il canale cervicale durante tecniche cieche (*curettage*, posizionamento di IUD, etc.) in quanto consente di rettilineizzare parzialmente l'angolazione collo-corpo, di nessun ausilio è nella i. in quanto la costante visione consente allo strumento di seguire la direzione dell'endocollo, superando anche quegli ostacoli (legati a particolari angolazioni del canale) che con le tecniche «cieche» vengono erroneamente interpretati come stenosi.

Correttamente condotto, l'esame isteroscopico ha una durata media di circa 2 minuti, con un consumo di CO₂ di 100-200 ml.

Terminata l'indagine, prima di inviarla al proprio domicilio, la paziente viene tenuta ancora 2-3 minuti sdraiata sul lettino per consentire il parziale riassorbimento della CO₂, eventualmente transitata attraverso le salpingi, al fine di prevenire l'insorgenza di riflesso frenico.

Controindicazioni

1) La presenza di *flogosi pelviche* (PID; *Pelvic Inflammatory Disease*) in atto o recenti viene considerata una delle poche controindicazioni assolute alla esecuzione della i., per il rischio di riacutizzazione o disseminazione flogistica determinata dal mezzo di distensione (Valle, 1983); è stata peraltro segnalata anche la rottura di sactosalpinge in seguito a i., probabilmente per sovradistensione da mezzo di distensione. Nessuna rilevanza hanno invece in tal senso le infezioni vaginali: nullo si è dimostrato il rischio di indurre una infezione ascendente con l'esecuzione dell'i.

2) La *gravidanza in atto* viene considerata controindicazione all'esame in quanto il timore che l'indagine possa essere in qualche modo lesiva sulla gravidanza si associa in queste pazienti alla inutilità diagnostica; si tratta tuttavia di controindicazione relativa: l'i. viene impiegata per la rimozione di *lost IUD* in gravidanza (Hucke *et al.*, 1991) e l'isteroscopia è stata impiegata anche per prelievo di villi coriali (Mencaglia, 1986) e fetoscopia.

3) La presenza di *cancro cervicale invasivo* già diagnosticato controindica l'esecuzione della i.: l'indagine nulla aggiungerebbe alla diagnosi già nota, e avverrebbe in situazione di maggior rischio, dovendo attraversare strutture profondamente infiltrate da neoplasia.

4) Il *sanguinamento in atto* rappresenta solamente un ostacolo alla visione isteroscopica, ma non controindica la sua esecuzione: ovviamente utile può essere differire l'indagine al termine del sanguinamento, ma se questo non è

possibile l'i. può venire regolarmente eseguita. Controindicazione può venire considerata invece la *mestruazione in atto*, che unisce alla difficoltà di visione (data dal sanguinamento) e di interpretazione diagnostica (per la presenza di lembi endometriali necrotici in espulsione) la maggiore possibilità di diffondere lembi endometriali in sfaldamento attraverso le salpingi.

5) Alcune *cardiopatie* possono rappresentare controindicazione relativa all'i.: talune valvulopatie potranno richiedere una profilassi antibiotica, e massima attenzione dovrà essere posta in caso di coronaropatie (per l'eventuale stimolo doloroso indotto dall'esame) o di alcuni disturbi del ritmo (per gli effetti su di essi, dati dalla possibile stimolazione vagale).

Non controindicano l'i. la condizione di *virgo* (in tal caso, quando non possibile l'esposizione della *portio* con l'apposito *speculum*, si procederà all'esame previa vaginoscopia) o l'esistenza di stenosi vaginali, la nulliparità, le stenosi cervicali diagnosticate con altri esami (che spesso all'i. si rivelano solamente angolazioni del canale o sinechie facilmente superabili o lisabili dall'isteroscopia).

Effetti collaterali

1. *Dolore pelvico crampiforme*. – Dovuto prevalentemente alla distensione della cavità uterina, generalmente può essere paragonabile a quello mestruale e scomparire in pochi minuti; in caso di particolare intensità o persistenza, può essere controllato con la somministrazione di antiprostaglandinici.

2. *Dolore scapolare*. – È causato dal passaggio della CO₂ attraverso le tube, con successiva raccolta sottodiaframmatica al momento della ripresa della posizione eretta. La presenza del gas in tale sede irrita le terminazioni nervose del nervo frenico con insorgenza di dolore riflesso in sede scapolare (*reflesso frenico*). Tale dolore può essere prevenuto riducendo il passaggio transtubarico della CO₂ (bassa pressione e basso flusso di erogazione, breve durata dell'esame) e tenendo distesa la paziente per qualche minuto una volta terminato l'esame, per favorire il riassorbimento peritoneale della CO₂.

3. *Sanguinamento*. – I microtraumi indotti dal transito dello strumento possono indurre sanguinamento, che tuttavia è sempre di scarsa entità (stillicidio ematico) e della durata di pochi giorni.

4. *Parestesie e tetania agli arti*. – Pazienti con spiccato stato ansioso possono mantenere per tutta la durata dell'esame una respirazione veloce e superficiale: questa può comportare modificazioni metaboliche che, in taluni casi, porta a parestesie o addirittura ad una condizione di tetania degli arti superiori. Tale situazione può venire prevenuta o controllata semplicemente con il ripristino di atti respiratori di normale frequenza e profondità.

Complicanze

1. *Lesioni iatrogene*. – L'estremità distale, aguzza (a «becco di clarino») dell'isteroscopia, se manovrata in maniera non corretta, può divenire estremamente lesiva, capace di determinare lesioni iatrogene che vanno dalla semplice lesione delle mucose alla penetrazione nel miometrio, sino alla perforazione uterina vera e propria (Valle, 1983). Di norma tali lesioni si accompagnano solamente a dolore e sanguinamento, con ostacolo alla visione ed alla corretta valutazione diagnostica. Anche in caso di lesioni a tutto spessore, data la localizzazione prevalentemente mediana e quindi relativamente avascolare, generalmente non si verificano sequele clinicamente rilevanti.

2. *Infezioni*. – Infondato si è rivelato il timore che la esecuzione della i. possa determinare l'insorgenza di flogosi

endometriali tramite trasporto di germi patogeni presenti nel canale vaginale (meccanismo ascendente); è tuttavia possibile che l'isteroscopia (per una non corretta procedura di disinfezione e manutenzione) possa divenire veicolo di trasmissione di infezione da una paziente all'altra.

3. *Disseminazione di cellule neoplastiche.* — Il timore di disseminazione di cellule neoplastiche non sembra trovare conferma nelle varie casistiche in termini di aumento di insorgenza di metastasi, o di più frequente positività del lavaggio peritoneale o di ridotta sopravvivenza in pazienti con cancro endometriale che hanno eseguito un'i. (Romano *et al.*, 1986).

4. *Embolia gassosa.* — Tale complicanza, anche con esiti mortali, è stata segnalata nelle fasi iniziali dell'impiego della isteroscopia, quando venivano impiegati per la erogazione della CO₂ apparati non idonei, con erogazione non controllata o eccessiva. Unica condizione per scongiurare tale pericolo è l'impiego di apparecchiature appositamente dedicate (isteroinsufflatore).

5. *Sanguinamento.* — Un profuso sanguinamento, diverso da quello descritto come possibile effetto collaterale, può essere la conseguenza di lesioni iatrogene indotte durante l'indagine.

6. *Riflesso vagale.* — È la complicanza più temuta, ma per fortuna estremamente rara. Determinata di norma dalla stimolazione indotta dal passaggio dell'isteroscopia attraverso l'istmo (ove maggiore è il numero di terminazioni nervose), può essere favorita da quei fattori che aumentino il traumatismo a tale livello (errata tecnica di esecuzione, stenosi istmica). V. SINCOPE, *sindrome vaso-vagale*.

ISTEROSCOPIA OPERATORIA

La diffusione della tecnica diagnostica isteroscopica ha consentito di evidenziare quale sia la reale incidenza della patologia endocavitaria in numerose situazioni cliniche (anomalie sanguinamenti uterini, infertilità, etc.). Tutto ciò ha stimolato i tentativi di utilizzare la stessa via (isteroscopica) anche per il trattamento di tali forme di patologia. I tentativi iniziali vennero eseguiti con le strumentazioni allora disponibili (camicia operativa da 7 mm, microstrumenti flessibili introdotti in cavità uterina attraverso un apposito canale operativo), ma consentivano una limitata possibilità di impiego chirurgico dell'isteroscopia. In seguito, grazie all'impiego in cavità uterina dello YAG-laser e soprattutto di strumenti di derivazione urologica (Blandy, 1978; Neuwirth e Amin, 1976) (resetoscopia), la chirurgia isteroscopica ha avuto un notevole sviluppo, sino a raggiungere la attuale condizione di reale tecnica chirurgica, caratterizzata da una propria dignità clinica e da una sempre maggiore diffusione, non più assimilabile ai virtuosismi chirurgici di pochi operatori.

Chirurgia isteroscopica tradizionale

Si esegue utilizzando una apposita camicia operativa (generalmente del calibro di 7 mm) caratterizzata dalla presenza di un canale operativo, attraverso il quale si possono inserire vari strumenti flessibili, quali una pinza da biopsia o una da presa o delle microforbici, cateteri ed elettrodi per la coagulazione. Tale strumentazione (fig. 14) può venire impiegata utilizzando per la distensione sia la CO₂ che i mezzi liquidi (in caso di insorgenza di sanguinamento che non può essere arrestato) (Bagush *et al.*, 1989).

Con questo tipo di strumenti possono venire eseguiti numerosi interventi: rimozione di *lost-IUD* o di altri corpi estranei, ablazione di miomi, biopsie mirate endocervicali ed endometriali, sinectomie, polipi uterini, anomi endocavitari, cateterizzazione tubarica (fig. 15), setti uterini.

Tale tipo di chirurgia può in molti casi essere eseguita

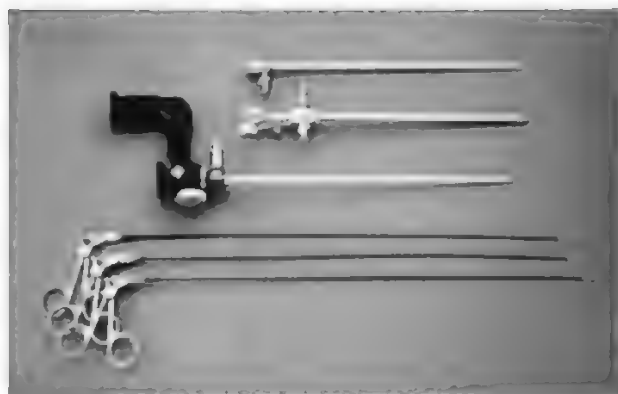


Fig. 14. I. operatoria tradizionale: microcolpoisteroscopia di Hamou (con camicia diagnostica ed operativa) ed il corredo di micropinze flessibili.

ambulatoriamente, eventualmente tramite l'impiego di forme di anestesia locale, in quanto assai spesso l'unico stimolo doloroso da superare è rappresentato dal superamento dell'istmo uterino con lo strumento chirurgico, mentre la vera procedura chirurgica non comporta stimolazione dolorosa (rimozione di *lost-IUD*, biopsie mirate, polipectomie).

La chirurgia eseguita con tali strumenti tuttavia non consente di esprimere tutte le potenzialità della chirurgia isteroscopica, a causa dei limiti determinati dagli strumenti (micropinze) impiegati: i polipi affrontabili con tali strumenti debbono essere di dimensioni limitate (< 2 cm) e con una base pedunculata, sempre pedunculati e con dimensioni ancora minori debbono essere anche i miomi affrontabili per tale via. Inoltre l'insorgenza di lieve sanguinamento, spesso presente durante l'intervento, richiede il ricorso ad un mezzo liquido per la distensione; normalmente tuttavia le camicie operative sono caratterizzate solamente da un canale di immissione del liquido in cavità (lo stesso impiegato per la CO₂), e frequente è quindi la possibilità di disturbo alla visione endoscopica dato dal miscelarsi del sangue col liquido impiegato. Recentemente la disponibilità di camicie operative caratterizzate dalla possibilità di impiegare mezzi liquidi erogati con un sistema di lavaggio in continua ha notevolmente migliorato le possibilità di visione e quindi di conduzione degli interventi chirurgici eseguibili con tale tipo di strumenti (ACOG, 1992).

Nonostante i suoi limiti, tale tipo di chirurgia rappresenta ancora una delle forme di i. operatoria fra le più diffuse,

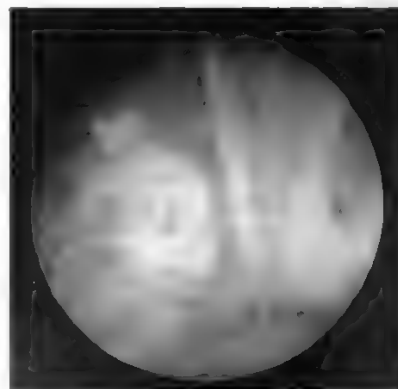


Fig. 15. I. operatoria tradizionale: cateterizzazione tubarica.

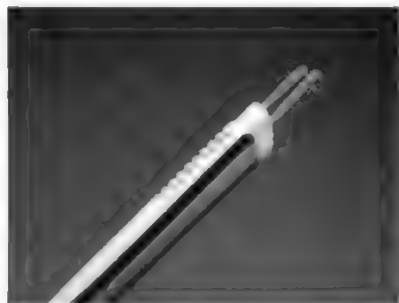


Fig. 16. Chirurgia resettoscopica: estremità distale del resettoscopio di Iglesias e dell'ansa termica.

data l'estrema efficacia in alcuni tipi di patologia (basti pensare alle sinechiolisi, validamente effettuate semplicemente con l'estremità distale dell'isteroscopia diagnostica, spesso nel corso della stessa seduta diagnostica ambulatoriale) e l'immediatezza dell'atto chirurgico, che diviene subito conseguenziale al momento diagnostico. Tale chirurgia inoltre rappresenta un utile momento di passaggio, nella maturazione di ogni isteroscopista, fra l'applicazione delle capacità diagnostiche dell'i. e l'apprendimento delle tecniche chirurgiche più complesse, quali quelle resettoscopiche.

Chirurgia isteroscopica resettoscopica

Un notevole impulso alle possibilità chirurgiche della isteroscopia è stato determinato dall'impiego di strumenti di derivazione urologica (resettoscopi), assai più efficaci nel trattamento della patologia endouterina (De Cherney e Polan, 1983).

Le caratteristiche comuni dei resettoscopi utilizzabili in campo ginecologico sono:

1) la possibilità di utilizzare un elettrobisturi (ansa termica [fig. 16]) sotto diretto e costante controllo visivo, in modo da poter affrontare la patologia endocavitaria in maniera più efficace di quanto concesso dalla chirurgia isteroscopica tradizionale, eseguita con strumenti meccanici;

2) l'impiego di un mezzo liquido per la distensione della cavità uterina (che si rende necessario per consentire il mantenimento della visione anche in presenza di sanguinamento o delle fumosità derivanti dall'impiego dell'energia elettrica, e per ottenere un effetto refrigerante sulle strutture sottoposte all'azione termica dell'energia elettrica), erogato con un sistema di lavaggio in continua (fig. 17), necessario per il costante allontanamento dalla cavità ute-



Fig. 17. Chirurgia resettoscopica: resettoscopio connesso con pompa elettronica per il controllo automatico della erogazione del mezzo liquido di distensione.

rina (della volumetria di 5-10 ml) del liquido reso torbido per il miscelarsi con esso di sangue.

Fondamentalmente il resettoscopio è costituito da:

- a) un'ottica con calibro da 2,7 a 4 mm e visione variabile da 0° a 30°;
- b) da diverse anse da taglio, da coagulazione e da vaporizzazione di diverse forme e dimensioni, idonee alle diverse necessità richieste dal tipo di chirurgia da eseguire;
- c) da un sistema (elettrotomo) meccanico che governa il movimento di avanzamento e retrazione dell'ansa termica;
- d) da una camicia interna per l'irrigazione con il liquido;
- e) da una camicia esterna per la fuoriuscita del mezzo liquido.

Per primo venne utilizzato il resettoscopio sottile di Haliez (1988) (di 6,3 mm di diametro), grazie al quale venne iniziata una più estesa chirurgia endouterina, affrontando finalmente tutte le neoformazioni endocavitarie (polipi e miomi) indipendentemente dalle caratteristiche della base di impianto (pedunculata o sessile). Il ridotto calibro dello strumento tuttavia determinava ancora dei limiti: la sottile ottica (2,7 mm) aveva luminosità e campo di visione ridotti, la esigua sezione dei canali di immissione e deflusso del mezzo liquido di distensione rendeva più difficoltoso il mantenimento della continuità del lavaggio, il piccolo diametro dell'elettrodo tagliente richiedeva lunghi tempi chirurgici nella asportazione di neoformazioni voluminose. Tale strumento mantiene ancor oggi un suo valore nel trattamento della patologia endocervicale o di piccole patologie endocavitarie, grazie proprio al suo ridotto calibro che spesso consente la sua introduzione ed il suo impiego in ambito ambulatoriale (McLucas, 1991).

I resettoscopi di calibro maggiore, tipo quello di Iglesias di 8,7 mm di diametro, hanno ottenuto una più larga diffusione in quanto le generose sezioni dell'ottica (4 mm), dei canali di lavaggio e dell'ansa termica hanno consentito di ovviare ai limiti del resettoscopio sottile, rendendo possibile tale tipo di chirurgia anche ad operatori dotati di minore esperienza. Ovviamente l'impiego di tale tipo di strumenti richiede la dilatazione del canale cervicale con Hegar, e quindi l'anestesia.

Dato l'impiego di energia elettrica, necessariamente il liquido impiegato per la distensione della cavità uterina deve essere non conduttore, in modo che il passaggio di energia e quindi la interazione energia-tessuto avvengano solamente nel punto di contatto dell'ansa termica del resettoscopio con i tessuti. Idonee quindi sono le soluzioni urologiche (soluzione di glicina 1,5% o soluzione sorbitolo-mannitolo), erogate per caduta libera o con aggiunta di pressioni additive (tramite appositi spremisacca o con pompe automatiche che provvedono al mantenimento di costanti flussi e pressioni di erogazione) (Holt e Gilmer, 1995).

Con l'uso dei resettoscopi il campo di applicazione della chirurgia isteroscopica si è notevolmente ampliato, superando quelli che erano i limiti dettati dall'impiego dei primi strumenti meccanici: tutte le formazioni polipoidi possono venire rimosse per via isteroscopica (indipendentemente dalle loro dimensioni o dalle caratteristiche della base d'impianto), è possibile operare anche miomi di grandi dimensioni sia a totale sviluppo endocavitario sia con componente intramurale. Inoltre, le potenzialità chirurgiche del resettoscopio hanno di recente consentito di aggiungere e diffondere un nuovo ed innovativo intervento alla gamma delle possibilità chirurgiche dell'isteroscopia, l'ablazione endometriale (Hulka et al., 1995).

Chirurgia isteroscopica laser

Altro strumento per eseguire chirurgia isteroscopica è rappresentato dal laser a neodimio (Nd:YAG laser) (Donnez et

al., 1990; Garry, 1995). La sonda laser viene introdotta in cavità uterina attraverso il canale operativo dell'isteroscopia (rigido o flessibile), ed impiegata per gli stessi interventi eseguibili con il resettoscopia. Ovviamente, trattandosi di strumento distruttivo (vaporizzazione), non è possibile ottenere materiale per un esame istologico. Inoltre, mediamente i tempi chirurgici sono più lunghi di quelli resettoscopici: tutto ciò, unitamente agli alti costi della strumentazione laser, ha limitato la diffusione di tali tecniche.

Complicanze

Pur essendo caratterizzata da una sicurezza sicuramente superiore a quella delle alternative chirurgiche tradizionali, anche la chirurgia isteroscopica può comportare il rischio di complicanze qui di seguito indicate.

1. *Perforazione dell'utero.* - Può essere determinata nel corso della chirurgia da strumenti smussi (dilatatori di Hegar, isterometro, estremità distale dell'isteroscopia diagnostico in corso di sinechiolisi) o dall'azione dell'ansa termica del resettoscopia. Nel primo caso i rischi derivanti da tale evento sono estremamente ridotti (la lesione generalmente avviene lungo la linea mediana, relativamente avascolare, dell'utero) ed il successivo comportamento terapeutico consiste nella somministrazione di antibiotici ed uterotonici, e nella osservazione per 24 ore. Drammaticamente diverso può essere invece il quadro nel caso in cui la perforazione sia stata determinata dall'ansa termica nel corso della sua azione chirurgica: trattandosi di lesione effettuata con un vero e proprio elettrobisturi, qualunque struttura (anse intestinali, vescica, ureteri, etc.) fosse nel momento della perforazione a contatto con tale zona può venire gravemente lesa (Magos *et al.*, 1991; Pyper e Haeri, 1991; Sturdee e Hoggart, 1991).

2. *Danno termico.* - Anche senza il verificarsi di una perforazione a tutto spessore, la necrosi termica indotta dall'ansa del resettoscopia durante la coagulazione può interessare alcuni millimetri di tessuto al di sotto del punto di contatto con l'elettrodo. Se lo spessore della parete uterina è in quel punto ridotto (come nei recessi tubarici) il danno necrotico può giungere sino alla superficie esterna dell'utero, coinvolgendo le eventuali altre strutture ad essa adiacenti (Holt e Gilmer, 1995).

3. *Sanguinamento.* - È presente con frequenze estremamente variabili nelle varie esperienze pubblicate. Generalmente la sua comparsa può avvenire solamente dopo interventi di chirurgia maggiore (ablazione, miomectomia), in particolar modo se vi sono stati errori di tecnica (danneggiamento del miometrio, irregolarità delle superfici cruentate), e viene di norma controllato con la somministrazione di uterotonici (McLucas, 1991; Garry, 1995).

4. *Infezione.* - È stata raramente segnalata dopo tale tipo di chirurgia (Maher e Hill, 1990; Holt e Gilmer, 1995).

5. *Sindrome da intravasazione.* - Determinata dal massiccio passaggio nel compartimento vascolare del liquido di distensione (per erogazione eccessiva o a pressioni elevate), può insorgere drammaticamente (edemi diffusi, edema polmonare, cerebrale) nel corso dell'intervento per lo scompenso determinato dalla ipervolemia così indotta. Alla ipervolemia acuta consegue anche la emodiluizione, con iponatremia ed ipopotassiemia che possono concorrere (se non adeguatamente identificate e corrette) all'aggravamento della sindrome (Magos *et al.*, 1991; Sturdee e Hoggart, 1991; Dwyer *et al.*, 1991).

Tipo di intervento

La chirurgia isteroscopica, così come la diagnostica, deve essere eseguita nella fase proliferativa media del ciclo. Quando ciò non sia possibile può essere utile la sommini-

strazione di farmaci (danazolo, analoghi del GnRH) che consentano di ottenere una ipotrofizzazione dell'endometrio sino all'intervento (Brooks *et al.*, 1991).

Gli interventi isteroscopici di maggiore difficoltà (ablazione endometriale, miomectomie con componente intramurale) richiedono sempre un pretrattamento di 3 mesi con analoghi del GnRH, al fine non solo di ipotrofizzare l'endometrio, ma anche di ridurre le dimensioni del mioma da trattare e di indurre una diminuzione della vascolarizzazione uterina, utile per ridurre il rischio di intravasazione del mezzo liquido impiegato per la distensione (Golan *et al.*, 1993).

Mediamente gli interventi isteroscopici hanno una durata di pochi minuti (generalmente non superiore ai 20 minuti), richiedono una ridotta degenza post-operatoria (in caso di intervento eseguito in narcosi, la paziente può venire dimessa dopo poche ore) con rapido recupero da parte della paziente. La riparazione della cavità avviene in tempi rapidi, senza aree cicatriziali della parete che possano richiedere lunghi tempi di rispetto prima di affrontare successive gravidanze (come avviene invece per la chirurgia tradizionale).

Rimozione di lost IUD o di altri corpi estranei endouterini

In caso di *lost IUD* l'i. consente, oltre ad evidenziare la presenza in utero del dispositivo, di valutare i rapporti dello IUD con le pareti uterine (penetrazione intramurale) e di procedere alla sua rimozione (Hucke *et al.*, 1991). Per tale intervento si procede all'impiego della camicia operativa e, sotto diretto controllo visivo, si introduce in utero attraverso il canale operativo una micropinza da presa con la quale poter afferrare e rimuovere lo IUD. Di norma tale procedura può essere effettuata in ambito ambulatoriale, contestualmente al tempo diagnostico; in caso ciò non sia possibile, per dolore evocato dall'impiego della camicia operativa o dalla parziale incarcerazione dello IUD nelle pareti uterine, la rimozione può richiedere l'esecuzione (sempre con la tecnica descritta) in anestesia.

Biopsia mirata

La valutazione diagnostica isteroscopica può evidenziare aree di patologia endometriale circoscritta, localizzata in punti ove i tradizionali metodi biotici (cannula di Novak, curettage) non potrebbero giungere (recessi tubarici, fondo uterino) o talmente focali da poter sfuggire alle comuni procedure diagnostiche (Marty *et al.*, 1991; Heller *et al.*, 1995). Sotto visione isteroscopica è possibile in tali casi introdurre in cavità uterina una micropinza biotica (attraverso il canale operativo della camicia) con la quale biopsizzare con precisione l'area di patologia focale endometriale. Anche tale procedura spesso può avvenire in sede ambulatoriale, nel corso della comune procedura diagnostica.

Sinechiolisi

In seguito a traumatismi endocavitari e/o a flogosi possono formarsi sinechie nel canale cervicale o a livello istmico o endocavitario. Tali sinechie possono impedire l'esplorazione isteroscopica della cavità uterina, o essere alla base di quadri clinici (sindrome di Asherman [v. ASHERMAN, SINDROME di**], infertilità) (Donnez e Nisolle, 1994). Nella maggior parte dei casi la lisi di esse può avvenire nel corso della stessa i. diagnostica, utilizzando l'estremità distale aguzza dell'ottica per sezionare le sinechie sotto diretta visione (Valle e Sciarra, 1988). Qualora la particolare estensione di esse o la loro consistenza o la localizzazione in sede marginale renda dolorose tali manovre di lisi, la procedura può richiedere (sempre con la stessa tecnica) l'impiego di

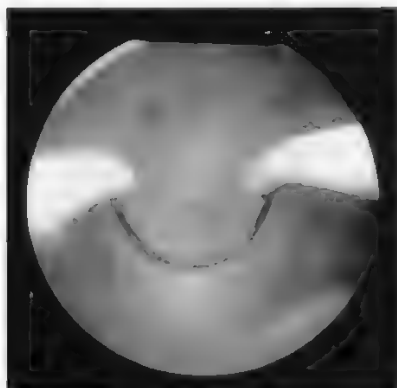
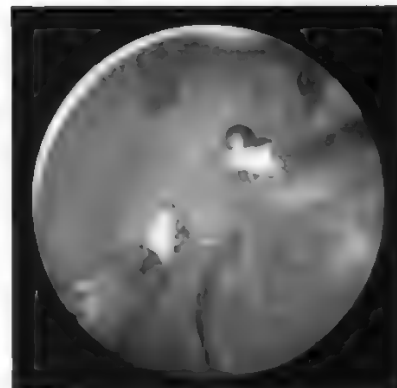


Fig. 18. Chirurgia resectoscopica: resezione di polipo endometriale della parete posteriore (visione iniziale).

Fig. 20. Chirurgia resectoscopica: miomectomia (visione iniziale).



anestesia. Solamente in rari casi la particolare consistenza o localizzazione delle sinechie richiede l'impiego di microforbici o del resettoscopio. In presenza di un quadro aderenziale particolarmente esteso, in cui vengano a mancare i punti di riferimento visivo endocavitario, può essere utile eseguire la sinechiolisi sotto controllo ecografico che possa orientare l'azione chirurgica identificando la posizione dello strumento rispetto alla rima endometriale ed alle pareti uterine, al fine di prevenire la possibilità di una perforazione uterina.

Polipectomia

I polipi uterini, endocervicali od endometriali (figg. 18 e 19), oramai trovano nella chirurgia isteroscopica il trattamento d'elezione. Qualunque siano le dimensioni del polipo o le caratteristiche della sua base d'impianto, il resettoscopio consente la loro rimozione tramite una progressiva frammentazione eseguita con ripetuti passaggi dell'ansa termica, sino a constatare la completa exeresi della formazione. Il materiale così rimosso rimane idoneo per la valutazione anatomico-patologica (minimo è l'effetto termico sui frammenti), e la possibilità di eseguire l'intervento sotto costante controllo visivo riduce al minimo il rischio di inutili traumatismi endocavitari che possano determinare l'insorgenza di sinechie post-chirurgiche. Di norma tale intervento richiede la narcosi della paziente (in particolar modo per la necessità di dilatazione cervicale per l'introduzione in cavità del resettoscopio); tuttavia in caso di poliposi endocervicale o di beanza istmica, l'impiego del resettoscopio sottile ne consente l'esecuzione in ambito ambulatoriale (Brooks *et al.*, 1989; Loffler, 1990; Loffler, 1995).

Miomectomia

La presenza di miomi sottomucosi può venire utilmente affrontata con la chirurgia isteroscopica (figg. 20 e 21). I miomi a totale sviluppo endocavitario, indipendentemente dalle loro dimensioni, possono venire agevolmente rimossi tramite chirurgia resectoscopica, similmente a come avviene per i polipi (Donnez *et al.*, 1992; Neuwirth, 1995). Nel caso che il mioma presenti una più o meno estesa componente a sviluppo intramurale, è richiesta una accurata valutazione prechirurgica (isteroscopica, ecografica, clinica) che consenta di accertarne la reale operabilità per tale via. A tale scopo è particolarmente importante la valutazione del *margine libero miometriale*, cioè dello spessore di miometrio parietale esistente fra la parte più profonda del mioma e la superficie esterna uterina (tale margine usualmente deve essere non inferiore ad 1 cm).

Una possibilità nel caso di significativo sviluppo intramurale del mioma è rappresentata dal *trattamento in due tempi*: con il primo intervento resectoscopico si procede alla rimozione della componente intracavitaria del mioma, lasciando in sede la parte intramurale. Tale porzione residua, per il ripristino spaziale delle fibre muscolari miometriali, viene in breve tempo (di norma nel corso di 20-30 giorni) espulsa in cavità uterina, e rimossa quindi con un secondo intervento resectoscopico.

Nel caso si desideri effettuare la rimozione anche della componente intramurale in un unico tempo chirurgico, è utile effettuare tale manovra tramite *enucleazione con ansa fredda* (Mazzon, 1995), in modo da ridurre i rischi derivanti da una eventuale perforazione con ansa termica in azione e limitare i danni sulle strutture miometriali limitrofe (a tutto vantaggio della conservazione dei meccanismi emo-

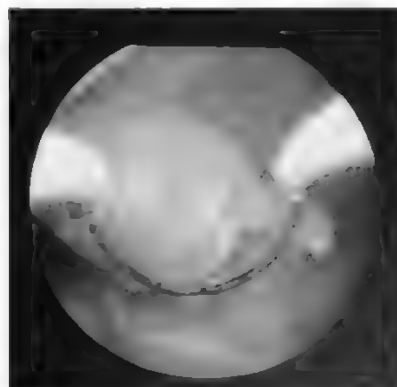
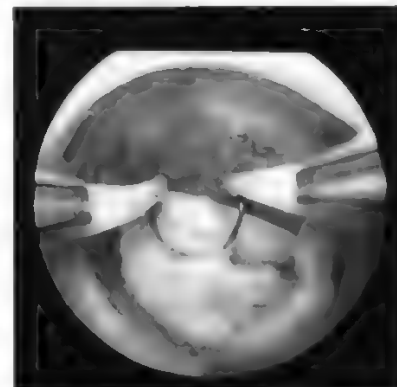


Fig. 19. Chirurgia resectoscopica: resezione di polipo endometriale della parete posteriore (visione al termine della sezione).

Fig. 21. Chirurgia resectoscopica: miomectomia (progressiva asportazione del mioma con ansa termica).



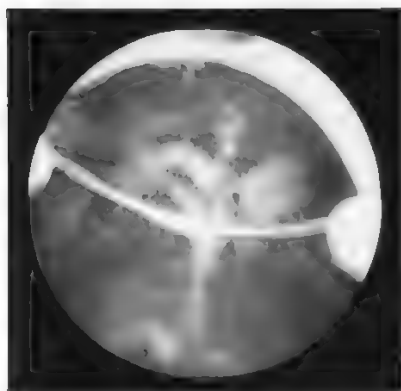
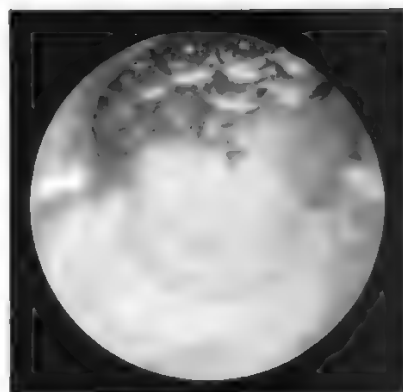


Fig. 22. Chirurgia re-settoscopica: metroplastica resettoscopica per utero setto (visione iniziale dell'apice del setto).

Fig. 24. Chirurgia re-settoscopica: ablazione endometriale (primo solco, con identificazione del miometrio).



statici miometriali, della riparazione della *fovea* sede del mioma senza intervento di fenomeni di fibrosi, della conservazione della funzionalità miometriale ai fini dell'annidamento e dell'evoluzione delle eventuali successive gravidanze).

Cateterizzazione tubarica

Tramite il canale operativo della camicia dell'isteroscopia è possibile introdurre in cavità uterina un sottile catetere. Questo può venire impiegato per una cromosalpingoscopia selettiva, o per la disostruzione dell'ostio tubarico o per eseguire tecniche di fecondazione assistita (GIFT) per via isteroscopica (Golan *et al.*, 1992; Dicker *et al.*, 1992).

Metroplastica

Per l'utero setto, oramai la metroplastica isteroscopica (figg. 22 e 23) è divenuto l'intervento d'elezione, togliendo ogni validità ai corrispettivi interventi laparotomici (Daly *et al.*, 1989; Zhioua *et al.*, 1993). Sotto visione diretta, tramite microforbici o con l'ansa del resettoscopio o con il laser, si procede con semplicità alla sezione del setto nel suo punto mediano (avascolare) sino al raggiungimento dei fasci miometriali, ove possibile sino ad ottenere la completa rettilinearizzazione del fondo (l'eventuale prominenza residua non comporta effetti negativi sull'esito delle gravidanze, in quanto costituita solamente da tessuto muscolare ben vascolarizzato). Per una diagnosi differenziale di certezza nei confronti dell'utero bicornue, la metroplastica deve essere preceduta (anche nel corso della stessa seduta operatoria) dalla valutazione celioscopica della morfologia esterna del fondo uterino.

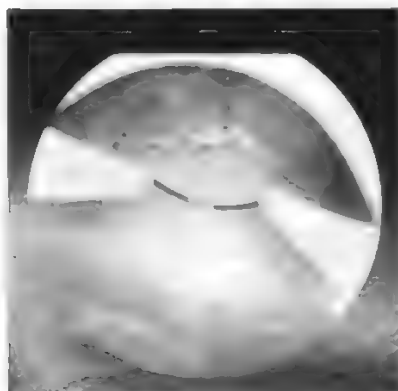


Fig. 23. Chirurgia re-settoscopica: metroplastica resettoscopica per utero setto (progressiva sezione del setto tramite ansa termica).

Ablazione endometriale

È senza dubbio il più innovativo fra gli interventi eseguibili per via isteroscopica, non avendo corrispettivi nella chirurgia tradizionale. Consiste nella distruzione dell'endometrio per tutta la sua profondità (a tale scopo si asportano anche i primi 2-3 mm di miometrio, per avere la certezza di asportare anche gli sfondati ghiandolari profondi) e per tutta la sua estensione. Tale scopo può essere raggiunto con *tecniche di rimozione* (utilizzando la normale ansa da taglio del resettoscopio, ed ottenendo quindi la possibilità di esame anatomopatologico dell'endometrio rimosso) (Mayos, 1991; Mayos, 1994; Goldrath, 1995; Holt e Gilmer, 1995) o con *tecniche distruttive* (utilizzando il resettoscopio con le anse di coagulazione [Valle, 1995] o vaporizzazione, od impiegando il laser [Garry, 1995; Brill, 1995]). General-

Fig. 25. Chirurgia re-settoscopica: ablazione endometriale (impiego del roller-ball per la distruzione dell'endometrio residuo nei recessi tubarici).

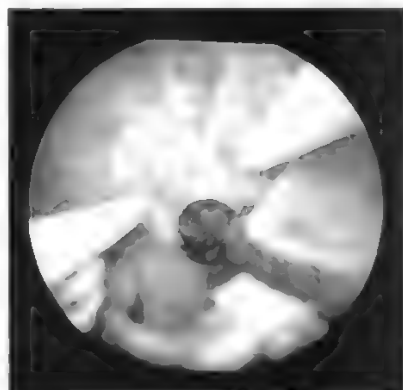
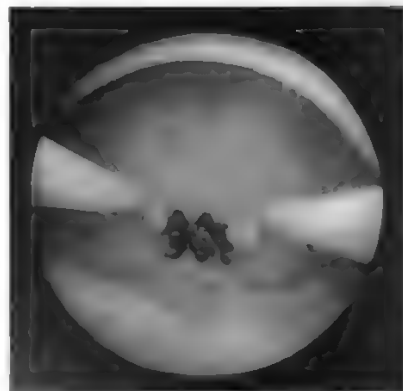


Fig. 26. Chirurgia re-settoscopica: ablazione endometriale (cavità uterina al termine dell'intervento, priva di endometrio ed a superficie regolare), particolare dell'ansa con azione di «vaporizzazione».



mente si preferisce rispettare la mucosa del tratto istmico (riduzione endometriale), al fine di evitare la fusione cicatriziale di esso (che potrebbe determinare ematometra e/o impossibilità di successiva esplorabilità della cavità uterina) e conservare un modesto sanguinamento ciclico mensile. Tale intervento (figg. 24, 25 e 26) trova indicazione nelle pazienti con metrorragie recidivanti, resistenti a terapia medica, nelle quali consente di ottenere (in circa il 90-95% dei casi) la scomparsa duratura della sintomatologia metrorragica, evitando quindi la necessità di ricorrere alla isterectomia.

Bibliografia

- Baggish M. S., *Distending media for panoramic hysteroscopy*, in Baggish M. S., Barbot J., Valle R. F. eds., *Diagnostic and operative hysteroscopy: a text and an atlas*, 1989, Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp. 89-93.
- Baggish M. S., Barbot J., Valle R. F., *Operative hysteroscopy*, in Baggish M. S., Barbot J., Valle R. F. eds., *Diagnostic and operative hysteroscopy: a text and an atlas*, 1989, Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp. 174-178.
- Blandy J. P., *Transurethral resection*, 2 ediz., 1978, Pitman Medical, London.
- Brill A. I., *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1995, **38**(2), 319-345.
- Brooks P. J., Loffer F. D., Serden S. P., *J. Reproductive Medicine*, 1989, **34**(7), 435-437.
- Brooks P. J., Serden S. P., Davos I., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, **164**, 1601-1608.
- Corson S. L., Brooks P. G., *Fertility Sterility*, 1991, **55**, 1041-1044.
- «Credentialing guidelines for operative hysteroscopy. ACOG Committee opinion: committee on gynecologic practice», *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 1992, **39**(3), 246.
- Daly D. C. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1989, **73**, 201-205.
- De Cherney A. H., Polan M. L., *Obstet. Gynaecol.*, 1983, **61**, 392-397.
- Dicker D. et al., *Fertil. Steril.*, 1992, **58**(4), 833-835.
- Donnez J. et al., *Fertil. Steril.*, 1990, **54**(6), 999-1003.
- Donnez J., Nisolle M., *Hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions (Asherman's syndrome)*, in Donnez J., Nisolle M. eds., *An atlas of laser operative laparoscopy and hysteroscopy*, 1994, Parthenon, New York, pp. 305-312.
- Donnez J. et al., «Hysteroscopic myomectomy», *Current Opinion in Obstet. Gynecol.*, 1995, **7**, 311-316.
- Dwyer N., Hutton J., Stirrat G. M., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1993, **100**, 237-243.
- Finikiotis G., *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 1990, **30**(3), 234-235.
- Garry R., *Bailliere's Clin. Obstet. Gynaecol.*, 1995, **9**(2), 317-328.
- Golan A., Ron-El R., Herman A., Soffer Y., Bukovsky I., Caspi E., *Hum. Reprod.*, 1992, **7**(10), 1433-1434.
- Golan A. et al., *Human Reproduction*, 1993, **8**, 450-452.
- Goldrath M. H., *Obstetrics Gynecology Clinics North America*, 1995, **22**(3), 559-572.
- Gubbini G., Linsalata I., Mirra P. et al., *Stadiazione isteroscopica prechirurgica del carcinoma endometriale. Atti del 3° Congresso della Società Italiana per la menopausa*, 1988, pp. 401-403.
- Gubbini G., Tabanelli C., Orlandi C., *Acta Europaea Fertilitatis*, 1991, **22**, 6.
- Hallez J. P., *Acta Europaea Fertilitatis*, 1988, **19**(1), 17-21.
- Hamou J., *Acta Endoscopica*, 1980, **10**, 415.
- Hamou J. E., *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1983, **26**(2), 285-301.
- Heller D. S. et al., «Does endometrial biopsy miss endometrial carcinoma?», *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 1995, **48**, 107-108.
- Holt E. M., Gilmer M. D. G., *Bailliere's Clin. Obstet. Gynaecol.*, 1995, **9**(2), 279-297.
- Hucke J., Campo R. L., Kozlowski P., De Bruyne F., *Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 1991, **51**(1), 31-33.
- Hulka J. F. et al., *J. Am. Assoc. Gynecol. Lap.*, 1995, **2**, 131-132.
- Itzkowic D. J., Bennett M. J., *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 1988, **28**(4), 305-306.
- Kohorn E. L., *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 1988, **15**(1), 73-75.
- Lindemann H. J., *Endoscopy*, 1971, **4**, 194.
- Loffer F. D., *Obstet. Gynecol.*, 1990, **76**, 836-840.
- Loffer F. D., *Removing intrauterine lesions: myomectomy and polypectomy*, in Bieber E. J., Loffer F. D. eds., *The Resectoscope*, 1995, Blackwell, Cambridge, Massachusetts, pp. 168-194.
- Loverro G. et al., *Acta Europaea Fertilitatis*, 1994, **25**(1), 23-25.
- Magos A. L., Baumann R., Lockwood G. M. et al., *The Lancet*, 1991, **337**, 1074-1078.
- Magos A., *Control of menorrhagia by endometrial resection*, in Bieber E. J., Loffer F. D. eds., *The resectoscope*, 1994, Blackwell Scientific, Cambridge, Massachusetts, pp. 214-253.
- Magos A. L., *Endometrial ablation for menorrhagia*, in Studd J. ed.,

- Progress in Obstetrics and Gynaecology*, 1991, **9**, 375-395, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Maier P. J., Hill D. J., *Aust. N. Z. J.*, 1990, **30**, 357-360.
- March C. M., *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1983, **26**(2), 302-312.
- Marty R. et al., *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 1991, **34**(2), 151-155.
- Mazzon I., *Impegno ospedaliero - Sezione scientifica*, n. 1, 1985 (Gennaio-Febbraio), 37-48.
- Mazzon I., *Nuova tecnica per la miomectomia isteroscopica: enucleazione con ansa fredda*, in Cittadini E., Angiolillo M., Perino A., Minelli L., *Atlante di chirurgia endoscopica*, Suppl. Cap. XXXI, 1995, Cofese Ed., Palermo.
- McLucas B., *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1991, **172**(6), 425-431.
- Mencaglia L. et al., *Acta Europaea Fertilitatis*, 1986, **17**(6), 431-439.
- Mencaglia L. et al., *The Cervix*, 1988, **6**, 321-330.
- Neuwirth R. S., Amin H. K., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1976, **126**, 95-99.
- Neuwirth R. S., *Obstetrics Gynecology Clinics of North America*, 1995, **22**(3), 000.
- Pantaleoni D., *Med. Press Circ. Londres*, 1869, **8**, 26.
- Porto R., *Hysteroscopie*, in *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 1974, Paris.
- Pyper R. J. D., Haeri A. D., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1991, **98**, 1049-1054.
- Romano S. et al., *Gynecol Oncol.*, 1992, **44**(1), 116-118.
- Siegler A. M., *Clinic. Obstet. Gynecol.*, 1983, **26**(2), 241-251.
- Sturdee D., Hoggart B., *The Lancet*, 1991, **337**, 1474.
- Valle R. F., *Clinic. Obstet. Gynecol.*, 1983, **26**(2), 253-276.
- Valle R. F., *Bailliere's Clin. Obstet. Gynaecol.*, 1995, **9**(2), 299-316.
- Valle R. F., Sciarra J. J., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1988, **158**, 1459-1470.
- Zhioua F. et al., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1993, Paris, **22**(6), 600-604.

IVANO MAZZON

ITRACONAZOLO; v. ANTIMICOTICI (*446-449); ITRACONAZOLO* (*422-423)**

ITTIOSI [v. vol. VIII, coll. 857-862]

SOMMARIO

Definizione e classificazione (col. 2990). - **Ittiosi volgari isolate** (col. 2991): **Ittiosi volgare autosomica dominante**. - **Ittiosi recessiva X-linked (XLR)**. - **Ittiosi volgari associate** (col. 2993): **Sindrome di Refsum**. - **Deficit multiplo in solfatasi**. - **Deficit di steroidosolfatasi associato ad altri sintomi**. - **Sindrome di Rud**. - **Ittiosi congenite isolate** (col. 2996): **Ittiosi lamellari**. - **Ittiosi epidermolitiche o bollose**. - **Feto arlecchino**. - **Peeling skin syndrome**. - **Ittiosi congenite associate** (col. 3000): **KID syndrome**. - **Condroadipasia puntata**. - **Sindrome di Netherton**. - **Sindrome di Dorfman-Chanarin**. - **Sindrome di Sjögren-Larsson**. - **Ittiosi con tricotiodistrofia** (col. 3004): **HID syndrome (Histrux-like Ichthyosis with Deafness)**. - **IFAP syndrome (ittiosi follicolare, atrichia e fotofobia)**. - **Collodion baby** (col. 3005). - **Dermatosi ittiosiformi** (col. 3006). - **Ittiosi acquisite** (col. 3006). - **Cenni di terapia generale delle ittiosi** (col. 3007).

Definizione e classificazione

Con il termine ittiosi (dal greco ictis = pesce) viene definito un gruppo eterogeneo di dermatosi, quasi tutte ereditarie, dovute ad un disturbo della cheratinizzazione, le quali hanno come segno cutaneo caratteristico la presenza di squame; queste ultime assumono caratteri diversi (colore, spessore, dimensioni, forma, disposizione, aderenza alla cute) a seconda delle varianti cliniche.

Dall'epoca delle prime descrizioni fino ad oggi sono state individuate numerose forme cliniche di ittiosi, presenti sin dalla nascita, associate o meno a segni clinici extracutanei. Pertanto, innumerevoli sono state le classificazioni proposte, basate di volta in volta sull'aspetto clinico, sui sintomi associati, sull'aspetto istologico, su quello fisiopatologico, su quello ereditario.

Recentemente Traupe (1989) ha proposto un nuovo inquadramento delle i. ereditarie basato su due criteri: la presenza o meno della dermatosi alla nascita (i. congenite ed i. volgari, rispettivamente), la presenza o meno di sintomi extracutanei associati (i. isolate e, rispettivamente, i. con associazione).

TAB. I. ITTIOSI EREDITARIE

Gruppo	Malattia specifica	Ereditarietà
1) Ittiosi volgari isolate	a) Ittiosi volgare autosomica dominante b) Ittiosi recessiva X-linked	AD XLR
2) Ittiosi volgari associate	a) Malattia di Refsum b) Deficit multiplo in solfatasi c) Deficit di steroide-solfatasi associato ad altri sintomi d) Sindrome di Rud	AR AR XLR Non nota
3) Ittiosi congenite isolate	a) Ittiosi lamellari — forma autosomica dominante — forme eritrodermiche — forme non eritrodermiche b) Ittiosi bollose o epidermolitiche — eritrodermia ittiosiforme bollosa di Brocq — ittiosi bollosa di Siemens — ittiosi istrice di Curt-Macklin c) Feto arlecchino d) <i>Peeling skin syndrome</i> tipo A	AD AR AR AR AR AR AD AR AR AD AR ?
4) Ittiosi congenite associate	a) <i>Kid syndrome</i> b) Condrodisplasia punctata c) Sindrome di Netherton d) Sindrome di Dorfman-Chanarin e) Sindrome di Sjögren-Larsson f) Sindrome di Tay g) <i>Hid syndrome</i> h) <i>Ifap syndrome</i> i) <i>Peeling skin syndrome</i> tipo B	AD AD, AR, XLR, XLD AR AR AR AR ? ? ?

Tale classificazione (tab. I) sarà seguita in questa esposizione con l'aggiunta di un piccolo paragrafo per le forme ittiosiche non generalizzate e per le forme acquisite.

Ittiosi volgari isolate

Ittiosi volgare autosomica dominante

L'i. volgare è la più frequente fra tutte le varianti: ha un'incidenza di circa 1 su 250 nascite. La trasmissione ereditaria è di tipo autosomico dominante. Non è ancora nota l'etiopatogenesi di questa forma di i.: probabilmente è in causa un'alterazione della *profilagrina*, il più importante componente dei granuli di cheratoialina.

Le manifestazioni cliniche (fig. 1) non sono presenti alla nascita, ma si evidenziano generalmente dopo il sesto mese di vita. L'espressività clinica di questa forma è molto variabile e va da casi molto lievi, in cui si rileva solo una xerodermia diffusa, associata ad ipercheratosi follicolare, a casi con interessamento cutaneo marcato (*uomo alligatore*). Le squame, nella maggior parte dei casi, sono di piccole dimensioni, aderenti, di colorito bruno, disposte soprattutto sulle regioni posteriori del tronco e sulle superfici estensorie degli arti; caratteristicamente sono indenni le pieghe ascellari, come pure possono esserlo le pieghe cubitali e poplitee; nei bambini possono essere interessate la fronte e le guance, aspetto non visibile negli adulti. Oltre alla cheratosi pilare, evidente soprattutto a livello dei gomiti e delle ginocchia, altro segno distintivo dell'i. volgare è la iperlinearità palmar.

Questa forma di i. migliora con il passare degli anni e quasi mai impedisce una vita normale. L'i. volgare ha un'incidenza elevata nel repertorio all'attesa nei soggetti atopici, tanto da costituire in molti casi, sotto l'aspetto di un segno secondario. In alcuni lavori di revisione pubblicati alcuni anni fa, vari autori hanno rilevato nei soggetti con i. volgare un'aumentata incidenza di criptorchidismo.

Per quanto riguarda l'aspetto istologico, al microscopio

ottico, lo strato corneo può essere di normale spessore oppure ortoipercheratosico; lo strato granuloso è assente o molto ridotto; il reperto può variare da zona a zona nello stesso pezzo biotico; spesso si associa a cheratosi follicolare e netta diminuzione delle ghiandole sebacee. Al microscopio elettronico l'anomalia tipica è la scarsità o l'anormalità dei granuli di cheratoialina. Tale reperto la differenzia nettamente dall'i. recessiva legata al cromosoma X.

Ittiosi recessiva X-linked (XLR)

L'i. XLR ha un'incidenza popolazionistica di un caso su 6000 nascite circa (in alcune statistiche 1 su 3000 circa); la trasmissione ereditaria segue la modalità recessiva legata al cromosoma X.

La patogenesi è dovuta ad una diminuzione della produzione di due enzimi: la steroide-solfatasi (STS) e uno dei due isoenzimi della arisolfatasi C, identico molecolarmente all'STS. Tale alterazione è determinata da un errore genomico al livello del braccio corto del cromosoma X (Xp22.3), dove è localizzato il gene dell'STS; tale gene subisce spesso una delezione o una microdelezione. L'insufficiente produzione di STS determina: 1) aumento di colesterolo solfato a livello epidermico, con ritardo nella fisiologica desquamazione cutanea e conseguente accumulo di squame (ittiosi da ritenzione); 2) disturbo del metabolismo degli ormoni maschili, con aumento di LH e DHEAS e diminuzione di DHEA e δ -4-androstenedione; 3) disturbi placentari, nelle donne portatrici, per riduzione della produzione di estrogeni durante la gravidanza, con conseguenti parti difficoltosi; 4) alterazione del tracciato lipoproteico con caratteristico aumento della elettromobilità delle β -lipoproteine, dovuto ad un accumulo di colesterolo solfato nel siero (questo reperto può addirittura sostituire, in caso di dubbio diagnostico, indagini molto più complicate come la dimostrazione del deficit di STS).

I maschi colpiti dall'i. XLR possono presentare segni cu-



Fig. 1. I. volgare.

tanei già alla nascita, consistenti in fine desquamazione diffusa che in seguito lascia spazio alla comparsa delle tipiche squame poligonali brunastre. Questi segni caratteristici si evidenziano sempre entro i sei mesi. Le manifestazioni cliniche interessano quasi tutto l'ambito cutaneo (fig. 2); il viso è risparmiato, ma è sempre colpita la regione preauricolare; le pieghe ascellari, poplitee e anticubitali sono spesso interessate. Il cuoio capelluto presenta desquamazione forforacea.

Oltre ai sintomi cutanei, nella XLR è associato l'interessamento della cornea (piccole opacità non disturbanti il visus) e delle gonadi, con criptorchidismo (fino al 20% in alcune statistiche, contro lo 0,8% atteso). Le donne portatrici possono avere minimi segni di i. alle gambe. Per questa forma di i. è possibile la diagnosi prenatale.

Il quadro istologico della XLR non è diagnostico; si nota ipercheratosi come ortocheratosi, strato granuloso di spessore variabile, lieve acantosi o normale stato malpighiano, normale presenza di ghiandole sebacee eccrine, modico infiltrato perivasale linfocitario; al microscopio elettronico si nota una aumentata sintesi di cheratolina ed una anormale persistenza delle strutture desmosomiali.

Ittiosi volgari associate

Sindrome di Refsum

È una rara malattia che si trasmette secondo un carattere autosomico recessivo. Nella maggior parte dei casi comin-

cia dopo la pubertà, con numerose alterazioni di tipo oculare, neurologico, otorinolaringoiatrico e cardiologico, mentre le manifestazioni cutanee sono più tardive.

Sintomi precoci sono un calo della visione notturna e la instabilità del passo; negli stadi più avanzati, dopo alterni periodi di miglioramento spontaneo e di progressione della malattia, sono apprezzabili un grave deperimento generale con paralisi muscolari e severi sintomi cutanei. Frequenti sono l'anosmia, la retinite pigmentosa, la cataratta, nonché deficit neurosensoriali, diminuzione dei riflessi tendinei ed elevato livello proteico nel liquido cerebrospinale. La morte può sopraggiungere, nei casi misconosciuti e non trattati, per aritmie cardiache e blocco atrioventricolare o del fascio di His. In più del 50% dei casi sono presenti manifestazioni cutanee, che consistono in un'i. non molto marcata, clinicamente simile a un'i. volgare.

I reperti istologici al microscopio ottico sono caratterizzati da una lieve ortoipercheratosi e da diminuzione dello strato granulare; i cheratinociti degli strati basali e soprabassali dell'epidermide appaiono vacuolizzati e contengono numerose goccioline lipidiche; il reperto ultrastrutturale di anormali e giganti mitocondri degenerati è caratteristico di questa sindrome. La patogenesi è legata ad accumulo di acido fitanico nei vari tessuti, dovuto ad un deficit nell'alfa-ossidazione di questa sostanza, e conseguente blocco nella conversione in acido idrossifitanico.

Tenendo presente che l'acido fitanico, non essendo sintetizzato dall'organismo, può essere introdotto solo con gli alimenti, la terapia di queste forme di i. consiste esclusivamente nella dieta priva di derivati del latte e vegetali verdi, poiché l'acido fitanico è un costituente della clorofilla e si accumula anche nei prodotti lattieri. È possibile la diagnosi prenatale di questa sindrome.

V. REFNUM, MALATTIA DI (XIII, coll. 270-277).

Deficit multiplo in solfatasi

Questa rara malattia ad ereditarietà autosomica recessiva comporta gravi sintomi neurologici, ritardo psicomotorio ingravescente, facies caratteristica delle mucopolisaccaridosi con associata epatosplenomegalia e sintomi cutanei consistenti in una lieve i. con i caratteri della i. XLR. La prognosi è grave: la morte interviene entro i dodici anni per peggioramento dei segni neurologici e metabolici. La patogenesi di questa forma è dovuta ad un deficit combinato dei sette tipi conosciuti di solfatasi: in effetti i sintomi clinici sono la somma delle alterazioni che sono presenti nelle sindromi dovute al deficit di una sola di



Fig. 2. I. X-linked.



Fig. 3. I. lamellare.

esse (leucodistrofia metacromatica [v.]; carenza di arisolfatasi A; sindrome di Maroteaux Lamy: carenza di arisolfatasi B (v. LISOSOMALI MALATTIE*), XLR recessiva: carenza di arisolfatasi C, etc.). La particolarità genetica di questa sindrome è data dal fatto che le mutazioni geniche sono a livello di vari cromosomi, dove è situato il gene che codifica per le singole solfatasi.

Deficit di steroidosolfatasi associato ad altri sintomi

L'i. recessiva legata al sesso può, in alcuni casi, associarsi ad altri sintomi, quali ritardo mentale, bassa statura, epilessia e ipogonadismo grave. Alcuni pazienti affetti da questa associazione sono stati studiati a livello cromosomico ed è stato individuata in tutti i casi una traslocazione XY a livello di p22.3 del braccio corto del cromosoma X. I maschi colpiti hanno una sindrome completa e grave mentre le femmine hanno sintomi meno gravi.

L'i. recessiva legata al sesso è stata riscontrata in associazione con la sindrome di Kalmann-de Morsier (ipogonadismo ipogonadotropico ed anosmia; v. KALMANN-DE MORSIER, SINDROME DI [v.*; v.**]) e, in alcune famiglie, in associazione con una stenosi pilorica.

Sindrome di Rud

Questa sindrome ittiosiforme comprenderebbe come sintomi principali uno stato ittiosico, congenito o anche non congenito, ed un ipogonadismo e come altri sintomi quasi sempre associati: deficit mentale e disturbi neurologici (epilessia). Probabilmente si tratta di una sindrome eterogenea, dato che molti dei casi descritti erano in realtà ascrivibili ad altri tipi di i.

Ittiosi congenite isolate

Ittiosi lamellari

Le i. lamellari (fig. 3) sono costituite da un gruppo eterogeneo di i. congenite non bollose (non epidermolitiche), la cui classificazione, ancora provvisoria, si basa sul tipo di ereditarietà, nonché sui reperti ultrastrutturali, enzimatici e biochimici. L'etiologia e la patogenesi non sono ancora note, anche se in alcuni casi è stato dimostrata un'alterazione dell'enzima transglutaminasi K e modificazioni del metabolismo dei lipidi cutanei (tab. II).

La forma autosomica dominante, descritta da Traupe nel 1984, è presente alla nascita con interessamento di tutto il corpo, il quale appare coperto da larghe squame scure, mentre le pieghe sembrano meno compromesse; sono visibili inoltre una pronunciata ipercheratosi plantare ed una rilevante lichenificazione sul dorso dei piedi, delle mani, dei polsi, delle ginocchia e dei malleoli. I pazienti hanno spesso gravi carie dentarie.

Il reperto istologico mostra acantosi e papillomatosi, con zone di iperortocheratosi alternata a paracheratosi.

Le forme autosomiche recessive sono invece note da molto più tempo e possono essere classificate in due grandi gruppi: eritrodermiche e non eritrodermiche.

TAB. II. ITTIOSI LAMELLARI

Tipo	Ereditarietà	Biochimica	Enzima interessato	Microscopia elettronica
Forma dominante	AD	n-alcani ac. grassi liberi	Butirrasi O-glicuronidasi	Inclusioni lipidiche nello stato corneo
Forme eritrodermiche				
A	AR	n-alcani	Glucosidasi	Vacuoli lipidici nel corneo
B	AR	?	?	Depositi di colesterolo nel corneo
Forme non eritrodermiche				
A	AR	?	Butirrasi	Corpuscoli lamellari e vesci- colari
B	AR	?	?	Corpuscoli lamellari diversi dal tipo A
C	AR	?	?	?

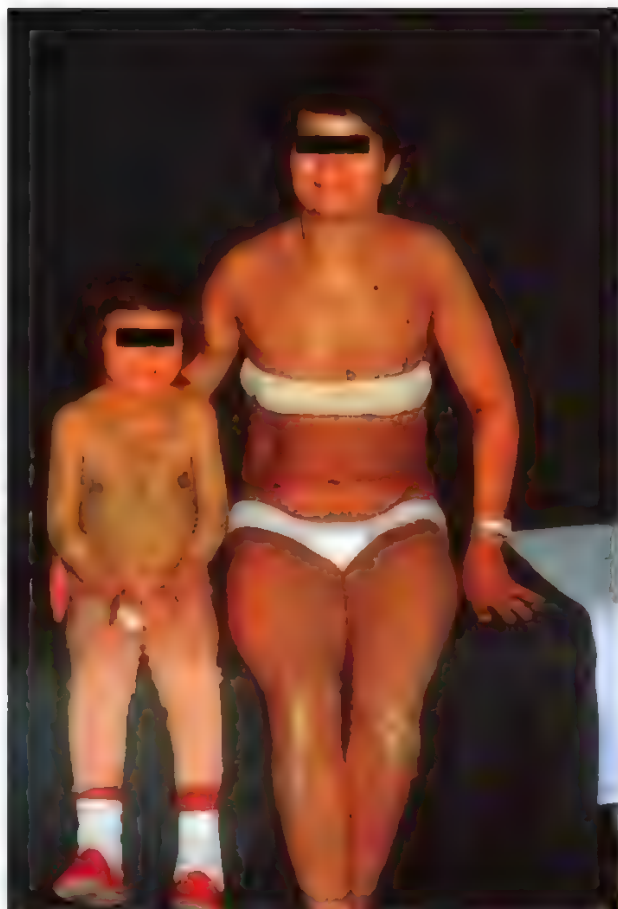


Fig. 4. Eritrodermia ittiosiforme bollosa di Brocq.

La caratteristica clinica principale delle *forme eritrodermiche* è naturalmente l'eritrodermia, che si manifesta sin dalla nascita; alcuni casi possono presentare anche un *collodion baby*. In pochi pazienti l'eritrodermia si attenua in altri invece persiste marcata per tutta la vita. Soprattutto alle pieghe flessorie, ma anche nel resto del corpo, sono visibili delle fini squame traslucide, e soltanto in alcuni pazienti può essere osservata una marcata ipercheratosi palmo-plantare; può essere inoltre presente ectropion.

L'aspetto clinico delle *forme non eritrodermiche* è invece caratterizzato da larghe, piatte squame di colore marrone scuro. Alla nascita può esser presente *collodion baby*, ma non c'è eritrodermia, che non si sviluppa nemmeno successivamente. Anche in queste forme è apprezzabile un'ipercheratosi palmare e plantare, ma generalmente di grado inferiore a quello delle forme precedenti. L'aspetto istologico è simile in tutte queste forme e ricalca quello descritto per la forma dominante.

La diagnosi prenatale è possibile in tempo utile solo per la forma eritrodermica di tipo B e per quella non eritrodermica tipo B; per le altre forme è possibile non prima della ventiduesima settimana di gestazione.

Ittiosi epidermolitiche o bollose

Il gruppo delle *i. epidermolitiche* comprende a tutt'oggi tre distinte entità: l'eritrodermia ittiosiforme bollosa di Brocq (EIB), la *i. bollosa* di Siemens (IBS) e la ittiosi istrice di Curt McKlean. Tali entità sono diverse clinicamente, hanno

tutte una ereditarietà autosomica dominante e si accomunano per il particolare aspetto istologico al microscopio ottico di «ipercheratosi epidermolitica»; in verità al microscopio elettronico l'aspetto istologico non è sovrapponibile, per cui è giustificata la separazione delle tre entità.

1. *Eritrodermia ittiosiforme bollosa di Brocq.* – Alla nascita la cute è eritematosa e presenta zone di scollamento e di lacerazione soprattutto alle pieghe. In seguito, durante il primo anno di vita, compare ipercheratosi diffusa, marcata, più evidente al collo, alle ginocchia e alle gambe; inoltre si evidenziano lesioni bollose in zona di trauma, maggiormente nel periodo estivo (fig. 4). I piccoli malati sono soggetti a piodermiti recidivanti. Il viso è risparmiato, come lo sono spesso le regioni palmoplantari. Con il passare degli anni la formazione delle bolle diminuisce e poi scompare, mentre l'ipercheratosi si fa più compatta, con spesse squame brune, caratteristicamente disposte a strisce trasversali alle pieghe antecubitali e poplitee; persiste l'eritema di fondo.

L'esame istologico al microscopio ottico e al microscopio elettronico è tipico e diagnostico. Lo strato corneo è naturalmente ipercheratosico, lo strato granuloso è ispessito e contiene numerosi granuli di cheratoialina. Le cellule di quest'ultimo strato presentano edema intercellulare e vacuolizzazione perinucleare; le bolle quando presenti si evidenziano a questo livello. Al microscopio elettronico si notano tonofilamenti ammassati intorno al nucleo e anomalie nella giunzione tonofilamenti-desmosoma. Nell'insieme, questo quadro costituisce l'ipercheratosi epidermolitica.

L'eritrodermia ittiosiforme bollosa ha una trasmissione autosomica dominante; a volte in una stessa famiglia sono stati notati genitori con «nevo ipercheratosico epidermolitico» e figli con eritrodermia ittiosiforme bollosa, ma mai il contrario. Ciò fa supporre che nei genitori sia presente una mutazione somatica con estrinsecazione fenotipica in una forma nevica, mentre ai figli è stata trasmessa una mutazione gametica con espressività fenotipica diffusa.

L'etiopatogenesi dell'eritrodermia ittiosiforme bollosa, recentemente chiarita, è dovuta a mutazioni puntiformi dei geni che codificano per le citocheratine 1 e 10, situati nei cromosomi 2 e 17.

2. *Ittiosi bollosa di Siemens.* – Di questa forma, descritta da Siemens nel 1937, soltanto pochi casi in alcune famiglie sono riportati in letteratura. A differenza della forma di Brocq, in questa variante di *i.* non c'è eritrodermia di fondo. Alla nascita è presente ipercheratosi diffusa con formazione di bolle; in seguito (fig. 5) le lesioni ipercheratosiche sono più evidenti al collo, alle braccia, ai glutei, mentre



Fig. 5. *i.* di Siemens.

al dorso, ai gomiti, alle ginocchia e alle grandi pieghe la cute ha un aspetto lichenificato; le regioni palmoplantari sono risparmiata. Caratteristicamente, strisciando il dito sulla cute, si provoca il distacco delle prime assise epidermiche (fenomeno del *mauserung*).

L'aspetto al microscopio ottico e al microscopio elettronico è simile a quello dell'eritrodermia ittiosiforme bollosa, ma le alterazioni interessano le prime assise del granuloso.

Recentemente, l'etiologia di questa forma è stata attribuita a mutazioni del gene che codifica per la citocheratina 2.

3. *Ittiosi istrice di Kurt McKlean*. - Questa forma, estremamente rara, è la più grave tra le forme di i. epidermolitica. La superficie cutanea è interessata in toto, comprese le regioni palmoplantari, da eritema e notevole ipercheratosi a zolle di colorito bruno e grigio; l'aspetto è quello di una pelle di coccodrillo o di pachiderma; anche le unghie sono colpite ed hanno un aspetto distrofico non specifico.

L'aspetto istologico al microscopio ottico, oltre a notevole ipercheratosi ortocheratosica, acantosi e papillomatosi, con aspetti di ipercheratosi epidermolitica, mostra la presenza di cheratinociti binucleati nella percentuale del 10-30%; al microscopio elettronico l'immagine caratteristica è costituita dai tonofilamenti, i quali si assemblano a gusci concentrici interi intorno al nucleo. L'etiopatogenesi di questa forma non è ancora nota.

Feto arlecchino

Il feto arlecchino è tra le più severe forme di i. conosciute. Possono essere interessati entrambi i sessi e nella maggior parte dei casi è stata notata consanguineità tra i genitori. In parecchie famiglie è stata accertata una trasmissione di tipo autosomico recessivo, ma sono frequenti i casi sporadici.

Alla nascita, l'intera superficie corporea appare ricoperta da una dura cotenna cheratosica, che dopo alcune ore si rompe in profonde fessure irregolarmente irradiate e che impedisce la nutrizione e la respirazione; gli arti sono flessi e il volto presenta un aspetto simile a quello di una rana, con gli occhi molto protesi. La maggior parte dei neonati muore entro breve tempo, mentre quelli che sopravvivono sviluppano un'i. lamellare. Il tempestivo intervento con misure generali e il trattamento con etretinato migliorano la prognosi. Il reperto istologico evidenzia iperortocheratosi, con strato granuloso spesso assottigliato.

Peeling skin syndrome

Le descrizioni di questa sindrome nella letteratura dermatologica sono poche; nonostante questo, se ne possono riconoscere un tipo A e un tipo B.

Il tipo A comporta, a volte dalla nascita, desquamazione superficiale (proprio come avviene per un trattamento di *peeling*) a grandi lembi, asintomatica, interessante tutto il corpo, compreso il viso; non c'è modificazione stagionale del quadro clinico. Il reperto istologico consiste in ipercheratosi ortocheratosica o cute normale; la separazione cutanea avviene nella parte bassa del corneo; al microscopio elettronico il distacco delle squame appare avvenire all'interno dei cheratinociti.

Il tipo B si manifesta alla nascita con eritrodermia ittiosiforme congenita, e poi con una desquamazione a grossi lembi con cute modicamente eritrodermica. È presente un notevole prurito. A periodi i capelli crescono poco; a volte queste forme di i. si associa a facilità alle infezioni cutanee e a bassa statura. Dal punto di vista laboratoristico c'è un elevato livello di IgE totali e in alcuni casi è stata evidenziata un'ipercheratosi. Queste caratteristiche associano molto questa forma alla sindrome di Netherton (v. sotto). Somiglianze esistono anche dal punto di vista istologico al

microscopio ottico il distacco dei lembi cutanei avviene al di sotto dello strato granuloso; al microscopio elettronico sono stati evidenziati degli organelli vacuolari ovalari elettrondensi nei cheratinociti dello strato granuloso.

Non si conosce la patogenesi di queste forme, come pure non ne è chiara l'ereditarietà.

Ittiosi congenite associate

KID syndrome

L'acronimo che designa questa sindrome sta a individuare i sintomi maggiori che la caratterizzano: cheratite (K), ittiosi (I), e sordità (D; *Deafness*). In realtà non si tratta di una vera i., ma di chiazze ipercheratosiche distribuite simmetricamente su guance, orecchie, gomiti e ginocchia, associate ad un'ipercheratosi palmoplantare di aspetto finemente reticolare. Questi segni cutanei non sono presenti alla nascita, quando invece esiste uno stato eritrodermico effimero, ma compaiono quasi sempre entro l'anno di vita, a volte più tardi. I casi più gravi comportano anche alopecia cicatriziale; le unghie possono essere distrofiche o presentare leuconichia. Anche in questa sindrome sono presenti spesso infezioni cutanee, micotiche e batteriche, recidivanti, e facilità allo sviluppo di epiteliomi spinocellulari. I segni extracutanei possono essere presenti sin dalla nascita o evidenziarsi nei primi anni di vita: la cheratite vascolare è preceduta da fotofobia, mentre la sordità neurosensoriale, presente alla nascita, può essere parziale; non c'è deficit intellettivo.

L'aspetto istologico cutaneo è costituito da ipercheratosi ed acantosi con caratteristico aspetto «a denti di sega»; al microscopio elettronico non si evidenziano alterazioni a livello dei tonofilamenti e della cheratoialina né presenza di corpi lamellari. Non è nota la patogenesi di questa sindrome, come non è sicuro il modello ereditario.

Condrodisplasia puntata

Questa forma rara fa parte del capitolo della condrodisplasia puntata o sindrome di Conradi-Hunerman. Questa malattia, descritta per la prima volta nel 1914 da Conradi, è stata per molti anni considerata un'entità singola. Attualmente ne vengono riconosciuti quattro sottotipi: la forma autosomica dominante (AD), l'autosomica recessiva (AR; forma rizomelica), la X-linked a carattere dominante (XLD; sindrome di Happle) e la X-linked recessiva (XLR).

La manifestazione caratteristica è la condrodisplasia puntata. Si tratta di calcificazioni puntate delle epifisi ossee, che sono visibili radiologicamente già al momento della nascita e che permangono fino all'età di circa tre anni (v. CONDRODISTROFIA CALCIFICANTE CONGENITA). Ne derivano bassa statura, arti asimmetrici, cifoscoliosi con anomalie vertebrali e anomalie craniche. L'i. è un sintomo costante della forma XLD nella quale, mentre alla nascita assume carattere diffuso con eritrodermia, successivamente si dispone lungo le linee di Blaschko. Si associano atrofodermia follicolare, prevalentemente localizzata al dorso delle mani e dei piedi, alopecia cicatriziale del cuoio capelluto, alterazioni dei capelli e delle sopracciglia; è presente inoltre cataratta spesso limitata ad un quadrante di un solo occhio. L'esame istologico al microscopio ottico mostra ipercheratosi ortocheratosica, riduzione del granuloso e lieve acantosi. Una colorazione col von Kossa può rivelare la presenza di piccole calcificazioni epidermiche. La microscopia elettronica mostra corpi stellati elettrondensi nelle cellule dello strato granuloso come da cristalli di calcio.

Con l'eccezione di rarissimi casi maschili, la malattia si presenta solo nelle femmine, perché il difetto genico è letale per i feti maschi. Non è ancora nota l'alterazione genetica del cromosoma X che causa questa forma. In alcuni casi sono state notate alterazioni dei perossisomi.



Fig. 6. Sindrome di Netherton: manifestazioni cutanee.

Una manifestazione clinica simile alla sindrome di Apple è stata osservata nella embriopatia da warfarin; inoltre esiste un omologo modello murino chiamato *bare patches*.

Sindrome di Netherton

Questa sindrome è caratterizzata dall'associazione di i., congenita, tricotressi invaginata e atopia. È una forma piuttosto rara; si trasmette secondo un tratto autosomico recessivo ed è più frequente nel sesso femminile con l'aspetto di ittiosi lineare circonflessa, mentre negli uomini prevalgono le forme di eritrodermia congenita ittiosiforme a decorso più grave.

Nella maggior parte dei casi (circa l'80-90%), l'aspetto clinico è caratterizzato dall'i. lineare circonflessa, cioè da chiazze anulari e serpiginose, eritematose, con bordi squamosi, diffuse al tronco (fig. 6) e alle estremità; il resto della cute appare lichenificata, soprattutto agli arti.

In pochi casi l'ittiosi può avere fin dalla nascita l'aspetto di un'eritrodermia ittiosiforme congenita, che può evolvere fatalmente per l'associazione con una grave immunodeficienza. Peculiari di questa sindrome sono l'eritema periorale e la tricotressi invaginata, che consiste nel particolare aspetto a canna di bambù del capello (fig. 7) e delle sopracciglia: questo rilievo a volte può mancare del tutto, ma quando presente porta ad una ipotrichia e fragilità del capello che migliora con l'età.

La presenza di una diatesi atopica è attualmente considerata come un segno incostante, che può manifestarsi con

asma bronchiale o, secondo alcuni autori, con intolleranza a determinati cibi, quali noci, uova o pesce, la cui assunzione può aggravare i sintomi clinici. Le IgE sieriche sono spesso molto elevate e può essere presente aminoaciduria.

Le caratteristiche istologiche, al microscopio ottico, sono simili nelle due varianti e consistono in un deposito di materiale eosinofilo nello strato corneo, che appare anche marcatamente paracheratosico, mentre lo strato granuloso è usualmente diminuito o addirittura assente; nel derma capillare si apprezza intorno ai vasi un'infiltrato infiammatorio; al microscopio elettronico si può osservare la presenza di corpi citoplasmatici rotondeggianti inclusi nei cheratinociti degli strati granuloso e spinoso.

L'etiologia e la patogenesi non sono conosciute; nelle squame ittiosiche sembrano aumentate le attività della fosfatasi acida, della betaglicuronidasi e della transglutaminasi; la tricotressi invaginata sembrerebbe dovuta all'alterata conversione dei gruppi-SH in -S-S- con l'accumulo dei gruppi-SH; ciò comporterebbe un indebolimento delle strutture cheratiniche del capello.

Non è possibile la diagnosi prenatale di questa i.

Sindrome di Dorfman-Chanarin

Questa forma di i. è estremamente rara ed ha una ereditarietà autosomica recessiva. I sintomi cutanei sono presenti alla nascita e consistono in modico stato eritrodermico e fine desquamazione. In seguito, lo stato ittiosiforme si fa più evidente ed interessa tutto il corpo, comprese le pieghe cutanee ed il viso. Ai sintomi cutanei si associano alterazioni di vari organi: sistema nervoso (atassia, sordità neurosensoriale, nistagmo), muscoli (miopatia), fegato (steatosi, epatomegalia), occhi (cataratta, retinopatia, strabismo). Il reperto diagnostico caratteristico di questa forma è costituito da accumuli di lipidi nei granulociti circolanti e nei loro precursori midollari: questo reperto è presente anche nei soggetti eterozigoti.

L'aspetto istologico al microscopio ottico non è specifico e consiste in ipercheratosi ortocheratosica e strato granuloso di spessore variabile; al microscopio elettronico si notano alterazioni dei cheratinosomi.

Attualmente non è noto con precisione il disturbo metabolico alla base di questa forma di i., ma esso interessa il turnover dei trigliceridi. Non esiste terapia specifica di questa dermatosi.

Sindrome di Sjögren-Larsson

Anche questa è una sindrome rarissima, che associa i., degenerazione maculare della retina e disturbi nervosi consi-

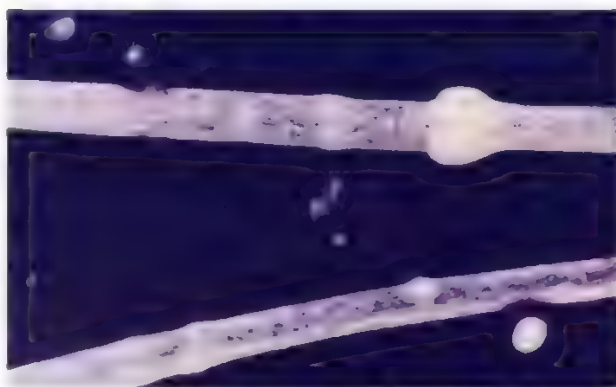


Fig. 7. Sindrome di Netherton: aspetto a canna di bambù dei capelli.



Fig. 8. Sindrome di Sjögren-Larsson.

stenti in tetraparesi spastica o paralisi degli arti inferiori e deficit mentale. La trasmissione ereditaria è autosomica recessiva; esistono portatori eterozigoti. V. anche: SJÖGREN-LARSSON, SINDROME DI.

I segni cutanei sono quasi sempre presenti alla nascita e consistono in ipercheratosi diffusa o fine desquamazione su base modicamente eritematosa (pieghe); in alcuni casi è presente l'aspetto di *collodion baby*; in seguito si instaura uno stato di ipercheratosi con lichenificazione soprattutto sulle regioni laterali del tronco e del collo (fig. 8).

I sintomi neurologici si instaurano generalmente dopo i primi tre mesi di vita, comunque entro i tre anni; essi consistono in tetraparesi spastica, a volte paralisi degli arti inferiori, associata ad oligofrenia. I segni oculari consistono in degenerazione maculare della retina, a cui si associano blefarite, congiuntivite e fotofobia.

Il reperto istologico al microscopio ottico è quello di un'i. da iperproduzione, con ipercheratosi acantosi e papillomatosi; al microscopio elettronico alcuni autori hanno evidenziato vacuoli lipidici nello strato corneo.

La patogenesi di questa sindrome è legata ad un deficit del metabolismo lipidico: è stato evidenziato un deficit dell'enzima nicotinamide adenina dinucleotide ossidoriduttasi (FANADO) nei cheratinociti e fibroblasti; alcuni autori avrebbero evidenziato anche un deficit di α -desaturasi. Recentemente è stata individuata la mutazione genica causa della dermatosi: si tratta di mutazioni puntiformi a livello del gene che codifica per l'enzima FALDH (*Fatty Aldehyde*

Dehydrogenase) localizzato sul cromosoma 17 (17 p11.2). Questo enzima è componente del già ricordato enzima FANADO, deputato alle ossidazioni delle aldeidi in acidi grassi.

Non c'è una terapia specifica per questa malattia, anche se alcuni Autori hanno avuto notevoli miglioramenti cutanei con una dieta lipidica a base di acidi grassi polinsaturi. È possibile la diagnosi prenatale.

Ittiosi con tricotiodistrofia

Il termine tricotiodistrofia sta ad indicare un disturbo del capello caratterizzato biochimicamente da un basso contenuto di aminoacidi solforati (soprattutto cistina) e clinicamente da capelli fragili, corti e radi. Al microscopio ottico i capelli possono presentare tricoschisi di vario grado, profilo ondulato e strozzature, mentre al microscopio polarizzatore si evidenzia un'alterazione tipica contrassegnata da tratti chiari e scuri che variano con il variare dei filtri usati: questo aspetto è caratteristico e può essere assimilato all'alternanza chiara e scura della coda di una tigre.

Questa alterazione del capello è il segno cardinale di tre entità, ben distinte clinicamente e biologicamente tra loro, con tratto ereditario autosomico recessivo (tab. III):

1) la sindrome BIDS (*Brittle Hair, Intellectual impairment, Decreased fertility, and Short stature*), dove non c'è ittiosi;

2) la sindrome IBIDS, simile alla precedente ma associata all'i., chiamata anche *Tay syndrome*;

3) la sindrome PIBI(D)S, individuata da Rebora e Crovato, che è assimilabile alla IBIDS, ma presenta in più una marcata fotosensibilità (P) ed una scarsa incidenza di diminuita fertilità (perciò la D è tra parentesi).

Queste due ultime sindromi, oltre allo stato ittiosiforme di tipo i. volgare e ipercheratosi palmoplantare, hanno in comune altri sintomi, quale la prematurità, dovuta a insufficienza placentare, la onicodistrofia e la facilità alle infezioni cutanee del settore respiratorio. Tuttavia ove esibiscono anche notevoli differenze.

L'aspetto istologico è simile nelle tre forme e ricalca quello di un'i. volgare a cui si associa un lieve infiltrato infiammatorio perivascolare. L'alterazione biochimica che porta alla diminuzione di cistina e di prolina nel capello non è ancora chiara. Recentemente è stato scoperto che i pazienti con tricotiodistrofia hanno un deficit delle funzioni di riparazione del DNA identico a quello presente nei pa-

TAB. III. ITTIOSI CON TRICOTIODISTROFIA

	BIDS	Sindrome di TAY	PIBI(D)S
Capelli	- Brittle hair - Tricoschisi Aspetto a coda di tigre	- Brittle hair - Tricoschisi Aspetto a coda di tigre	- Brittle hair - Tricoschisi Aspetto a coda di tigre
Unghie	Normali	Distrofiche	Distrofiche
Intelligenza	Lieve deficit	Lieve deficit	Lieve deficit
Crescita	Bassa statura	Bassa statura	Bassa statura
Difese immuno- logiche	Facili infezioni	Facili infezioni	Facili infezioni
Ipogonadismo	si	si	A volte
Ittiosi	no	si	si
Fotosensibilità	no	no	si
Facies atipica	no	si (aspetto progeroide)	si (non progeroide)

zienti con xeroderma pigmentoso gruppo di complementazione D: non hanno però stranamente aumentata incidenza dei tumori cutanei. Ancor più recentemente è stato individuato e clonato il gene difettivo localizzato sul cromosoma 19 q13.2.

Non esiste terapia specifica per queste forme: è d'obbligo la fotoprotezione esterna con farmaci *per os* per la PBDS. È possibile la diagnosi prenatale per questa dermatosi.

HID syndrome (Histris-like Ichthyosis with Deafness)

Questa rarissima forma associa uno stato ittiosiforme ad un severo deficit uditivo neurosensoriale.

I sintomi dermatologici compaiono poco tempo dopo la nascita, con chiazze eritematose sparse irregolarmente su tutto l'ambito cutaneo; in seguito si instaura un aspetto ittiosiforme simile ad un'i. istrice, interessante tutta l'epidermide con minimo impegno palmo-plantare. Il secondo segno cardinale di questa sindrome è un marcato deficit uditivo di tipo neurosensoriale, già presente precocemente ma non progressivo. A questi sintomi possono aggiungersi cheratite puntata e alopecia cicatriziale.

Dal punto di vista istologico, al microscopio ottico il reperto è di una ipercheratosi ortocheratosica con qualche focolo paracheratosico, acantosi e a volte papillomatosi; il granuloso è sempre conservato; i cheratinociti presentano un alone chiaro perinucleare, che dà a queste cellule l'aspetto a «occhio di uccello». Al microscopio elettronico si nota una riduzione delle tonofibrille ed una abbondante presenza intercellulare di materiale mucoso raccolto in granuli limitati da una membrana.

Non è noto il difetto metabolico alla base di questa forma ittiosica, come pure non è noto il modo di trasmissione ereditario. Da un punto di vista terapeutico si ottengono miglioramenti spettacolari con l'etretinato (v. RETINOIDI [v.; v.*]).

IFAP syndrome (ittiosi follicolare, atrichia e fotofobia)

Questa i. (*Ichthyosis Fulicularis, Atrichia, Photophobia*) è molto rara e si trasmette in modo recessivo legato al sesso.

I caratteri salienti consistono in assenza congenita dei capelli, lieve stato eritrodermico con sottili lamelle desquamanti, ipercheratosi follicolare diffusa, soprattutto evidente ai glutei, e fotofobia; a volte si associano anomalie delle unghie, cheratite vascolare, torcicollo congenito e deficit mentale.

L'esame istologico della cute al microscopio ottico evidenzia ipercheratosi ortocheratinica, acantosi, normale strato granuloso ed evidente ipercheratosi follicolare; la biopsia del cuoio capelluto mostra follicoli atrofici ed assenza di ghiandole sebacee.

Non si conosce la patogenesi di questo tipo di i., che sembra legato per la eterogeneità dei sintomi che può associare, ad una complessa *contiguous gene syndrome*. La terapia si avvale soprattutto di preparati topici.

Collodion baby

Con il termine *collodion baby* si caratterizza un particolare aspetto clinico neonatale, il quale evolverà nella maggioranza dei casi verso una forma ittiosica.

Il neonato si presenta ricoperto come da una membrana lucida, modicamente trasparente, simile a quella che avvolge alcuni insetti nella fase di crisalide prima di diventare insetto adulto. Tale guaina avviluppa tutto il corpo, arrestandosi agli orifizi e risparmiando il cordone ombelicale, ed è attraversato dalle unghie e dai capelli. A causa della sua rigidità, provoca ectropion ed inoltre può determinare insufficienza respiratoria costringitiva e disidratazione per alterazioni della *perspiratio insensibilis*.

La prognosi di questi neonati è spesso sfavorevole: i decessi avvengono per infezioni broncopneumoniche, disturbi elettrolitici e disventilatori.

L'evoluzione del quadro clinico può andare in differenti direzioni: guarigione (raramente), i. lamellare di vario tipo (spesso), a volte sindrome di Sjögren e Larsson, sindrome di Netherton, sindrome di Conradi-Hunerman, sindrome di Rud, o tricotiodistrofia. La terapia di queste forme si basa essenzialmente sulla prevenzione e sulla cura delle complicanze. È possibile la diagnosi prenatale.

Dermatosi ittiosiformi

Queste forme si differenziano dalle i., perché l'interessamento cutaneo è parziale e perché l'aspetto clinico non è sempre ittiosico, ma può essere a chiazze ipercheratosiche.

In questo capitolo vanno annoverate: 1) l'*eritrocheratodermia simmetrica progressiva di Gottron*, costituita da chiazze eritematose o giallastre, ipercheratosiche, localizzate soprattutto alle estremità, con disposizione simmetrica, ad andamento nettamente progressivo; 2) l'*eritrocheratodermia variabilis di Mendez-Da Costa*, costituita da placche ipercheratosiche stabili e chiazze eritematose che cambiano sede anche da un giorno all'altro; 3) la *dermatosi a coccarda di Degos*, costituita da lesioni fisse cheratosiche localizzate sulle ginocchia e gomiti, e chiazze eritematose con centro desquamante (aspetto a coccarda), localizzate al tronco e ai glutei, che compaiono a *poussées*; 4) la *pityriasis rotunda*, costituita da chiazze ittiosiformi brune, circolari, ben delimitate, in vario numero, di diametro variabile da 1 a 10 centimetri; è una forma non congenita, a volte familiare; ne sono stati descritti casi paraneoplastici; 5) la sindrome CHILD (*Congenital Hemydysplasia with Ichthyosiform erythrodermia and Limb Defect*), rarissima sindrome costituita da eritrodermia ittiosiforme congenita unilaterale, da una sindrome dismielica omolaterale, da anomalie viscerali varie (cuore, reni, etc.); ha un'ereditarietà X-linked dominante.

Ittiosi acquisita

Oltre alle forme geneticamente determinate, esiste una forma di i. secondaria a varie situazioni patologiche o all'assunzione di farmaci (tab. IV).

Queste i. acquisite clinicamente si manifestano con piccole squame brunobiancastre, evidenti soprattutto sul tronco e sulla fascia estensoria degli arti; a volte si associa ipercheratosi palmoplantare e soggettivamente è spesso presente prurito.

L'esame istologico al microscopio ottico evidenzia una moderata ipercheratosi ortocheratosica con ipercheratosi follicolare, mentre gli strati granuloso e spinoso sono di spessore ridotto. Al microscopio elettronico non si evidenziano grossolane alterazioni. La terapia è legata all'evoluzione della malattia di base o alla sospensione del farmaco nelle forme iatrogene.

TAB. IV. CAUSE DELLE ITTIOSI ACQUISITE

- | |
|--|
| 1) Farmaci: clofazimina, ipocolesterolemizzanti, cimetidina, allopurinolo |
| 2) Neoplasie: polmone, utero, mammella, linfopatie, poliglobulie, morbo di Kaposi |
| 3) Disturbi ormonali e metabolici: ipotiroidismo, panipopituitarismo, pellagra, deficit di vit. A, malnutrizione, nutrizione parenterale, deficit di acidi grassi polinsaturi |
| 4) Altre malattie: morbo di Crohn, morbo celiaco, AIDS, lebbra, sarcoidosi, connettiviti |

ITTIOSI

Cenni di terapia generale delle ittiosi

La terapia delle i. si avvale notevolmente di terapia topica e, in alcune forme, di terapia sistemica.

I preparati per uso topico sono a base di acido lattico, urea o glicole propilenico; i prodotti a base di acido salicilico vanno usati con cautela, soprattutto nei bambini. Recenti osservazioni hanno mostrato la utilità del calcitriolo topico.

Per quanto riguarda il trattamento generale i retinoidi (etretinato ed acitretin) danno notevoli vantaggi nel feto arlecchino, nella sindrome di Sjögren-Larsson, nelle forme di i. lamellare, mentre a bassi dosaggi possono essere utilizzate anche nelle i. bollose e nella sindrome di Nether-

ton.

Alcune forme di i. si giovano dell'elioterapia (i. volga-

re, i. recessiva X-linked), mentre la PUVA-terapia può essere utilizzata con successo nella sindrome di Nether-

Bibliografia

- AA. VV., *The genetics of skin disease*, *J. Invest. Dermatol.*, 1994, **103** (suppl.).
Arnold M. L., Anton-Lamprecht I., *Arch. Dermatol. Res.*, 1988, **280**, 268.
McKusick V. A., *Mendelian inheritance in man*, 1998, 12 ed., Johns Hopkins Press, Baltimore.
Moss C., Savin J., *Dermatology and the new genetics*, 1995, Blackwell, Oxford.
Novice F. M., Collison D. W., Burgdorf W. H. C., Esterly N. B., *Handbook of genetic skin disorders*, 1994, Saunders, Philadelphia.
Traupe H., *The ichthyoses*, 1989, Springer-Verlag, Berlin.

RINO CAVALIERI E BIAGIO DIDONA

J-K

JACKSON-WEISS, SINDROME: v. CRANIOSINOSTOSI** (col. **1421).

JAKOB-CREUTZFELDT, MALATTIA DI: v. JACOB-CREUTZFELDT, MALATTIA DI (VIII, 876); JACOB-CREUTZFELDT, MALATTIA DI* (*4225-4226); CREUTZFELDT-JACOB, MALATTIA DI** (**1428-1436); v. anche ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI** (**1862-1880).

KALLMANN-DE MORSIER, SINDROME DI [v. Agg. I, coll. *4226-4227]

Aspetti di genetica e biologia molecolare

La sindrome di Kallmann-de Morsier, clinicamente caratterizzata dalla coesistenza di ipogonadismo ipogonadotropo ed iposmia o anosmia, viene attualmente ricondotta ad una anomalia della migrazione embrionale sia degli assoni olfattori che dei neuroni che producono i fattori di rilascio delle gonadotropine (GnRH).

Attraverso l'analisi della segregazione genica, nei casi familiari si sono documentate tre modalità di trasmissione ereditaria: associata al cromosoma X, autosomica dominante a penetranza variabile ed autosomica recessiva. Poiché l'incidenza della sindrome nei maschi è da 5 a 7 volte più alta che nelle femmine, si ritiene più comune la forma legata al cromosoma X, causata da una mutazione del cosiddetto gene *KAL*. La patogenesi di quest'ultima forma, recentemente chiarita, deve essere ricondotta ad una alterazione dell'embriogenesi.

Nella normale differenziazione embrionale, sia i neuroni che producono GnRH che quelli olfattori traggono origine dall'epitelio del placode olfattivo, struttura di derivazione ectodermica localizzata all'esterno del SNC. Da questa sede primitiva le fibre dei nervi olfattivi, del nervo vomero-nasale (rudimentale nell'uomo, ma rilevante nel comportamento riproduttivo degli animali) e del nervo terminale (la cui funzione è sconosciuta) si accrescono e migrano verso la porzione rostrale dell'encefalo, ove contraggono rapporti sinaptici con le cellule mitrali dei bulbi olfattivi. Attorno a tali fibre si forma successivamente la lamina cribrosa dell'etmoide, che ne viene attraversata. I neuroni produttori di GnRH dal placode ol-

fattivo migrano lungo l'impalcatura formata dalle fibre olfattive, fino a localizzarsi in corrispondenza dell'ipotalamo medio-basale e dell'area preottica dell'ipotalamo anteriore.

L'esame autoptico di un feto di 19 settimane che presentava un'estesa delezione del braccio corto del cromosoma X ha dimostrato che nei pazienti con s. di K.-de M. gli assoni dei nervi olfattivo, vomero-nasale e terminale e, conseguentemente, i neuroni GnRH-secernti, pur allontanandosi dall'epitelio olfattivo, non raggiungono il SNC; si accumulano invece nella regione superiore della fossa nasale e si estendono in parte nella lamina cribrosa, ma non procedono entro l'encefalo. Si ritiene pertanto che non siano compromesse le fasi precoci del processo di migrazione, ma semmai la capacità di superare il piano mesenchimale che separa l'ectoderma dal SNC, ovvero la possibilità di stabilire una corretta connessione con altre strutture nervose.

Attraverso lo studio del *linkage* genetico e di alcune delezioni cromosomiche, il gene responsabile della s. di K.-de M. è stato localizzato in corrispondenza dell'estremo terminale del braccio corto del cromosoma X, in posizione Xp22.3. Questa sede ospita una regione pseudo-autosomica, ossia un tratto di DNA omologo a quello del braccio lungo del cromosoma Y; pertanto i corrispondenti geni, presenti in duplice copia, sfuggono al fenomeno dell'inattivazione del cromosoma X. In questa area è stato individuato e clonato il gene *KAL* (altrimenti denominato *Kalig 1* o *ADMLX*), la cui sequenza di basi si ritrova in diverse specie animali, con un alto grado di conservazione evolutiva. Tale gene codifica per una proteina (a localizzazione presumibilmente extracellulare) di 680 aminoacidi, che contiene tre domini molecolari, denominati A, B e C: il primo si riscontra anche in molti inibitori delle proteasi (v. PROTEASI, INIBITORI DELLE [v.*; v.**]) e nelle neurofisine; i domini B e C somigliano a quello della fibronectina di tipo III, altresì presente sia nelle molecole di adesione (v. ADESIONE, MOLECOLE DI**) delle cellule neurali sia in enzimi coinvolti nella differenziazione assonica e nella crescita cellulare (quali la tirosin-chinasi e la tirosin-fosfatasi). Le mutazioni del gene *KAL* sembrano poter quindi alterare una mole-

cola di adesione deputata a regolare l'accrescimento degli assoni olfattivi, ovvero l'interazione di essi e dei neuroni GnRH secernenti con le altre strutture nervose. Ne conseguono l'involutione atrofica dei bulbi olfattivi e quindi ipo- o anosmia, nonché il deficit di secrezione di GnRH e quindi delle gonadotropine, da cui l'ipogonadismo. Lo stesso difetto molecolare potrebbe concorrere a determinare la sindrome da sincinesia («mirror movements») nonché la agenesia renale unilaterale, talora associate alla s. di K.-de M.

Le recenti acquisizioni genetiche e di biologia molecolare non chiariscono esaustivamente la patogenesi della sindrome. Nelle forme ad ereditarietà autosomica dominante e recessiva si deve infatti ipotizzare che siano interessati altri tratti di DNA, che contengano l'informazione genetica relativa a proteine capaci di interagire con quelle codificate dal gene *KAL*. Gli stessi geni potrebbero altresì essere coinvolti in altri aspetti dello sviluppo delle strutture olfattive e GnRH secernenti.

Bibliografia

- Bick D., Franco B., Sherins R. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, 326, 1752.
 Caviness V. N. Jr., *N. Engl. J. Med.*, 1992, 326, 1775.
 Franco B., Guoli S., Pragliola A. et al., *Nature*, 1991, 353, 529.
 Hardelin J. P., Levilliers J., Blanchard S. et al., *Hum. Molec. Genet.*, 1993, 2, 373.
 Hardelin J. P., Petit C., *Bullier's Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 9, 489.
 Legouis R., Hardelin J. P., Levilliers J. et al., *Cell*, 1991, 67, 423.
 Prager D., Braunstein G. D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, 76, 824.
 Rugari E., Lutz B., Kuratani S. C. et al., *Nature Genetics*, 1993, 4, 19.
 Schwanzel-Fukuda M., Bick D., Pfaff D. W., *Mol. Brain Res.*, 1989, 6, 311.

VINCENZO CARNEVALE

KAPOSI, MORBO DI [v. vol. VIII, coll. 883-888; v. Agg. I, coll. *4227-4232]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3011). - **Epidemiologia ed etiopatogenesi** (col. 3012). - **Diagnosi** (col. 3014). - **Terapia** (col. 3014).

Introduzione

Il morbo di Kaposi [m. di K.], sarcoma di Kaposi, descritto inizialmente (1872) come un tumore vascolare cutaneo, è rimasto per oltre 120 anni un enigma per ciò che riguarda la sua natura biologica e la sua patogenesi. Solo negli ultimissimi anni, nuovi dati ottenuti sulla scia della importanza che questa malattia ha assunto nell'ambito dell'infezione da HIV (dove rappresenta il tumore più frequente; v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.; v.*; v.**]), hanno permesso di chiarire in parte questi dubbi.

Per gli aspetti clinici della malattia si rimanda al vol. VIII (coll. 885-888) e all'Aggiornamento I (coll. *4229-4233). Basterà qui ricordare che sono state identificate tre forme di m. di K. La *forma sporadica* (o m. di K. classico o europeo), che colpisce, specie nell'area mediterranea, soggetti prevalentemente di età avanzata, che presenta un decorso clinico in genere poco aggressivo con sopravvivenza relativamente lunga. La *forma endemica*, osservata con maggiore frequenza nell'Africa orientale e centrale, che presenta un decorso clinico più aggressivo e colpisce soggetti di tutte le età. Infine la *forma più grave*, che insorge in pazienti con deficienze immunologiche, sia associate a terapia immunosoppressiva (come ad es. pazienti che abbiano ricevuto un trapianto renale), sia e soprattutto in soggetti con immunodeficienza associata all'infezione da virus HIV. È ormai ben noto che nei soggetti con infezione da HIV in stadio avan-

zato (AIDS) si osserva un'elevata incidenza di m. di K., che si presenta con un decorso clinico molto aggressivo e con frequenza di localizzazioni extracutanee in particolare nei linfonodi, cavità orale, nel tratto gastro-intestinale (queste ultime lesioni sono presenti nell'80% dei casi all'esame autotico) e polmonari (presenti specie nelle fasi terminali della malattia) (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.; v.*; v.**]).

Epidemiologia ed etiopatogenesi

Nei pazienti con malattia da HIV la distribuzione epidemiologica della m. di K. riserva tuttavia alcune singolari peculiarità. È stato infatti da tempo osservato che, a differenza di altri tumori o delle principali infezioni opportunistiche, la m. di K. è frequente nei soggetti di sesso maschile che presentino l'omosessualità o la bisessualità come fattore di rischio, mentre è assai meno frequente in altre categorie di pazienti (sesso femminile, pazienti in età pediatrica, tossicodipendenti, emofiliaci). Queste peculiarità nella distribuzione epidemiologica avevano fatto da tempo ipotizzare che un ulteriore agente infettivo, trasmissibile prevalentemente attraverso i rapporti omosessuali maschili (sesso per via anale), potesse essere coinvolto nella patogenesi della malattia. Per anni perciò, i virologi hanno ricercato senza successo se un agente noto (e per lungo tempo l'attenzione si era concentrata sul citomegalovirus, sul virus dell'epatite B, sull'*Herpesvirus-6* o HHV6) o ancora ignoto fosse responsabile della m. di K. Solo nel 1994 tuttavia, alcuni ricercatori dell'Università Columbia di New York (Chang et al., 1994), hanno per la prima volta identificato la presenza, nelle lesioni di m. di K., di sequenze di DNA appartenenti ad un nuovo herpesvirus che è stato definito herpes virus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV: *Kaposi Sarcoma-associated Herpes Virus* [Foreman et al., 1997]) o più comunemente *Human Herpesvirus-8* (HHV8; v. HERPESVIRUS**). Negli anni successivi è stato dimostrato che queste sequenze sono dimostrabili in pratica in tutti i casi di m. di K. associato all'AIDS ed anche nella maggioranza di m. di K. osservato in soggetti HIV negativi.

Studi di ibridizzazione *in situ* hanno dimostrato che queste sequenze virali sono presenti nelle cellule «fusate», che sono considerate le cellule fondamentali nella patogenesi della malattia. Tuttavia, sequenze virali sono anche dimostrabili in pazienti con tumori a cellule B delle cavità corporee, spesso in associazione al virus di Epstein-Barr. Più recentemente infine, sono state messe a punto metodiche di immunofluorescenza per poter determinare la presenza di anticorpi anti-HHV8. Questi studi hanno dimostrato la presenza di anticorpi specifici anti-HHV8 in circa l'80% dei casi di m. di K. associato all'infezione da HIV e nel 100% dei casi di m. di K. sporadico (mediterraneo). La popolazione normale di controllo presenta percentuali di positività variabili a seconda dell'area geografica di provenienza (< 4% negli U.S.A., 4% in Italia, 50% in Uganda; Gao et al., 1996). Altri gruppi (ricercando anticorpi contro antigeni presenti in fasi diverse dell'infezione) hanno riscontrato percentuali differenti (25% di adulti negli U.S.A.) (Lennette et al., 1996). Il virus non è comune prima della pubertà negli U.S.A., mentre dati più elevati di positività anticorpale sono riscontrabili in soggetti con una storia di malattie trasmesse per via sessuale ed in particolare, in alta frequenza, in soggetti maschi omosessuali HIV-positivi. I dati sono quindi compatibili con l'ipotesi che questo virus non sia ubiquitario, sia trasmissibile per via sessuale e presenti un'elevata associazione con il m. di K.

In conclusione, al momento di scrivere questo aggiornamento (novembre 1997), non sono disponibili dati conclusivi che permettano di identificare con certezza l'HHV8

come l'agente etiologico del m. di K. Tuttavia, un numero crescente di dati suggerisce questa ipotesi come possibile. La messa a punto di un test più sensibile e specifico per la valutazione della presenza degli anticorpi nel siero, resa peraltro difficile dal fatto che il virus non è stato ancora sequenziato completamente, aiuterà considerevolmente lo sviluppo delle nostre conoscenze in materia e porterà verosimilmente in breve tempo a conclusioni più definitive.

Anche se fosse dimostrato il legame patogenetico del m. di K. con un virus, rimarrebbero da identificare i meccanismi coinvolti nella patogenesi della neoplasia. Negli ultimi anni una serie di ricerche originali ha studiato il ruolo di alcune citochine ed ormoni nella patogenesi del m. di K.

Una caratteristica essenziale, a livello istologico, del m. di K. è data dalla presenza delle cellule fusate (dette anche *cellule di Kaposi* o *spindle* [fig. 1; v. anche KAPOSI, MORBO DI*, fig. 6]) associate a cellule endoteliali, fibroblasti, cellule infiammatorie e neoformazione di vasi. Molte lesioni di Kaposi danno luogo al crescere di cellule endoteliali iperplastiche (non maligne) che sono sotto il controllo di alcune citochine. La disponibilità di modelli *in vitro* e *in vivo* (coltura delle cellule di Kaposi e induzione sperimentale della malattia nell'animale) ha consentito di determinare che l'interazione tra le cellule endoteliali ed i prodotti dei geni dell'HIV-1 può portare a un quadro di produzione di citochine che contribuisce verosimilmente all'insorgere delle lesioni di Kaposi (Ensoli, *et al.*, 1997). Quando sono coltivate *in vitro*, le cellule di Kaposi secernono diversi fattori di crescita tra cui fattore di crescita dei fibroblasti, che è un potente fattore angiogenico, e interleuchina-1 (IL-1). Que-

ste sostanze possono da sole indurre la crescita di lesioni simili a quelle del m. di K. Infine le cellule di Kaposi producono e proliferano in risposta ad altre citochine come l'IL-1, l'IL-6, il fattore piastrinico di crescita B e il *tumor necrosis factor* (TNF) ed il cocktail di queste citochine potrebbe rappresentare un fattore tessutale di crescita per le lesioni del m. di K.

Recentemente è stato dimostrato che l'HHV8 presenta una peculiarità tra gli herpesvirus umani noti: quella di codificare per proteine virali che sono simili a citochine e chemochine umane note. Tra queste, le proteine infiammatorie macrofagiche (*Macrophage Inflammatory Protein* o MIP-I e -II), l'interleuchina-6, e l'*interferon regulatory factor* [Nicolas *et al.*, 1997]). Queste proteine di origine virale conservano le funzioni delle corrispondenti proteine umane ed in particolare è stato dimostrato che MIP-I e MIP-II di origine virale, hanno un'elevata capacità angiogenica. Inoltre, il virus codifica per una proteina omologa del prodotto del protooncogene *bcl-2* (Sarid *et al.*, 1997). Questa proteina ha un'attività ben caratterizzata nel bloccare l'apoptosi e la sua espressione è stata posta in relazione alla patogenesi di diverse neoplasie. Questi nuovi dati si accordano quindi con quelli esposti nel paragrafo precedente, suggerendo che il virus possa contribuire direttamente a creare un microambiente tessutale che favorisce la formazione di lesioni di Kaposi.

Gli studi sulla patogenesi hanno anche contribuito a cercare di individuare fattori che possano riuscire ad inibire la crescita delle lesioni del m. di K., in quanto come appare evidente, queste sostanze potrebbero potenzialmente essere impiegate nel trattamento. Recentemente è stato dimostrato che linee immortalizzate derivate da lesioni del m. di K. sono uccise *in vitro* e *in vivo* (dopo essere fatte crescere nel topo nudo) da un ormone della gravidanza, la catena beta della gonadotropina corionica, mentre questo ormone non uccide cellule endoteliali normali.

Diagnosi

La diagnosi di m. di K. si basa tuttora sull'esame biotico delle lesioni. Le lesioni polmonari possono essere diagnosticate con l'esame radiografico, la broncoscopia (con eventuale biopsia che viene raramente eseguita per la presenza di rischi notevoli di complicanze emorragiche), il lavaggio broncoalveolare, la scintigrafia con gallio o con l'esame citologico dell'espettorato. Le lesioni gastrointestinali sono evidenziate con l'endoscopia.

Terapia

Nelle fasi iniziali ha soprattutto importanza, accanto alla terapia anti-retrovirale, la terapia estetica per alleviare il peso di lesioni a volte deturpanti. Quando tuttavia la malattia si presenta in forma aggressiva e con localizzazioni disseminate anche viscerali è necessario instaurare una chemioterapia sistemica. Recentemente si è anche osservato che l'incapsulazione liposomale di farmaci antitumorali può aumentare l'attività antineoplastica nel m. di K., riducendone la tossicità. Farmaci che hanno dimostrato efficacia come agenti singoli o in combinazione sono la doxorubicina e la daunorubicina liposomali, la bleomicina, la doxorubicina, l'etoposide, la vinblastina e la vincristina.

L'interferone alfa ad alte dosi è indicato nel trattamento di pazienti con livelli di cellule CD4 > 200 mm³. Si osserva regressione specie nei casi senza sintomi generali (febbre, perdita di peso, sudorazione notturna). Dati più recenti suggeriscono una maggiore efficacia dell'interferone alfa a dosi medio-basse (ad es. 5 milioni di unità tre volte la settimana), ma in associazione a combinazioni di antiretrovirali (AZT, ddI). Per il trattamento topico è stato impiegato

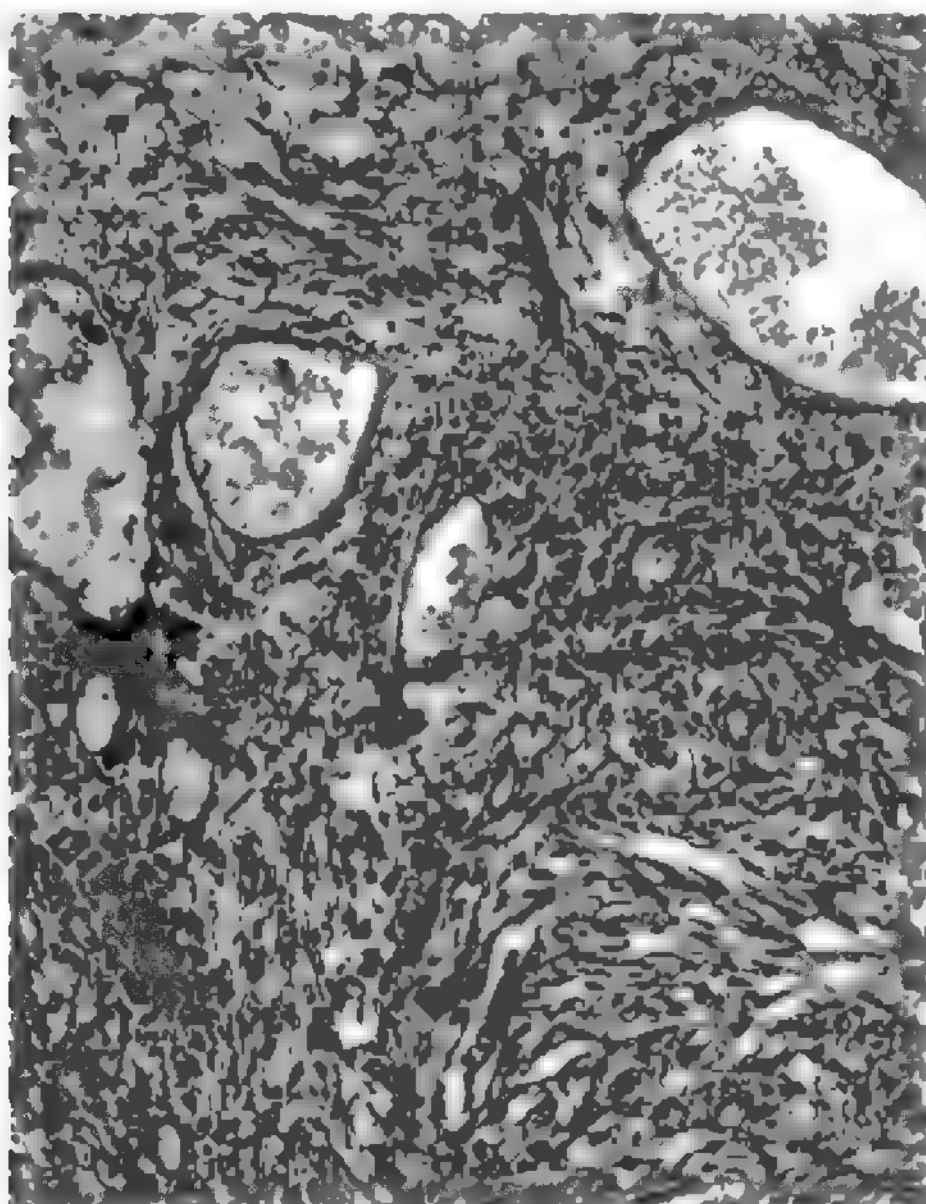


Fig. 1. M. di K. Lacune vascolari di calibro variabile con interposto stroma ricco di cellule neoplastiche fusiformi e di mononucleari. 140 x. (Osservazione A. Ascenzi).

KAPOSI

con successo, oltre alla crioterapia ed alla radioterapia, il fattore ricombinante piastrinico 4.

Va infine ricordato che i nuovi dati etiopatogenetici porteranno a nuove strategie di trattamento. Ad es., i dati sull'attività *in vitro* della gonadotropina hanno consentito di ipotizzare un trattamento ormonale del m. di K. e *trial* clinici con la gonadotropina corionica umana sono attualmente in via di attuazione, anche se i risultati non appaiono molto incoraggianti (Gill *et al.*, 1996). È ovvio che l'identificazione dell'HHV8 con possibile agente etiologico porterà a nuovi protocolli di trattamento mirati contro questo virus.

Bibliografia

Ascenzi A., Mottura G., *Anatomia Patologica*, 5 ed., 1997, UTET, Torino.
Boshoff C. *et al.*, *Science*, 1997, **278**, 290.
Chang Y. *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 1865.

Ensoli B. *et al.*, *Nature*, 1997, **371**, 674.
Foreman K. E. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336**, 163.
Gao S. J. *et al.*, *Nature Medicine*, 1996, **2**, 925.
Gill P. S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**, 1261.
Levy J. A., *Lancet*, 1997, **349**, 558.
Moore P. S. *et al.*, *Science*, 1997, **274**, 1739.
Nicolas J. *et al.*, *Nature Medicine*, 1997, **3**, 287.
O' Leary J. J., *Nature Medicine*, 1996, **2**, 862.
Russo J. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 14862.
Saris R. *et al.*, *Nature Medicine*, 1997, **3**, 293.
Treatment directory of Kaposi's sarcoma, in *AIDS/HIV Treatment Directory*, vol. 8, n. 1, Feb. 1996.

FRANCO PANDOLFI

KENNEDY, MALATTIA DI: V. MOTONERONE, MALATTIE DEL**

KETOROLAC: V. ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI** (coll. **457-458).

L

LAFORA, MALATTIA DI

Sin.: epilessia mioclonica progressiva del tipo Lafora.

SOMMARIO

Introduzione (col. 3017). - **Quadro clinico** (col. 3018). - **Quadro elettroencefalografico** (col. 3020). - **Quadro istopatologico** (col. 3022). - **Basi genetiche** (col. 3024). - **Reperti biochimici** (col. 3024). - **Trattamento terapeutico** (col. 3025).

Introduzione

La sindrome di *epilessia mioclonica progressiva* (EMP) comprende un gruppo di rare affezioni ereditarie caratterizzate da mioclonia (v. *MIACLONIE*, IX, 1745) e convulsioni tonico-cloniche generalizzate, turbe delle funzioni nervose e demenza. La EMP del tipo Lafora (*malattia di Lafora* [m. di L.]) è un grave disordine neurometabolico del metabolismo dei carboidrati, descritto per la prima volta nel 1911 (Lafora, 1911). La malattia è caratterizzata istologicamente da inclusioni citoplasmatiche di un abnorme polimero del glicoso nell'encefalo e in altri organi. Si presenta di solito nel secondo decennio di vita con convulsioni generalizzate, mioclonie, manifestazioni visive parossistiche, modificazioni del comportamento o degrado di attività intellettive. Nello stadio avanzato della malattia una grave e rapidamente progressiva demenza si accompagna ad aumento delle crisi miocloniche che rispondono poco alla terapia. La sopravvivenza di solito non va oltre i 30 anni di età. La diagnosi è frequentemente tardiva perché il quadro clinico può simulare altre sindromi epilettiche. Già nelle prime fasi della malattia si possono presentare alterazioni dell'elettroencefalogramma (EEG) che potrebbero orientare il clinico verso una corretta diagnosi, che può essere confermata istologicamente mediante biopsia cutanea (vedi sotto). L'ereditarietà è autosomica recessiva. La recente mappatura del gene della m. di L. sul cromosoma 6q (Serratosa *et al.*, 1995) apre la possibilità di una diagnosi prenatale e presintomatica in famiglie con un membro affetto dalla malattia in cui si sia stabilito un *linkage* (v. *GENETICA MEDICA**; **) col cromosoma 6q. L'identificazione del gene difettoso e l'individuazione del difetto metabolico specifico implicato nella m. di L. sono i futuri

obiettivi, di cui è evidente l'importanza sia per il miglioramento delle nostre conoscenze su questa grave condizione morbosa sia per lo sviluppo di una terapia razionale.

Quadro clinico

La sindrome di EMP è caratterizzata da accessi mioclonici e tonico-clonici, da progressiva alterazione delle funzioni nervose e demenza (Berkovic *et al.*, 1993). È causata da alcuni rari disordini neurometabolici ereditari che comprendono, oltre alla m. di L., la malattia di Unverricht-Lundborg (v. *UNVERRICHT-LUNDBORG, MALATTIA DI***), la ceroido-lipofuscinosi neuronale (v. VIII, 2259; *2507), l'epilessia mioclonica con «ragged red fibers» (MERRF) (v. *MITOCONDRI**, coll. *5193; *MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE***), la sialidosi (v. *4701; tab. I) e la malattia di Gaucher (v. *GAUCHER, MALATTIA DI*, VI, 2270; **2375-2378) tipo III (tab. I). Gli aspetti clinici e genetici di queste condizioni, e di altre anche più rare, responsabili di EMP sono stati oggetto di una recente rassegna (Berkovic *et al.*, 1993). Una differenziazione tra queste condizioni è importante perché le loro modalità di trasmissione ereditaria e le prognosi variano considerevolmente. La diagnosi di EMP è relativamente facile nelle fasi avanzate del processo morboso, anche se può essere difficile nei suoi stadi iniziali quando il quadro clinico e quello dell'EEG possono essere indistinguibili da quelli dell'epilessia mioclonica giovanile o dell'epilessia idiopatica generalizzata (v. *EPILESSIA*, V, 2392; *2848; **2053). La diagnosi differenziale va posta anche con le encefalopatie progressive con convulsioni e con le atassie miocloniche progressive con le quali l'EMP ha in comune alcuni aspetti clinici.

Il quadro clinico della m. di L. risulta compiutamente descritto (Van Heycop Ten Ham, 1974; Norio e Koskiniemi, 1979; Elliot *et al.*, 1992; Acharya *et al.*, 1993; Berkovic *et al.*, 1993). La malattia si appalesa più frequentemente nel secondo decennio di vita con accessi tonico-clonici generalizzati. Nelle fasi iniziali della malattia possono anche essere presenti crisi di assenza, cadute improvvise e crisi visive parziali. La mioclonia può anche essere assente all'inizio, ma si sviluppa invariabilmente, progredisce senza rallentamenti e alla fine diviene costante e incontrollabile. Può es-

TAB. I. EPILESSIA MIOCLONICA PROGRESSIVA: MALATTIE RESPONSABILI, EREDITARIETÀ, LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA DEI GENI ABNORMI E DIFETTI GENETICI NOTI

Malattia responsabile	Ereditarietà	Localizzazione cromosomica del gene abnorme/difetto genetico
Malattia di Gaucher tipo III	AR	1q
Malattia di Lafora	AR	6q 23-25 (a fianco dei markers D6S292 e D6S420)
MERRF*	Ereditarietà mitocondriale (materna)	Mutazioni puntiformi del genoma mitocondriale. La più frequente è A834G (tRNA ^{Leu})
Ceroido-lipofuscinosi neuronale		
Infantile (NCL I)	AR	1p 32 (Arg122Trp nel gene della palmitoil-proleina-tioesterasi)
Infantile tardiva (NCL II)	AR	?
Giovanile (NCL III)	AR	16p
Infantile tardiva finica (NCL V)	AR	13q 21.2-32
Sialidosi		
Tipo I	AR	10
Tipo II	AR	20 ?
Malattia di Unverricht-Lundborg	AR	21q (vicino al marker D21S154)

* MERRF) epilessia mioclonica con «ragged red fibers»; AR) autosomica recessiva, NCL) ceroido-lipofuscinosi neuronale.

sere multifocale e asincrona o bilaterale e sincrona. Tra i fattori scatenanti vanno considerati un movimento intenzionale, il mantenimento di una postura, o stimoli sensoriali, come una stimolazione luminosa, sonora o tattile. In aggiunta a quelli degli arti, possono essere interessati i muscoli della faccia e dei bulbi oculari. Crisi focalizzate, in particolare occipitali, si hanno in circa il 50% dei pazienti e manifestazioni visive parossistiche, come flash di luci o luci colorate, in circa il 25-50% dei casi.

I ragazzi affetti mostrano di solito un'intelligenza inizialmente normale. Cambiamenti del comportamento, tra cui irritabilità, manifestazioni di delusione, reazioni violente o decadimento nelle prestazioni scolastiche, possono precedere l'inevitabile comparsa della grave demenza progressiva. Si osservano frequentemente interessamento dei motoneuroni dei segmenti rostrali, sintomi cerebellari (particolarmente atassia) e disturbi della visione. Il trattamento delle crisi è difficile e gli individui affetti muoiono per demenza ad una età media di 20 anni. Poiché la malattia viene ereditata in maniera autosomica recessiva, vanno ricercati nell'anamnesi rapporti di consanguineità e presenza di altri membri della famiglia affetti. Nella tab. II sono riportati i dati clinici relativi a due fratelli di origine indiana affetti da m. di L., dei quali nelle figg. 1-5 sono illustrati i risultati dell'esame EEG e di quello istopatologico.

È stato descritto un piccolo numero di casi di m. di L. con inizio nella tarda adolescenza o nelle prime fasi dell'età

adulta (Berkovic *et al.*, 1993; Kaufman *et al.*, 1993). Questi individui sembrano mostrare un decorso più lento e più protratto, con una sopravvivenza più lunga. Può trattarsi di una condizione che alla fine potrebbe rivelarsi geneticamente distinta dalla forma giovanile.

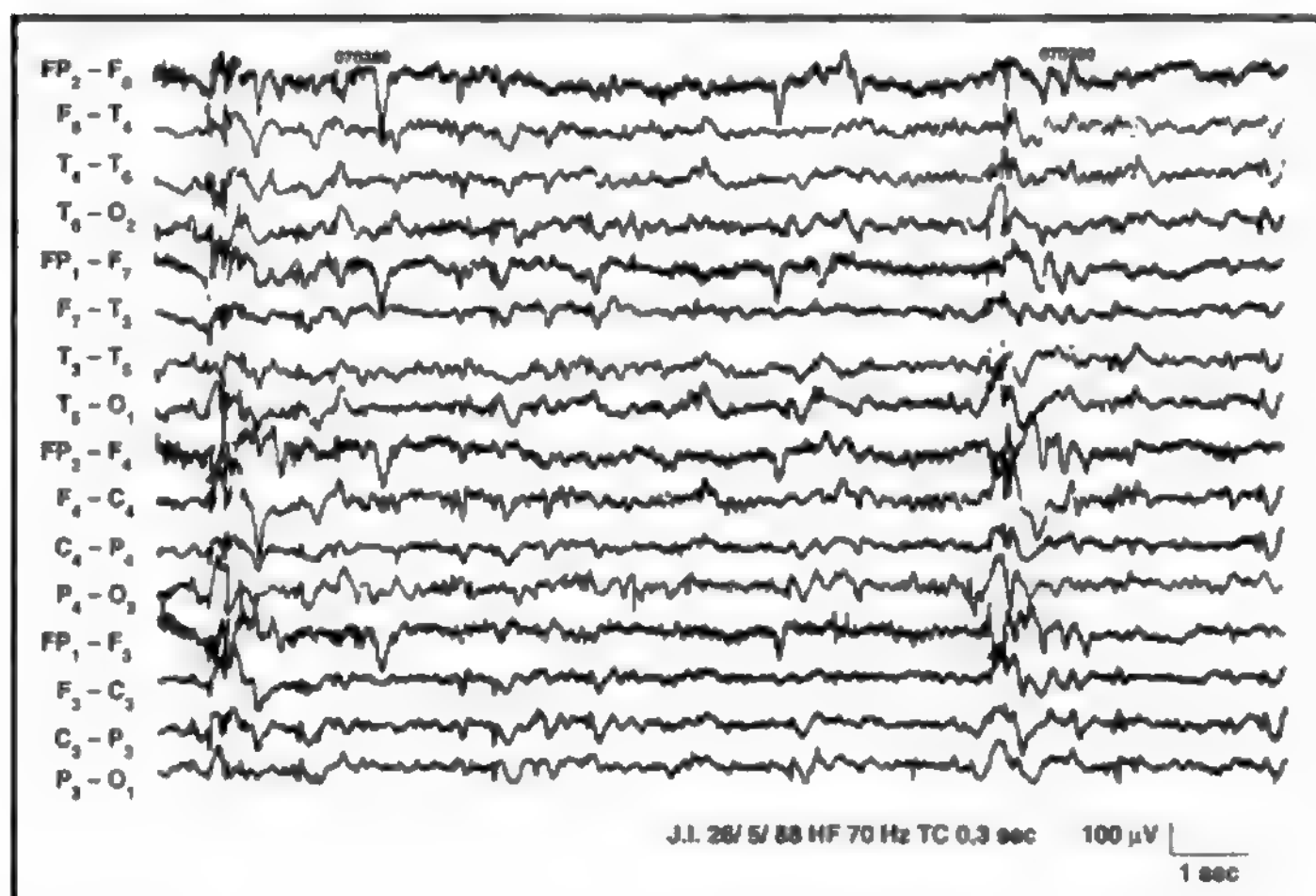
Quadro elettroencefalografico

Le modificazioni del quadro elettroencefalografico (v. ELETTROENCEFALOGRAFIA, V, 958; *2467) nella m. di L. evolvono nel tempo potendosi distinguere tre stadi (Tassinari *et al.*, 1978; Ponsford *et al.*, 1993). Nelle prime fasi della malattia le alterazioni EEG possono essere simili a quelle che si osservano nell'epilessia primaria generalizzata. L'attività EEG di fondo può presentarsi normale con occasionali episodi punta-onda bilaterali sincroni e un'abnorme risposta alla stimolazione luminosa. Nei primi tempi possono anche osservarsi ripide onde prominenti nelle regioni temporale posteriore e occipitale che possono accompagnarsi a fenomeni visivi. Queste alterazioni possono presentarsi prima che si manifestino segni clinici o sintomi sufficienti a confermare la diagnosi e possono costituire una indicazione per una biopsia della cute della regione ascellare (vedi sotto), specialmente in fratelli di individui affetti (Ponsford *et al.*, 1993).

TAB. II. CARATTERISTICHE CLINICHE DEI DUE PAZIENTI DI MALATTIA DI LAFORA CUI SI RIFERISCONO I DATI EEG E ISTOPATOLOGICI DELLE FIGG. 1-5

	Caso 1	Caso 2
Anamnesi familiare positiva	Si	Si
Consanguineità	Genitori cugini primi	Genitori cugini primi
Età delle prime manifestazioni della malattia (anni)	13	16
Segni di comparsa della malattia	GTCS (crisi tonico-cloniche generalizzate)	Fratelli affetti
Età della diagnosi definitiva (anni)	14	19
Anamnesi patologica remota	Convulsioni febbrili all'età di 7/12 anni	Crisi atoniche all'età di 15 anni indotte da stimolo luminoso
Segni neurologici anormali alla comparsa della malattia	Nessuno	Nessuno
Fenomeni visivi	Flash di luce	Nessuno
Tempo di comparsa del mioclono dall'inizio della malattia	Circa un anno	Circa 1,5 anni
Degrado delle capacità intellettive	2 anni dopo l'inizio	Meno di 1 anno dall'inizio
Segni di coinvolgimento di motoneuroni rostrali	4 anni dopo l'inizio	Meno di 1 anno
Segni cerebellari	4 anni dopo l'inizio	3 anni
Segni extrapiramidali	Nessuno	Nessuno
TAC del capo	Atrofia cerebrale generalizzata	Normale all'inizio
Diagnosi istologica	Biopsia epatica	Biopsia cutanea

Fig. 1. EEG del caso 2 alla diagnosi. Si rilevano un'attività di fondo anormale (scarsa di ritmi alfa e aumento diffuso di attività di fondo più lente) e rapide *spikes* multifocali bilaterali.



Col progredire della malattia, l'EEG mostra una più lenta attività di fondo e il ritmo alfa è scarsamente rappre-

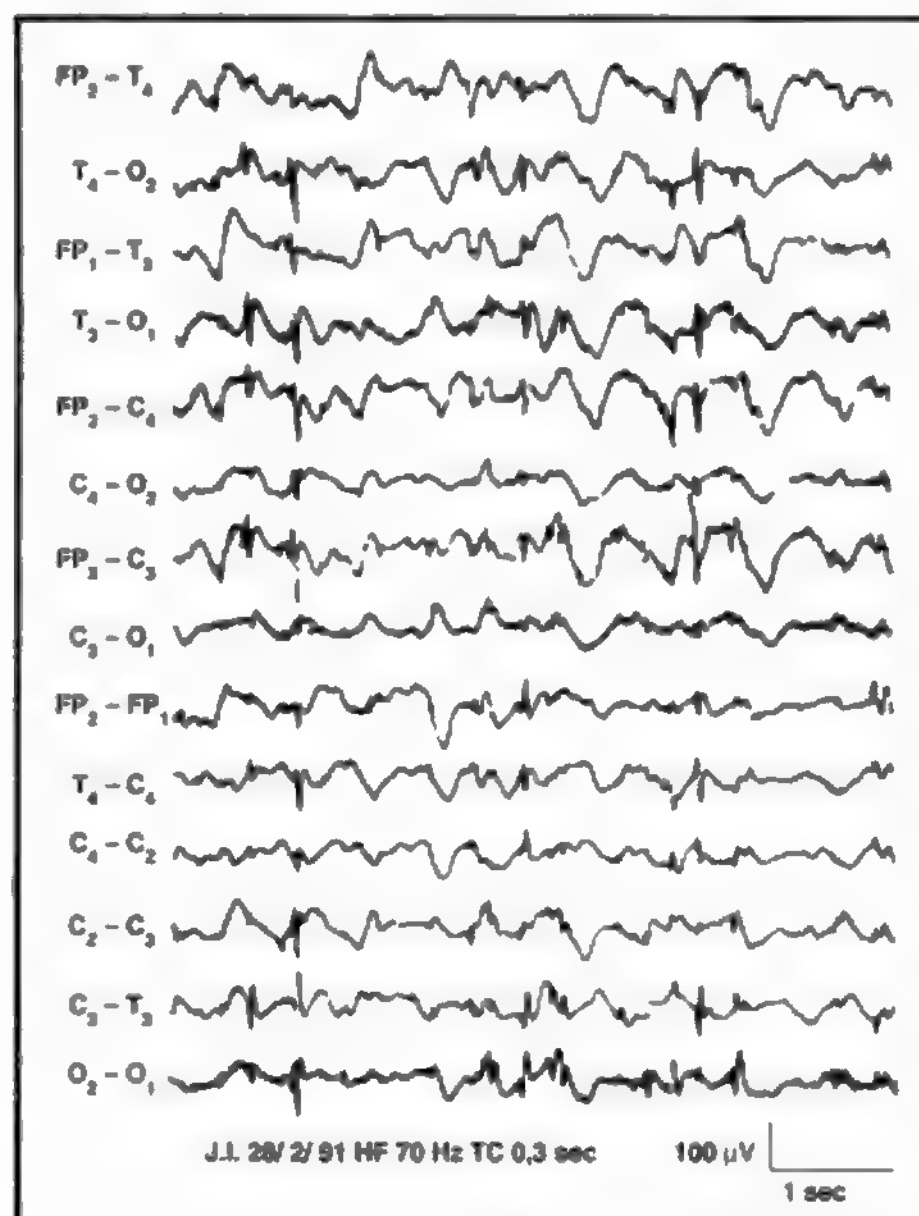


Fig. 2. EEG del caso 2 a 3 anni dalla diagnosi: ritmi alfa non distinguibili e fondo dominato da attività lente, con sovrapposizione di rapide *spikes* multifocali.

sentato. Le scariche sincrone bilaterali diventano meno sincrone e compaiono rapide *spikes* indipendentemente nei due emisferi (fig. 1; caso 2). In entrambi i casi 1 e 2 (tab. II) queste modificazioni erano presenti al momento della diagnosi.

In stadi più avanzati della malattia la nota dominante dell'EEG è una lenta attività di fondo con assenza del ritmo alfa e sovrapposizione di rapide *spikes* multifocali (fig. 2; caso 2). Nei casi 1 e 2 (tab. II) queste alterazioni si osservarono 3 anni dopo la diagnosi.

È di comune osservazione nell'EEG la fotosensibilità e che la stimolazione luminosa può indurre le crisi. Si sono registrate scariche di potenziali localizzate alle regione occipitale in associazione con fenomeni visivi, ma si possono osservare scariche delle zone cerebrali posteriori anche in assenza di tali sintomi. Sia i fenomeni visivi che le scariche posteriori sono rilevabili già nelle fasi iniziali della malattia e possono permettere di differenziarla dall'epilessia benigna generalizzata e indicano altresì la necessità di praticare la biopsia cutanea (Ponsford *et al.*, 1993).

Sono stati descritti potenziali evocati (v.; v.*; v.***) di alto voltaggio somatoestesici, troncoencefalici, uditivi e visivi, ma si tratta di reperti che possono essere anche normali (Berkovic *et al.*, 1993). Per di più, l'esame di questi potenziali può essere di difficile esecuzione su pazienti con mioclonia grave e raramente risulta utile alla diagnosi (Ponsford *et al.*, 1993).

Quadro istopatologico

La m. di L. è caratterizzata istologicamente dall'accumulo anormale di polimeri del glicoso (*corpi di Lafora*) nel citoplasma di cellule del sistema nervoso centrale e periferico, del fegato, dei dotti delle ghiandole sudoripare e di fibre della muscolatura cardiaca e scheletrica. Questi corpi inclusi citoplasmatici sono eosinofili (fig. 3), positivi al reattivo di Schiff-acido periodico (fig. 4) e diastasi-resistenti con aspetto granulare (di «vetro smerigliato»). La colorazione al ferro colloidale, un metodo classico per l'identificazione di mucopolisaccaridi acidi, facilita la loro evidenziazione. La microscopia elettronica (fig. 5) rivela

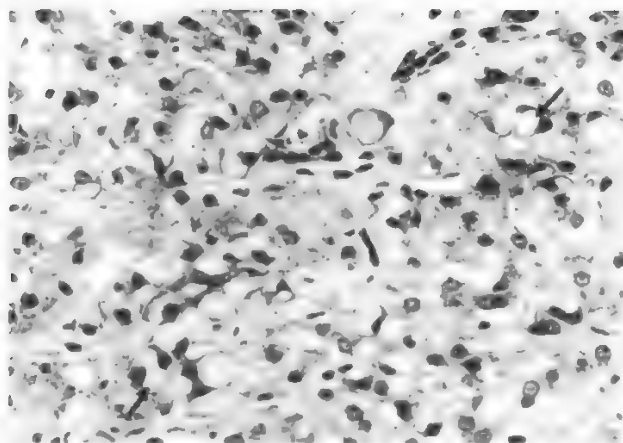


Fig. 3. Biopsia epatica del caso 1 alla diagnosi. Si rilevano «inclusioni» di materiale pallido, eosinofilo, finemente granulare che occupa gran parte del citoplasma degli epatociti adiacenti a un vaso portale. Sezioni in paraffina colorate con ematossilina ed eosina (315 x). (Da Elliott *et al.*, 1992).

che l'aspetto granulare è dovuto anche a dilatazione del reticolo endoplasmatico con presenza di rosette di glicogeno.

Le inclusioni sono sicuramente presenti nelle cellule mioepiteliali degli acini secretori delle ghiandole sudoripare apocrine ed eccrine. Così, la biopsia della cute della regione ascellare è la ricerca iniziale di elezione. La biopsia cutanea è meno invasiva di quella muscolare o epatica ed è altamente affidabile purché il frammento biotico contenga ghiandole sudoripare (Carpenter e Karpatis, 1981; Newton *et al.*, 1987). Falsi negativi sono di solito il risultato di difficoltà tecniche e nei casi dubbi la biopsia dovrebbe essere ripetuta, facendo sì che il campione contenga ghiandole sudoripare e che queste vengano accuratamente esaminate.

Le tipiche alterazioni istologiche possono essere presenti prima che si possa porre una sicura diagnosi clinica e la biopsia cutanea dovrebbe essere presa in considerazione precocemente in ragazzi con EMP di etiologia incerta, par-



Fig. 4. Micrografia ottica di cute del caso 2 alla diagnosi. Colorazione con il metodo di Schiff (acido periodico). Sono visibili corpi di inclusione di glicogeno nei mitocondri delle cellule secretorie nella membrana basale della ghiandola sudoripare apocrine (600 x). (Da Elliott *et al.*, 1992).

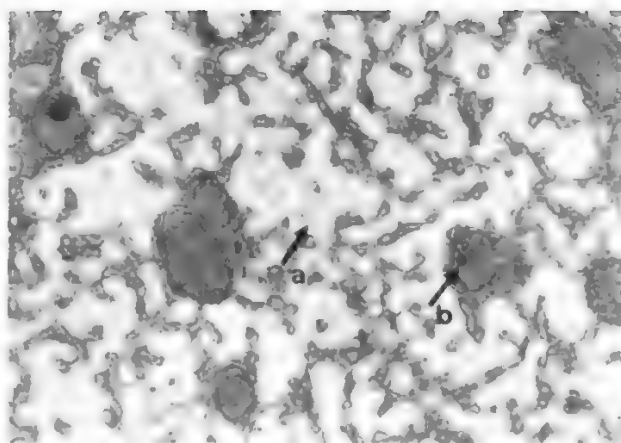


Fig. 5. Micrografia elettronica di fegato del caso 1. Si può rilevare che (a) le «inclusioni» consistono di materiale granulare che si trova libero nel citosol e spinge da parte gli organuli; (b) i mitocondri contengono inclusioni di calcio denso, un reperto non specifico. Il materiale è meno elettrondenso del glicogeno, al quale per altro assomiglia. Una dilatazione del reticolo endoplasmatico e una variabile separazione dei mitocondri spiegano l'aspetto istologico granulare (21.000 x). (Da Elliott *et al.*, 1992).

ticolarmente in presenza di alterazioni dell'EEG (scariche parossistiche posteriori) o in assenza di un'anamnesi familiare positiva.

Basi genetiche

I progressi nella mappatura dei geni dell'epilessia umana hanno portato ad una migliore comprensione della EMP e i loci cromosomali e i difetti genetici ad oggi identificati per questa sindrome sono riportati nella tab. I (Serratosa *et al.*, 1995; Delgado-Escueta *et al.*, 1994; Vesa *et al.*, 1995). La m. di L. si riscontra in tutto il mondo, con ereditarietà autosomica recessiva. Ne possono essere affetti uno o più fratelli e non è infrequente la consanguineità dei genitori. Il gene dell'epilessia mioclonica del tipo Lafora è stato recentemente mappato in corrispondenza di una regione 17cM sul braccio lungo del cromosoma 6 nella zona 6q23-25, fiancheggiata dai markers D6S292 e D6S420 (Serratosa *et al.*, 1995). Questa importante acquisizione potrà permettere le diagnosi prenatale e presintomatica in famiglie di pazienti con m. di L. in cui sia ben stabilito un *linkage* col cromosoma 6q. Le basi biochimiche di questa condizione patologica non sono ancora note. Nessuno dei geni fino ad oggi identificati nella regione 6q23-25 sembra avere verosimilmente un ruolo nella patogenesi della m. di L. Sono necessarie ulteriori indagini per isolare il gene responsabile e identificare il difetto biochimico associato.

Reperti biochimici

Generalmente trascurabile nella m. di L. è l'aiuto che può essere fornito dagli esami di laboratorio di routine. Nel caso 1, il consulto con un pediatra gastroenterologo per il reperto di transaminasi anormali indusse ad effettuare una biopsia epatica che confermò la diagnosi prima dell'insorgenza della mioclonia. Gli abnormi polimeri del glicoso che si accumulano nella m. di L. hanno legami α -1:4 ed α -1:6 e sono biochimicamente identici al polisaccaride che si accumula nella glicogenosi tipo IV. Ma non sono stati individuati difetti nell'enzima ramificante o negli altri enzimi implicati nella sintesi del glicogeno (v.; v.**) e nella glicogenolisi e l'alterazione biochimica di base rimane ancora sconosciuta (Serratosa *et al.*, 1995).

Trattamento terapeutico

Il trattamento della m. di L. è estremamente difficile e frequentemente infruttuoso. Le crisi possono inizialmente essere controllate con farmaci anticonvulsivanti, ma via via che la malattia progredisce gli accessi mioclonici predominano e il loro controllo diventa più difficile. La demenza e i deficit neurologici progrediscono rapidamente e senza soste malgrado la terapia e i pazienti perdono completamente la capacità di provvedere autonomamente ad ogni loro più elementare necessità per mesi o anche per anni prima della morte. I servizi di assistenza per i ragazzi colpiti e le loro famiglie sono scarsi. L'intervento del consulente è essenziale, sia al momento della diagnosi che alla morte ed è particolarmente difficile quando vi siano fratelli che abbiano o che potenzialmente possano sviluppare la malattia. La localizzazione cromosomica del gene difettoso offre l'opportunità di una diagnosi prenatale e presintomatica nel caso di famiglie informate che in precedenza abbiano avuto un loro membro affetto dalla malattia.

L'Autore ringrazia il Dr. S. Ponsford per la lettura degli EEG, il Dr. I. Talbot per la lettura dei preparati istologici e il Prof. S. Tanner e il dr. I. Pye per notizie dettagliate sui pazienti descritti nel presente articolo.

Bibliografia

- Acharya J. N., Satishchandra P., Asha T. et al., *Epilepsia*, 1993, **34** (3), 476.
 Berkovic S. F., Cochius J., Andermann E. et al., *Epilepsia*, 1993, **34** (Suppl. 3), S19.
 Carpenter S., Karpatis G., *Neurology*, 1981, **31**, 1564.
 Delgado-Escueta A. V., Serratosa J. M., Liu A. et al., *Epilepsia*, 1994, **35** (Suppl. 1), S29.
 Elliott E. J., Talbot I. C., Pye I. F. et al., *J. Paediatr. Child Health*, 1992, **28**, 455.
 Kaufman M. A., Dwork A. J., Willson N. J. et al., *Neurology*, 1993, **43** (6), 1246.
 Lafora G. R., *Bull. Gov. Hosp. Insane*, 1911, **3**, 96.
 McNamara J. O., *Genetics of Epilepsy*, in Martin J. B., *Molecular Neurology*, 1998, Scientific American, New York.
 Newton G. A., Sanchez R. L., Swedo T. et al., *Arch. Dermatol.*, 1987, **123**, 1667.
 Norio R., Koskinen M., *Clin. Genet.*, 1979, **15**, 382.
 Ponsford S., Elliott E. J., Pye I., *J. Royal Society Medicine*, 1993, **86**, 597.
 Serratosa J. M., Delgado-Escueta A. V., Posada I. et al., *Hum. Mol. Genet.*, 1995, **4**, 1657.
 Tassinari C. A., Bureau P. M., Dalla B. B. et al., *Rev. Electroencephalogr. Neurophysiol. Clin.*, 1978, **8**, 107.
 Van Heycop Ten Ham M. W., *Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy*, in Vinken P. J., Bruyn G. W. eds., *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 27, 1974, North-Holland Publishing Co., New York, p. 171.
 Vesa J., Hellsten E., Verkruyse L. A. et al., *Nature*, 1995, **376**, 584.

ELIZABETH J. ELLIOTT

LAMIVUDINA

Con il termine lamivudina [L.] si identifica una base nucleosidica (pirimidina) sintetica utilizzata in medicina come farmaco antivirale. Le basi nucleosidiche costituiscono i «mattoni» con i quali sono costruiti gli acidi nucleici che custodiscono il patrimonio genetico di tutti gli organismi viventi, dai virus agli animali superiori fino all'uomo. Chimicamente la L. (fig. 1) rappresenta l'isomero levogiro (–) della tiacitidina, termine chimico che identifica i due isomeri (+ e –) di un analogo eterociclico della base nucleosidica pirimidinica citidina (deossicitidina o 2',3'-dideoossi-3'-tiacitidina in abbreviazione 3TC, altrimenti anche detta Solfo-dideoossi-Citidina o SddC). La L. ha dimostrato in esperimenti di laboratorio di antagonizzare efficientemente la moltiplicazione del virus HIV (virus dell'immunodeficienza umana acquisita, malattia più nota con l'abbreviazione in lingua Inglese, AIDS) e del virus HBV (virus dell'epatite B) (Coates et al., 1991; Dong et al., 1991).

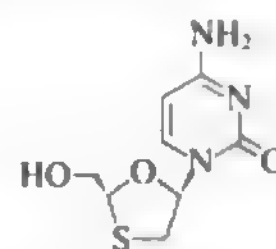


Fig. 1. Formula di struttura della L.

Entrambi questi virus generano le loro progenie virali (replicano) all'interno delle cellule infettate e costruiscono (sintetizzano) gli acidi nucleici dei nuovi virus utilizzando come «mattoni», i nucleosidi (purine e pirimidine) esistenti all'interno della cellula. L'introduzione all'interno delle cellule di un eccesso di analoghi «falsi» dei nucleosidi veri può bloccare la sintesi dei nuovi acidi nucleici virali in quanto i «falsi mattoni» vengono incorporati nelle nuove catene nucleotidiche e ne disturbano la costruzione. Esiste tuttavia una potenziale tossicità di questi composti chimici in quanto la loro utilizzazione può avvenire non solo a scapito degli enzimi virali ma anche degli stessi enzimi cellulari con difetti nella costruzione degli stessi acidi nucleici cellulari. Uno dei meccanismi principali di tossicità è infatti l'inibizione di alcuni dei più importanti enzimi cellulari indispensabili per la respirazione delle cellule, le polimerasi dei mitocondri che sono veri e propri organi respiratori. La ricerca mira quindi all'identificazione e sintesi chimica di analoghi di nucleosidi ad alto indice terapeutico, cioè in grado di bloccare sempre più specificamente gli enzimi virali senza intralciare la normale attività degli enzimi cellulari.

La L. rappresenta un importante passo avanti in questa ricerca, infatti possiede una maggiore attività antivirale del suo isomero chimico destrogiro (+) ed una minore tossicità per le cellule. L'effetto dannoso sulle polimerasi mitocondriali cellulari si è dimostrato in studi di laboratorio molto ridotto. Questi risultati sperimentali hanno tranquillizzato notevolmente dopo le gravi conseguenze tossiche registrate in pazienti trattati con un parente chimico molto prossimo della L. anch'esso analogo delle pirimidine, potente antivirale *in vitro*, ma con un atomo di fluoro anziché di solfo nell'anello eterociclico della pirimidina, detto fluorouridina. Questi risultati hanno stimolato l'uso di questo farmaco in studi clinici controllati per valutarne l'efficacia effettiva nei pazienti con AIDS o epatite cronica B. I risultati preliminari sono incoraggianti in quanto in assenza di maggiori tossicità la L. si è confermata in grado di inibire efficientemente la replicazione di entrambi i virus HIV ed HBV anche *in vivo* (Shaw e Locarnini, 1995; Fried e Sommadossi, 1996). La disponibilità di molteplici farmaci antivirali di questo tipo è estremamente importante in quanto i virus sono in grado di generare efficientemente mutazioni che permettono loro di resistere ai singoli farmaci. Più difficile è infatti la resistenza a più farmaci utilizzati contemporaneamente o in rapida successione. La L. rappresenta quindi uno di questi farmaci che potrà essere utilizzato e sperimentato in studi clinici controllati in combinazione con altri farmaci già efficacemente utilizzati nei pazienti con AIDS (ad es. zidovudina) o con epatite cronica B (ad es. interferone alfa). V. TRANSCRIPTASI INVERSA, INIBITORI DELLA**.

Bibliografia

- Coates J. A. V., Cammack N., Jenkinson H. J. et al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1991, **35**, 1386-1390.

LAMIVUDINA

Dong S. L., Tsai C. H., Shinazi R. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, **88**, 8495-8499.

Fried M. W., Sommadossi J. P., *Antiviral Therapy*, 1996, **1**, 71-76.

Shaw T., Locarnini S. A., *Liver*, 1995, **4**, 169-184.

FERRUCCIO BONINO

LANDAU-KLEFFNER, SINDROME DI

SOMMARIO

Definizione (col. 3027). - **Etiopatogenesi** (col. 3027). - **Sintomatologia** (col. 3027). - **Evoluzione** (col. 3028). - **Trattamento** (col. 3029).

Definizione

La sindrome di Landau-Kleffner [s. di L-K] o afasia epilettica acquisita è una rara malattia del bambino che si esprime con quadri clinici variabili. Sono descritti circa 200 casi in letteratura, di cui più di 170 da Ansink *et al.* (1989). Il quadro più frequente (70% dei casi) è caratterizzato da afasia acquisita, numerosi parossismi all'EEG, marcatamente attivati in sonno, e crisi epilettiche.

Un secondo quadro, pur mantenendo l'afasia e le caratteristiche elettroencefalografiche tipiche, non presenta crisi epilettiche. Infine in pochi casi *borderline* l'afasia si associa soltanto a rari e non caratteristici parossismi all'EEG. In tutti i quadri è frequente l'associazione con disturbi comportamentali secondari.

Etiopatogenesi

L'etiopatogenesi è tuttora sconosciuta; due sono le ipotesi attualmente dibattute. Nella prima si presume l'esistenza di un processo infiammatorio, tipo encefalite focale subacuta, che causa una disfunzione a livello delle connessioni sottocorticali, determinando fenomeni di deafferentazione con conseguente afasia ed epilessia.

Nella seconda, partendo dalla premessa che i parossismi elettroencefalografici e il tipo di epilessia sono assimilabili alle epilessie benigne dell'infanzia, si ritiene che la persistenza dei parossismi sulle regioni coinvolte nei processi del linguaggio provochi una «ablazione funzionale» di queste aree con conseguente afasia. L'estensione dei parossismi ad entrambi gli emisferi renderebbe impossibile un'azione compensatoria da parte dell'emisfero non dominante. A tutt'oggi non vi sono prove definitive a favore dell'una o dell'altra delle due ipotesi.

Sintomatologia

Afasia. - L'afasia insorge in bambini con normale sviluppo psicomotorio e linguistico, di età compresa tra i 18 mesi e i 13 anni, con picco tra i 4 e i 7 anni (inferiore ai 6 anni nel 70% dei casi). Solitamente all'esordio si osserva una agnosia uditiva. Il bambino appare incapace di attribuire valore semantico ai suoni, fino alla totale assenza di risposta a stimoli verbali. Si comporta come se fosse «sordo», e in alcuni casi il distacco dalle persone e dall'ambiente e i comportamenti regressivi sono talmente importanti da determinare problemi di diagnosi differenziale con le psicosi autistiche. Successivamente si instaura una riduzione dell'espressione verbale con stereotipie, perseverazioni e parafrasi che sfocia, nella quasi totalità dei casi, in una abolizione totale del linguaggio.

L'afasia solitamente insorge in maniera graduale nel giro di qualche settimana o mese, ma può manifestarsi anche in maniera acuta in pochi giorni. In una percentuale variabile di casi (1/3) è presente andamento fluttuante.

Disturbi psicomotori. - L'obiettività neurologica non risulta mai significativa, mentre i disturbi dell'attenzione e

del comportamento, soprattutto l'ipercinesia, sono presenti nel 70% dei casi.

Capacità intellettive. - Usualmente non sono compromesse nel corso della malattia.

EEG. - L'EEG in veglia si caratterizza per una normale attività di fondo, e per la presenza di parossismi a tipo punta e punta-onda di grande ampiezza, multifocali, preferenzialmente in sede temporale o, meno spesso, parieto-occipitale senza predominanza emisferica, e con la netta tendenza a presentare fenomeni di diffusione secondaria. In corso di sonno (fig. 1), si osserva una marcata attivazione in frequenza dei parossismi, che si organizzano in scariche di punta-onda diffuse, subcontinue, realizzando costantemente un quadro di «stato di male elettrico in corso di sonno lento» (ESES = *electrical status epilepticus during slow sleep*), che può permanere durante la fase di sonno REM. I parossismi elettroencefalografici hanno andamento fluttuante durante tutta la fase di malattia, e generalmente scompaiono dopo i 15 anni d'età.

Le indagini audiometriche ed i Potenziali Evocati Uditivi risultano sempre normali.

Epilessia. - Nel 70% dei casi le crisi epilettiche completano il quadro clinico; un terzo di questi presenta una sola crisi o, soprattutto all'esordio, uno stato di male. Nel 20% la prima crisi interviene durante il progressivo instaurarsi dell'agnosia uditiva. In alcuni casi le crisi precedono l'afasia. Gli episodi critici, spesso a insorgenza notturna e ben controllabili dalla terapia, hanno semiologia parziale motoria; sono frequenti le crisi atoniche o inibitorie, mentre non vengono descritte crisi toniche.

Indagini per immagini. - Le indagini TAC e RMN non hanno mai evidenziato lesioni anatomiche rilevanti. La PET, condotta in pochi casi, ha dimostrato un alterato metabolismo nelle regioni temporali.

Evoluzione

Il primo segno della sindrome può essere l'afasia o le crisi epilettiche. Una volta instauratasi, l'afasia può essere stabile o avere andamento fluttuante, e la frequenza e il tipo di crisi non influiscono sul suo decorso.

Se l'evoluzione dell'epilessia è costantemente favorevole con scomparsa delle crisi nell'adolescenza, l'afasia può persistere dopo la fine delle crisi e dopo la normalizzazione dell'EEG.

Negli ultimi anni è stata dimostrata l'esistenza di una stretta correlazione tra la comparsa dell'ESES e l'afasia, e il decorso fluttuante dell'afasia riflettere l'andamento dell'ESES. È stato anche osservato che la persistenza dell'ESES, e quindi dell'afasia, per periodi prolungati (> 1 anno), si correla con un recupero parziale delle funzioni interessate; ciò induce a ritenere che un precoce ed adeguato trattamento farmacologico dell'ESES possa aumentare il numero dei casi con prognosi favorevole.

Premesso che l'ESES fa anche parte di un quadro sindromico che associa disturbi cognitivi e crisi epilettiche, la correlazione tra ESES e afasia, presente nella s. di L-K., pone il quesito se ci si trovi di fronte a due entità separate, oppure se si tratti di vari gradi di espressione clinica di una medesima patologia sottostante.

Esisterebbe, inoltre, una importante correlazione tra età di comparsa del disturbo del linguaggio ed evoluzione: sono state osservate sequele severe o moderate solo quando l'esordio si situa prima dei 6 anni d'età. Infine, quando l'afasia ha una durata superiore ai 4 anni il recupero è solo parziale.

Studi con *follow-up* prolungati hanno mostrato che nella maggioranza dei casi il linguaggio viene recuperato dopo l'adolescenza; date le sequele neuropsicologiche e gli in-

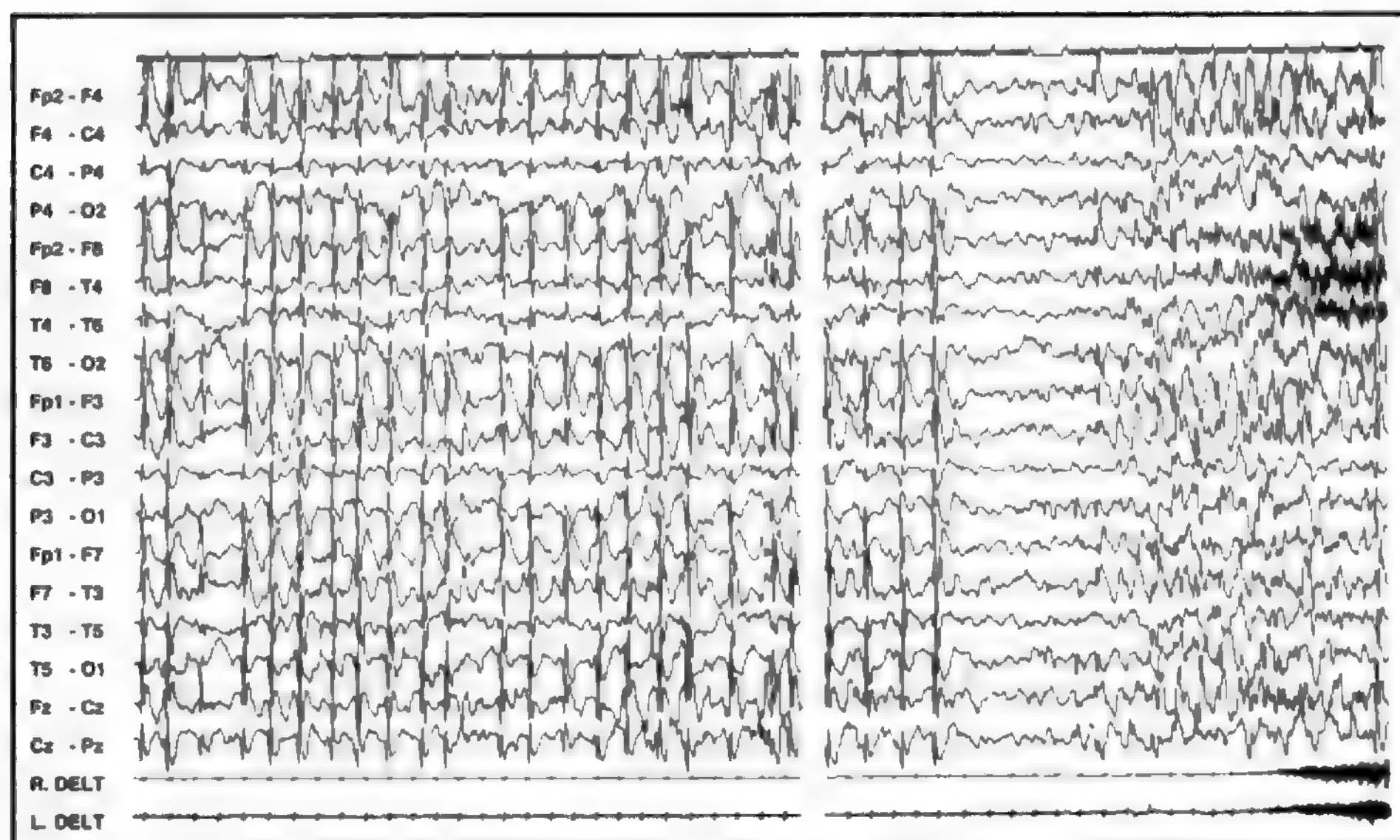


Fig. 1. EEG in bimbo di 7 anni con s. di L-K. A sinistra: quadro di ESES durante il sonno. A destra: al risveglio si osserva la scomparsa dell'ESES e la presenza di parossismi sulle regioni parieto-temporo-occipitali di sinistra.

successi scolastici dovuti alla prolungata afasia, solo il 40-50% dei casi ritorna ad una normale vita sociale e professionale.

La prognosi è naturalmente migliore quando una terapia adeguata è stata iniziata precocemente.

Trattamento

Data la correlazione tra afasia ed anomalie elettroencefalografiche, soprattutto durante il sonno, è indicato un trattamento con farmaci antiepilettici, che deve essere iniziato al più presto.

Tra i farmaci antiepilettici sperimentati, i più efficaci si sono dimostrati l'ac. valproico e l'etosuccimide in associazione, e soprattutto i corticosteroidi per via orale, iniziati ad alte dosi e proseguiti con dosaggio di mantenimento per molti mesi.

Bibliografia

- Ansink B. J. J., Sarphatie H., van Dongen H. R., *Neuropediatrics*, 1989, **20**, 170.
 Beaumanoir A., *The Landau-Kleffner syndrome*, in Roger J., Dravet Ch., Dreifuss F. E., Wolf P. eds., *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*, 2 ed., 1992, J. Libbey, London.
 Behrman R. E., Kliegman R. M., Arvin A. M., *Nelson Textbook of Pediatrics*, 1996, Saunders, Philadelphia.
 Landau W. M., Kleffner F. R., *Neurology*, 1957, **7**, 523.
 Marescaux C., Hirsch E., Finck S. et al., *Epilepsia*, 1990, **31**, 768.
 Paquier P. F., Van Dongen H. R., Loonen C. B., *Arc. Neurol.*, 1992, **49**, 354.
 Tassinari C. A., *Epilepsy with continuous spikes and waves during slow sleep*, in Roger J., Dravet Ch., Dreifuss F. E., Wolf P. eds., *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*, 2 ed., 1992, J. Libbey, London.

VINCENZO SGRO

LANSOPRAZOLO

f. lansoprazole. - l. lansoprazole. - γ. Lansoprazol. - s. lansoprasolo.

SOMMARIO

Farmacologia (col. 3030). - Applicazioni cliniche (col. 3031). - Tollerabilità (col. 3032).

Farmacologia

Il lansoprazolo [I.] (Zoton[®]; Lansox[®]; Limpidex[®]) è un composto benzimidazolico (fig. 1) che, dopo trasformazione nel derivato attivo sulfenamidico, blocca in modo irreversibile il gruppo sulfidrilico dell'enzima H-K ATPasi, anello terminale del processo di produzione di HCl nella cellula parietale gastrica. Analogamente all'omeprazolo (v.*; v.**), anche il I. è instabile in ambiente acido e quindi è formulato in granuli gastroprotetti.

Dopo somministrazione orale la biodisponibilità è di circa l'80% in confronto al 50% dell'omeprazolo. Nel siero è legato per il 97% alle proteine plasmatiche. La concen-

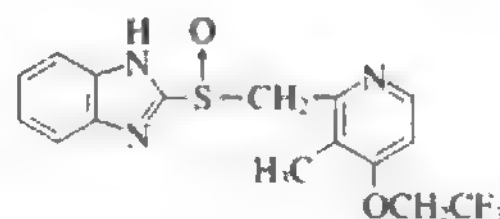


Fig. 1. Formula di struttura del I.

trazione massima, dose dipendente, è raggiunta da 1,5 a 2,2 ore dopo assunzione orale. La concomitante somministrazione di cibo, ma non di antiacidi, ritarda l'assorbimento, senza modificare significativamente la biodisponibilità. Il l. è metabolizzato nel fegato in l. sulfone e l. idrossido ed escreto con la bile e con le urine, con una emivita plasmatica di 1,3-1,7 ore. L'eliminazione è significativamente ritardata nei soggetti anziani e negli epatopatici, ma non nei soggetti con insufficienza renale.

Il l. è un potente inibitore della secrezione acida e stimolata. Una singola dose di 30 mg inibisce l'80-97% della secrezione acida basale. La durata d'azione è tale da consentire una adeguata riduzione della secrezione acida diurna e notturna indipendentemente dall'ora di somministrazione, anche se in alcuni studi si è documentata una più efficiente attività inibitoria nelle 24 ore, con la somministrazione al mattino piuttosto che alla sera dopo cena. Dopo somministrazione multipla l'attività inibitoria inizia una-due ore dopo la prima dose e permane per 2-4 giorni dopo la sospensione.

In volontari sani l'attività inibitoria di 30 mg di l. è risultata sostanzialmente sovrapponibile ad omeprazolo 20 mg. L'aumento del pH intragastrico indotto da somministrazioni multiple di l. determina ipergastrinemia secondaria. Tuttavia dopo un iniziale incremento, le concentrazioni dell'ormone si stabilizzano rimanendo costanti anche dopo anni di somministrazione. In ogni caso l'ipergastrinemia è reversibile entro una-due settimane dalla sospensione del farmaco.

Nei confronti dell'*Helicobacter pylori*, l. possiede *in vitro* una attività battericida 4 volte superiore all'omeprazolo ed una sovrapponibile capacità di inibire l'attività ureasica del batterio.

Applicazioni cliniche

Ulcera peptica. – Alla dose di 15, 30 e 60 mg una volta al giorno, l. si è dimostrato significativamente superiore al placebo nel trattamento a breve termine dell'ulcera duodenale con percentuali di cicatrizzazione complessiva, a 4 settimane, del 91% ed un guadagno terapeutico del 45% nei confronti del placebo. Indagini metanalitiche nei confronti degli H_2 antagonisti (ranitidina 300 mg e famotidina 40 mg) hanno dimostrato una significativa migliore attività cicatrizzante ed analgesica di l. 30 mg sia a 2 che a 4 settimane con un guadagno terapeutico (in termini di cicatrizzazione) rispettivamente del 20 e 10%. Nessuna differenza significativa è stata per altro riscontrata, a due e quattro settimane, nei confronti di omeprazolo 20 mg.

Anche nel trattamento dell'ulcera gastrica, l. 30-60 mg si dimostra più efficace degli H_2 -antagonisti con percentuali di cicatrizzazione variabili dal 78 all'84% dopo 4 settimane e dall'88 al 99% dopo 8 settimane con un guadagno terapeutico medio del 20% e del 10% dopo 4 e 8 settimane. A differenza dell'ulcera duodenale, dopo 1 e 2 mesi di trattamento, si è documentata una miglior attività cicatrizzante di l. 30 mg nei confronti di omeprazolo 20 mg.

Nel trattamento a lungo termine dell'ulcera duodenale, dopo 1 anno di terapia con l. 15 mg, si è documentata una percentuale di recidiva del 16%, significativamente inferiore al 61% con placebo.

Trattamento antinfettivo. – Nella terapia dell'infezione da *H. pylori* (v. *HELICOBACTER PYLORI, INFEZIONI DA***) il l. è stato proposto singolarmente o in associazione con uno (duplice terapia) o due antibiotici (triplice terapia). Del tutto inconsistenti sono le percentuali di eradicazione osservate con solo l.

Per la duplice, tripla, e particolari spunti di interesse riveste l'associazione dell'antisecretivo, 15, 30, 60 mg al giorno,

con claritromicina (250 mg *t.i.d.* o *q.i.d.*) o amoxicillina (1 g *b.i.d.* o *t.i.d.*) per 10-14 giorni. La risposta terapeutica è tuttavia molto variabile con percentuali di successo comprese tra il 40 ed il 90%.

Migliori risultati fornisce la triplice terapia. Gli schemi maggiormente utilizzati prevedono l'associazione di l. con claritromicina 250 mg *b.i.d.-t.i.d.* (oppure amoxicillina 1-2 g/*die*) e metronidazolo 250 mg *t.i.d.-q.i.d.* (oppure tinidazolo 500 mg *b.i.d.*) per una durata di 7-14 giorni.

I risultati ottenuti con le diverse combinazioni sono confortanti per quanto concerne l'eradicazione (con percentuali variabili dal 65 al 98%) e l'accettabilità da parte del paziente (elemento fondamentale per la buona riuscita della terapia).

Esofagite. – Nel trattamento a breve termine dell'esofagite da reflusso l. 30-60 mg al giorno, ha dimostrato una importante attività cicatrizzante ed analgesica variabile dall'80 all'84% dei casi dopo 4 settimane e dal 91 al 93% dopo 8 settimane, sovrapponibile all'omeprazolo 20-40 mg e superiore a quella osservata con ranitidina o cimetidina.

Nel lungo termine la somministrazione continua di l. alla dose di 15-30 mg per 12 mesi si è dimostrata in grado di prevenire la recidiva endoscopica e sintomatica dell'esofagite in una percentuale di casi variabile dall'80 al 90%, significativamente superiore al placebo ed a ranitidina 300 mg due volte al giorno. Come l'omeprazolo, anche l. 30-60 mg al giorno, per periodi fino a 30 mesi, si dimostra efficace nel controllare le manifestazioni cliniche dei pazienti con esofago di Barrett (v. *ESOFAGO**) senza tuttavia condizionare una riduzione delle manifestazioni metaplastiche in esofago.

L'efficacia del l. è stata anche documentata nei pazienti con ulcera o esofagite resistente agli H_2 antagonisti.

In particolare nella terapia di mantenimento dei pazienti con esofagite refrattaria, l. 15-30 mg al giorno si è dimostrato in grado di prevenire la recidiva della malattia rispettivamente nel 45% e 70% dopo 12 mesi, mantenendo una uguale attività profilattica anche dopo 4 anni di osservazione.

Sindrome di Zollinger-Ellison. – Come l'omeprazolo, anche l. si è dimostrato efficace nel trattamento della ipersecrezione acida associata a questa sindrome (v. *ZOLLINGER-ELLISON, SINDROME DI*). Alla dose di 15-90 mg due volte al giorno ed ottimizzata mediante monitoraggio del pH intragastrico, il farmaco è risultato in grado di ridurre l'output acido gastrico a valori inferiori a 10 mEq/h nel 100% dei casi e per periodi superiori a 36 mesi.

Tollerabilità

Ai dosaggi impiegati di 15-60 mg al giorno per 4-8 settimane, l. si è dimostrato ben tollerato, con una incidenza di effetti indesiderati sovrapponibili al placebo o ai farmaci di confronto. Le manifestazioni più frequenti erano a carico del tratto gastroenterico (9%, diarrea), del S.N.C. (cefalea e vertigini), della cute (1,7%) e dell'apparato respiratorio.

Sono stati segnalati casi sporadici di alterazioni della funzionalità epatica, ematocrito, emoglobina, uricemia. Nessuna interferenza è stata evidenziata con il metabolismo surrenalico e tiroideo. Anche il l. si lega ai citocromi del sistema P450; sino ad ora tuttavia è stata segnalata solo una modesta interferenza con il metabolismo della teofillina, ma non del warfarin, prednisone, antipirina, diazepam, fenitoina.

L'ipocloridria indotta da l. si associa costantemente ad ipergastrinemia secondaria (vedi sopra) e, in casi sporadici, a colonizzazione della mucosa duodenale con batteri di origine orale o fecale. Con la somministrazione di 60 mg al giorno per almeno 8 settimane si è osservata stimolazione

(reversibile alla sospensione della terapia) delle cellule enterocromaffini gastriche. A tutt'oggi, tuttavia, non sono state segnalate significative alterazioni della densità o del volume delle cellule argirofiliche della mucosa ossintica gastrica anche dopo 4 anni di trattamento continuativo.

Bibliografia

- Colins Jones D. G., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1993, 7, 56-60.
 Dammann H. G., Von Zur Muhlen A., Balks H. J. et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1993, 7, 55-60.
 Delhotal Landes B., Petite J. P., Flouvat B., *Clin. Pharmacokin.*, 1995, 28, 458-470.
 Poynard Th., Lemaire M., Agostini H., *Eur. J. Gastroenter. Hepat.*, 1995, 7, 661-665.
 Spencer C. M., Faulds D., *Drugs*, 1994, 48, 404-430.

MARCO LAZZARONI E GABRIELE BIANCHI PORRO

LAPAROSCOPIA [v. vol. VIII, coll. 984-990; Agg. I, coll. *4260-4262]

LAPAROSCOPIA DIAGNOSTICA IN URGENZA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3033). - **Tecnica** (col. 3033). - **Indicazioni** (col. 3034). **Traumi**. - **Patologie infiammatorie dell'addome**.

Introduzione

La prima laparoscopia [1.] fu eseguita circa 90 anni or sono quando Kelling e Ott, indipendentemente, osservarono i visceri addominali di un cane usando rispettivamente un cistoscopio ed uno *speculum* (Kelling, 1902). Ulteriore impulso per lo sviluppo di tale indagine si ebbe con Jacobaeus (1911) a Stoccolma, il quale pubblicò la sua esperienza sull'uomo.

Inizialmente la metodica fu applicata nella diagnosi delle patologie epatiche (con biopsia mirata), ma l'introduzione di apparecchiature sofisticate quali ecografia, TAC e RMN avevano fatto cadere in disuso tale procedura diagnostica.

L'interesse dei chirurghi si è risvegliato in seguito ai successi ottenuti negli interventi di colecistectomia video-laparoscopica estendendo così l'applicazione della l. in campo diagnostico sia in chirurgia d'elezione che d'urgenza.

In urgenza, il campo d'applicazione diagnostica della *video-laparoscopia* è principalmente indirizzato alla patologia traumatica ed alla patologia infiammatoria dell'addome, con l'intento di ridurre sia il numero di laparotomie esplorative inutili sia il tempo di degenza (Cuschieri, 1975; Vadalà, 1979).

Tecnica

La l. diagnostica può essere eseguita sia in anestesia locale che generale.

In urgenza si preferisce oggi quella generale sia perché, se si rendesse necessario un intervento chirurgico, si può procedere all'operazione con la tecnica mininvasiva dopo l'apposizione di altri *trocar* (v. CHIRURGIA LAPAROSCOPICA [v.*; v.**]), sia per evitare riflessi vagali durante l'insufflazione di CO₂ (Ballantyne, 1996).

Il paziente pertanto deve essere studiato (esami di laboratorio, radiografia del torace ed elettrocardiogramma) e preparato (tricotomia, disinfezione cutanea, apposizione di sondino naso-gastrico e catetere vescicale) come per qualsiasi procedura chirurgica.

L'ago di Veress per la formazione del pneumoperitoneo, mediante insufflazione di CO₂, viene posizionato in regione periombelicale. Qualora il soggetto presenti cicatrici da pregressi interventi chirurgici (quadranti inferiori, ipocondrio destro) che non permettano l'introduzione dell'ago insufflatore nella sede d'elezione, bisogna scegliere un'altra

via d'accesso libera da aderenze: l'area che nella maggioranza dei casi corrisponde a tale esigenza è l'ipocondrio sinistro.

L'insufflazione di CO₂ viene effettuata ad una pressione intraddominale di 13-15 mmHg. Instaurato il pneumoperitoneo si toglie l'ago di Veress e si pratica un'incisione cutanea (1,5 cm) e si introduce un *trocar* da 10 mm attraverso il quale si immette il laparoscopio collegato alla telecamera.

Dopo ciò si passa ad ispezionare accuratamente tutta la cavità addominale. Per esplorare il fegato e la colecisti il paziente deve essere posto in anti-Trendelenburg; per stomaco, milza, testa del pancreas e duodeno in decubito laterale; per la parte inferiore dell'addome e la pelvi in Trendelenburg (Ballantyne, 1996).

Controindicazioni assolute all'indagine laparoscopica sono: infezioni della parete addominale; laparoceli; gravidanza; grave scompenso cardiocircolatorio.

Controindicazioni relative sono: pregressi interventi addominali; obesità (*trocar* e strumenti non abbastanza lunghi per l'esplorazione della cavità).

Indicazioni

Traumi

Nel campo della traumatologia addominale bisogna distinguere se si tratta di traumi chiusi od aperti.

Nei primi ciò che si richiede principalmente alla l. è di stabilire l'integrità o meno del peritoneo, l'eventuale presenza di lesioni viscerali, di versamenti ematici, biliari o del contenuto intestinale: l'esclusione di questi eventi permette di evitare il ricorso ad inutili laparotomie alle quali la letteratura assegna una frequenza che può superare il 20% (Cirino, 1994).

La l. ha l'indubbio vantaggio di consentire una valutazione quali-quantitativa di un versamento ematico endoadominale e può indirizzare verso la fonte di un sanguinamento (Ruddock, 1937).

Una valutazione dell'entità del versamento è sempre difficile e deve essere sempre considerata in accordo alle condizioni emodinamiche del paziente; a tal proposito si possono schematizzare quattro situazioni.

1) Pazienti «senza emoperitoneo»: dopo la visualizzazione della cavità peritoneale non si reperta né sangue né contenuto intestinale; la cavità viene irrigata ed il materiale aspirato è chiaro. Il paziente non ha lesioni addominali.

2) Pazienti con «scarso emoperitoneo»: viene visualizzata una piccola quantità di sangue nelle docce parietocoliche o che stria le anse intestinali. Se dopo l'iniezione e l'aspirazione non si nota più la presenza di sangue la l. può essere interrotta, si può passare al trattamento di eventuali altre lesioni avendo cura di lasciare un drenaggio e di tenere il paziente sotto osservazione.

3) Pazienti con un «moderato emoperitoneo»: si reperta una discreta quantità di sangue (almeno 10 mm d'altezza) nelle docce parietocoliche che si riforma dopo l'aspirazione (fig. 1). Se l'origine del sanguinamento viene scoperta, può



Fig. 1. Emoperitoneo: presenza di sangue nella doccia parietocolica di sinistra.

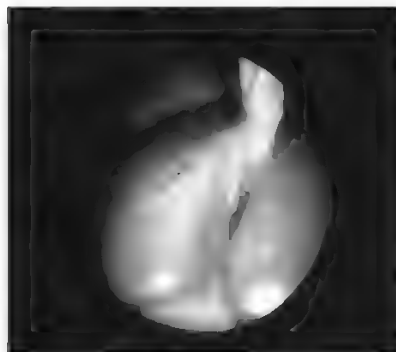


Fig. 2. Piccola lacerazione epatica.

essere trattato laparoscopicamente tramite elettrocoagulazione o apposizione di colla di fibrina, come avviene nelle lacerazioni della parete anteriore del fegato (fig. 2), oppure tramite sutura nel caso delle lesioni del mesentere. Se il sangue sgorga abbondantemente si deve ricorrere immediatamente alla laparotomia.

4) Pazienti con «grave emoperitoneo»: se viene aspirato sangue dall'ago di Veress si deve eseguire rapidamente la laparotomia, allo stesso modo quando si osserva laparoscopicamente una grande quantità di versamento ematico libero tra le anse intestinali, nelle docce parietocoliche o nel Douglas. Se la milza è facilmente visualizzata e coperta dall'omento è molto probabile che si sia in presenza di una rottura splenica.

Nel 1965 Root propose il lavaggio peritoneale (v.*) quale sistema per valutare la presenza di versamenti ematici endoaddominali; Berci (1976) sostiene che con questa metodica si corre il rischio di eseguire laparotomie non necessarie nel 15-20% dei casi perché l'emorragia può essersi fermata spontaneamente oppure perché il sangue che si riscontra può essere dovuto all'introduzione del catetere. Il limite del lavaggio peritoneale, oltre alla presenza di falsi positivi e negativi, è che esso ci può dare indicazioni sulla presenza di emoperitoneo, ma non ne stabilisce la fonte.

L'avvento dell'ecografia e della TAC si è dimostrato utile nella diagnosi di lesioni di organi parenchimosi avendo alta sensibilità e specificità, pur tuttavia anche la stessa TAC in presenza di lesioni di organi cavi dà qualche falso negativo.

La l., in quanto metodica diretta, trova la sua più valida applicazione a livello diagnostico nella selezione dei casi dubbi.

Nei traumatizzati cranici con perdita di coscienza e nei politraumatizzati con un quadro emodinamico preoccupante che contrasta con un'obiettività clinica e strumentale nella norma e nei quali l'approccio con il paziente è multidisciplinare, la l. permette di stabilire un appropriato ordine di priorità di interventi che può influenzare significativamente in senso favorevole la prognosi, dando anche notizie sull'eventuale via di aggressione chirurgica. In tali pazienti, in cui, per le lesioni craniche, venendo a mancare clinicamente la contrattura addominale, può passare misconosciuta una perforazione intestinale, questa si mette facilmente in evidenza con la l. per la presenza di contenuto intestinale nel Douglas e, nei casi in cui sia trascorso un considerevole lasso di tempo dall'evento, riscontrando un tratto intestinale eritematoso che ha contratto aderenze

cosicché una valutazione dell'addome può essere molto difficile.

Se dall'anamnesi, dal sito della ferita o dalle condizioni emodinamiche del paziente c'è il fondato sospetto di una lesione addominale, egli deve immediatamente essere sottoposto ad una laparotomia.

Nelle ferite da punta, se il sito della ferita induce a sospettare una perforazione del peritoneo e ciò non viene sufficientemente confermato dall'esame clinico e dai sintomi, è il caso di eseguire una l. soprattutto alla luce del fatto che la TAC non ci dà utili indicazioni nel caso di perforazioni intestinali presenti in circa il 50% dei pazienti (Cirino *et al.*, 1994). Si ispeziona il peritoneo con il laparoscopia; se esso appare integro, ovviamente non vi sarà nessuna lesione interna; al contrario, se risulta perforato si va alla ricerca di una eventuale lesione dei visceri addominali.

Quando non si riscontra nessun danno, il paziente può semplicemente essere tenuto sotto osservazione dopo aver introdotto un drenaggio; altrimenti, in caso di lacerazione, questa può essere trattata laparoscopicamente.

Di regola la l. non ha nessun ruolo nella valutazione e nel trattamento delle «ferite da arma da fuoco», a meno che il tragitto del proiettile non sia parallelo alla parete addominale, come più facilmente avviene nei soggetti obesi, oppure nel caso di ferite da proiettili di piccolo calibro. In questi casi la ferita viene temporaneamente suturata e può essere eseguita la l.

Patologie infiammatorie dell'addome

L'obiettivo verso il quale punta la moderna *video-laparoscopia* è quello di accomunare l'intervento diagnostico ad un effetto terapeutico efficace. Tali sforzi hanno trovato uno sbocco applicativo in un certo numero di situazioni cliniche che riguardano la patologia infiammatoria dell'addome con risultati confortanti.

Una delle più valide indicazioni della l. in urgenza è rappresentata dalle sindromi dolorose addominali della giovane donna in età fertile dove, in alcuni casi dubbi, si pone il problema della diagnosi differenziale di appendicite.

L'esplorazione laparoscopica della cavità peritoneale permette di escludere la presenza di patologie annessiali, di focolai di endometrite, di gravidanze extrauterine, di flogosi degli organi pelvici e di eseguire dei prelievi di campioni di tessuto da sottoporre a coltura aerobia ed anaerobia, oppure di evidenziare affezioni infiammatorie della regione ileo-cecale o patologie più rare come l'infiammazione di un diverticolo di Meckel (Cirino *et al.*, 1994).

Nel caso in cui si riscontri un quadro di appendicite acuta, alla diagnosi si affianca l'intervento per via laparoscopica che trova un'indicazione elettiva nei soggetti obesi e nelle appendicitis retro-cecali in quanto la visione offerta è molto ampia; oltre tutto l'appendicectomia eseguita per via laparoscopica (v. APPENDICE CECALE**) offre una più rapida possibilità di recupero postoperatorio e diminuisce l'incidenza di formazione di ascessi della parete addominale e soprattutto di briglie aderenziali che possono influire negativamente sulla fertilità della donna.

Un altro aspetto interessante della *video-laparoscopia* è rappresentato dalla possibilità di effettuare un intervento in pazienti affetti da colecistite acuta, anche se è doveroso ammettere che il trattamento tradizionale è meno laborioso per la frequente presenza di aderenze pericolecistiche e di edema che rendono più difficoltosa la dissezione degli elementi vascolari e biliari attraverso la chirurgia mininvasiva (Cuschieri, 1975).

Nelle «sindromi peritonitiche» l'esplorazione laparoscopica, oltre a fornire la certezza diagnostica sulle cause determinanti, permette l'esecuzione del lavaggio peritoneale

La l. nell'addome il ruolo della l. è limitato solo a casi selezionati. Spesso i pazienti con trauma addominale vanno sottoposti a lavaggio o drenaggio

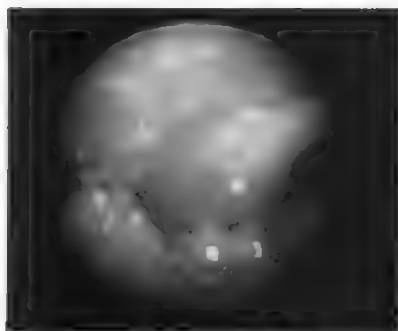


Fig. 3. Pancreatite acuta: presenza di macchie ceree.

e di intervenire terapeutamente qualora la causa di peritonite sia dovuta ad una flogosi appendicolare, colecistica od alla perforazione di un'ulcera, specie per quelle della porzione anteriore del bulbo duodenale.

Anche le «pancreatiti» acute hanno un riscontro laparoscopico; la presenza di succo pancreatico ricco di enzimi, le macchie ceree (fig. 3), la peritonite enzimatica e l'edema della zona pancreatico-coledocica sono tutti elementi che ci consentono di effettuare la diagnosi, ma anche un primo trattamento, instaurando un lavaggio peritoneale continuo che secondo l'esperienza di Ranson ha notevole validità.

Infine, anche le «occlusioni intestinali» possono offrire un campo di studio nella diagnosi e nel trattamento di eventuali aderenze; l'esame laparoscopico dirime il dubbio se si tratti di un'occlusione meccanica o di una occlusione funzionale.

Nel caso si tratti di un'occlusione meccanica, se questa è determinata dallo strangolamento di una briglia aderenziale si può eseguire la lisi per via endoscopica, mentre quando l'occlusione è di tipo neoplastico, l'indagine ci consente la stadiazione della neoplasia e nel contempo ci fornisce notizie utili all'eventuale trattamento chirurgico.

Nel caso ci si trovi di fronte ad un ileo paralitico si può andare alla ricerca della patologia primitiva che lo ha determinato.

In conclusione si può affermare che l'indagine video-laparoscopica si è ormai affermata conquistando un ruolo determinante in campo diagnostico sia in chirurgia generale che d'urgenza. Pertanto, specie in urgenza, l'uso routinario, nei casi dubbi, riduce i tempi d'attesa del paziente consentendo così un rapido trattamento con l'indubbio vantaggio di poter programmare le relative priorità.

Bibliografia

- Ballantyne G. H., Leahy P. F., Moblin I. M., *Chirurgia laparoscopica*, 1996, Verduci Editore, Roma.
 Berci G., *Laparoscopy in general surgery*, 1976, Appleton, Norwalk.
 Cirino E., Vadalà G., Bianca T., *Atti 96° Congresso Soc. It. Chirurgia*, 1994, 2, 334.
 Cuschieri A., *Ann. R. Col. Surg.*, 1975, 57, 33.
 Jacobaeus H. C., *Munch. Med. Wochen.*, 1911, 58, 2017.
 Kelling G., *Verhandlung deutscher Naturforscher und Aerzte*, 1902, Vogel, Leipzig.
 Ruddock C., *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1937, 64, 523.
 Vadalà G., *Chirurgia Italiana*, 1979, 31, 481.

ERCOLE CIRINO, GIUSEPPE VADALÀ E ANTONINO BUFFONE

LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA

Sin.: chirurgia laparoscopica ginecologica. - *1. surgical gynecologic laparoscopy; operative gynecologic laparoscopy.*

SOMMARIO

Introduzione (col. 3038). - **Sterilizzazione tubarica** (col. 3038). - **Gravidanza tubarica** (col. 3040): **Trattamento chirurgico conserva-**

LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA

tivo. - **Trattamento chirurgico radicale.** - **Terapia medica locale.** - **Complicanze.** - **Trattamento della sterilità da fattore tubarico** (col. 3044): **Adestolisi.** - **Neosalpingostomia.** - **Fimbrioplastica.** - **Anastomosi tubo-tubarica.** - **Malattia infiammatoria pelvica e ascessi tubo-ovarici** (col. 3046). - **Chirurgia dell'ovaio** (col. 3050): **Aspirazione, cistoscopia, fenestrazione.** - **Cistectomia ovarica.** - **Ovariectomia e annessiectomia.** - **Torsione dell'ovaio.** - **Cisti paraovariche.** - **Sindrome dell'ovaio policistico.** - **Endometriosi** (col. 3055): **Escissione.** - **Coagulazione.** - **Vaporizzazione.** - **Scelta del trattamento.** - **Miomectomia** (col. 3060). - **Ablazione dei legamenti utero-sacrali (LUNA) e neurectomia presacrale** (col. 3061): **LUNA (Laparoscopic Utero-Sacral Nerve Ablation).** - **Neurectomia presacrale.** - **Isteroressi** (col. 3063). - **Isterectomia** (col. 3065). - **Uroginecologia (trattamento della stress incontinence)** (col. 3068). - **Oncologia ginecologica** (col. 3069): **Linfadenectomia.** - **Trasposizione ovarica.** - **Isterectomia radicale laparoscopica e isterectomia radicale vaginale assistita per via laparoscopica.** - **Annessiectomia.** - **Omentectomia.**

Introduzione

La moderna laparoscopia chirurgica ginecologica [l. c. g.] assicura una via di accesso alternativa agli organi pelvici.

Negli ultimi dieci anni è stato dimostrato che quasi tutti gli interventi chirurgici ginecologici possono essere eseguiti per via laparoscopica (Gomel e Taylor, 1995). Recentemente sono state pubblicate nella letteratura internazionale alcune segnalazioni preliminari relative all'impiego della laparoscopia chirurgica durante la gravidanza (Neiswender e Toub, 1997; Reedy *et al.*, 1997; Morice *et al.*, 1997). È opportuno sottolineare che la tecnica operatoria laparoscopica non differisce, sostanzialmente, da quella adoperata negli interventi eseguiti per via laparotomica.

I vantaggi della l. c. g. sono rappresentati: dall'assenza del trauma legato alle ampie incisioni addominali, dalla riduzione dell'entità del dolore post-operatorio e dalla precoce ripresa, da parte della paziente, della normale attività che comporta una riduzione del periodo di degenza e di convalescenza (Quinlan *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 1998).

Gli svantaggi sono rappresentati dalla necessità per i chirurghi di acquisire esperienza con una nuova tecnica e dall'aumento dei tempi operatori (Chapron *et al.*, 1997a).

Negli ultimi anni si è diffusa l'errata convinzione che la chirurgia laparoscopica sia una chirurgia minore. La diffusione di questa convinzione è stata facilitata dall'intervento dei «media» e da coloro che hanno descritto questa tecnica come «minimamente invasiva». È appena il caso di ricordare che un intervento è ugualmente invasivo e rischioso indipendentemente dalla via, laparotomica o laparoscopica, attraverso la quale viene eseguito (Gomel e Taylor, 1995).

Per quanto concerne lo strumentario e le tecniche generali impiegate si rinvia alle voci CHIRURGIA LAPAROSCOPICA* (coll. *7645-7649) e CHIRURGIA LAPAROSCOPICA** (coll. **1166-1168). Nella fig. 1 viene riportata la sede di inserzione del trocar principale e dei trocars ausiliari nella l. c. g.

Sterilizzazione tubarica

A partire dai primi anni '70 le tecniche per la sterilizzazione tubarica sono divenute essenzialmente laparoscopiche. Attualmente queste tecniche (tab. I) rappresentano i metodi di sterilizzazione più comuni nel Nord America (più di 200.000 interventi/anno negli Stati Uniti).

TAB. I. METODI DI STERILIZZAZIONE TUBARICA

Metodi elettrici	Metodi meccanici
Elettrochirurgia	Clips
monopolare	di Hulka
bipolare	di Filshie
Termocoagulazione	Anelli tubarici

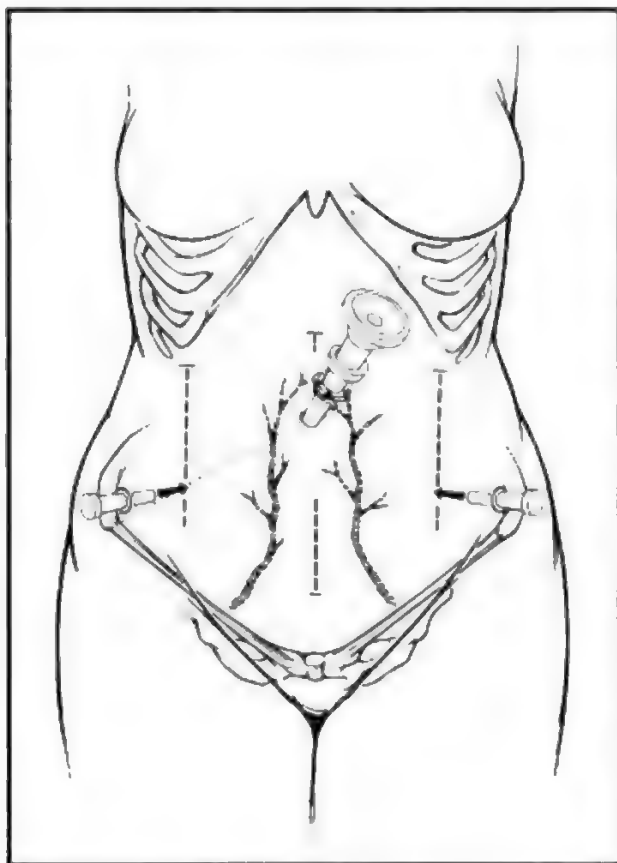


Fig. 1. Laparoscopia operatoria: sedi di inserzione del trocar principale e dei trocar ausiliari. Le linee tratteggiate indicano altre sedi di inserzione dei trocar ausiliari.

La sterilizzazione tubarica può essere effettuata con mezzi elettrici o meccanici.

La sterilizzazione tubarica può essere ottenuta con l'elettrochirurgia utilizzando la corrente monopolare o quella bipolare.

Con la prima, ormai obsoleta, si può coagulare e quindi resecare la tuba. Questa è stata la prima e più impiegata tecnica (Palmer, 1962), insieme alla sola coagulazione tubarica, fino al 1973 quando Rioux (Rioux e Yuzpe, 1979), propose l'uso della corrente bipolare. Questo sistema differisce dal metodo unipolare in quanto la pinza con cui si afferra e si coagula la tuba reca sia l'elettrodo attivo che quello di ritorno. In questo modo la corrente passa selettivamente solo attraverso il tessuto afferrato dalle pinze. Mentre la corrente unipolare, disperdendosi anche nel mesosalpinge, compromette la vascolarizzazione di tutto il segmento tubarico interessato, provocandone così la distruzione, la corrente bipolare può, a causa dell'effetto limitato, risparmiare la mucosa.

I tassi di fallimento delle due tecniche sono sovrapponibili e nell'ordine del 2 per mille. Per evitare i danni legati all'impiego della corrente elettrica è stata messa a punto una tecnica di termocoagulazione. Si utilizzano le pinze a coccodrillo, le cui branche vengono scaldate con la corrente elettrica che in tal modo non viene trasmessa alla paziente. I risultati sono sovrapponibili mentre il tasso di complicanze risulta inferiore.

I dispositivi meccanici attualmente in uso sono il risultato di un continuo processo di sviluppo. La clip di Hulka (1975) è stata progettata per essere applicata ad angolo

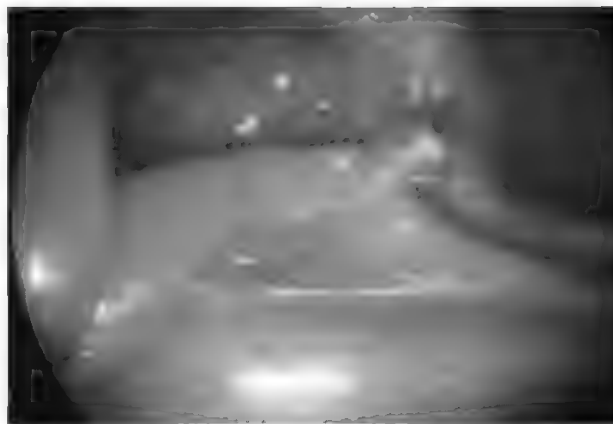


Fig. 2. Laparoscopia operatoria: sterilizzazione tubarica mediante applicazione di clips di Hulka. (Osservazione degli AA.).

retto alla porzione istmica della tuba a circa 2-2,5 cm dalla giunzione utero-tubarica (fig. 2).

Se questi criteri vengono rispettati, il tasso di fallimento di questo metodo è pari al 2-3 per mille (Rioux e Yuzpe, 1979). In alternativa si possono utilizzare le clips secondo Filshie, le cui branche sono in titanio ricoperte di silastic, in modo da comprimere la tuba senza rischiare di lacerarla. Pur richiedendo un altro strumento per l'applicazione, e quindi una tecnica diversa, i risultati sono analoghi a quelli ottenuti con le clips di Hulka.

È possibile utilizzare, infine, gli anelli tubarici (Yoon e King, 1975). Si tratta di anelli di silicone baritato che vengono applicati su un'ansa tubarica preformata (fig. 3). La semplicità della procedura e la quasi totale assenza di complicazioni rendono accettabile il tasso di fallimenti più elevato, pari al 3,3 per mille (Gomel e Taylor, 1995).

Gravidanza tubarica

Il trattamento laparoscopico della gravidanza tubarica è stato il primo atto chirurgico endoscopico perfettamente codificato già a partire dal 1975 (Bruhat *et al.*, 1980; Dubuisson *et al.*, 1978). Attualmente tutte le gravidanze tubariche potrebbero essere trattate laparoscopicamente con un approccio radicale o conservativo. Esistono classicamente alcune controindicazioni relative quali: l'ematocele incistato, lo stato di shock, l'obesità severa, la sindrome aderenziale pelvica di grado molto elevato, la gravidanza tubarica interstiziale. Ormai alcune di queste sono, in base all'esperienza dell'operatore ed alle strutture nelle quali lavora, da considerarsi sorpassate (Gargiulo *et al.*, 1994). Recentemente abbiamo proposto per primi (Giordano *et al.*, 1994) l'impiego di sonde ecografiche laparoscopiche che consentono di localizzare con estrema precisione la sede di impianto della gravidanza tubarica e di adottare la strategia terapeutica più adeguata.

Il trattamento per via laparoscopica può essere medico (iniezione di metotressato) o chirurgico di tipo conservativo (salpingotomia lineare) o radicale (salpingectomia).

Trattamento chirurgico conservativo

La tecnica consiste, dopo aver ben lavato il cavo peritoneale ed aver messo in evidenza la gravidanza tubarica (fig. 4), nell'iniettare nel mesosalpinge in vicinanza della sede di impianto una sostanza vasocostrittrice derivata dalla vasopressina: la 8-ornitina-vasopressina (POR-8) nella diluizione di sicurezza di 1 a 60 in soluzione fisiologica (Manhes *et al.*, 1983). In un secondo tempo si pratica,

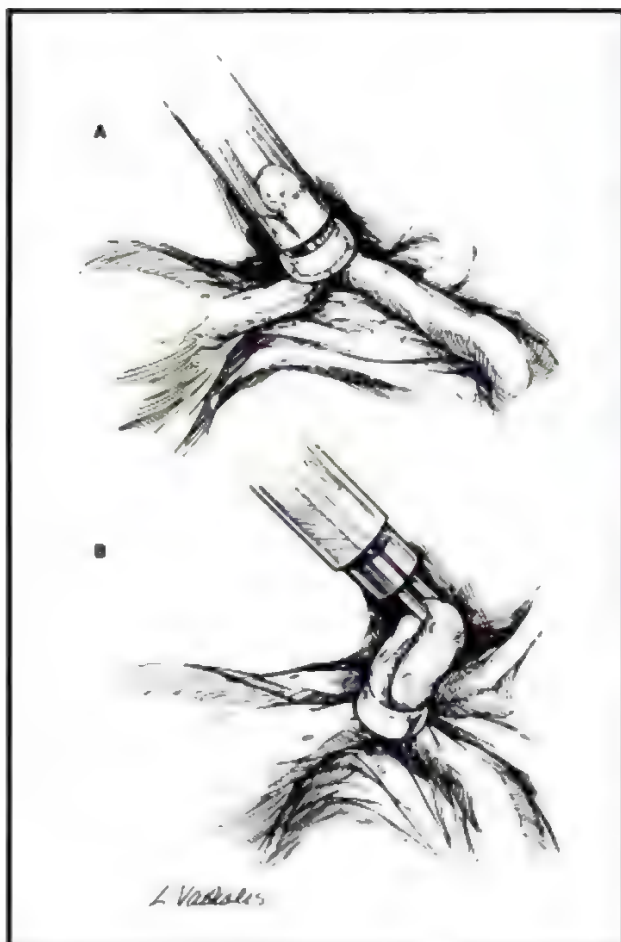


Fig. 3. Applicatione dell'anello tubarico. A) Trasferimento dell'anello sulla tuba. B) Ispezione della tuba dopo l'applicazione dell'anello. (Da Gomel e Taylor, 1995).

sul bordo antimesenterico, una salpingotomia lineare tramite la quale si introduce l'aspiratore per rimuovere il materiale ovulare. Con ripetuti lavaggi ed aspirazioni ci si assicura dello svuotamento della tuba e, dopo una attenta toilette peritoneale, non si effettua alcuna sutura dei bordi della salpingotomia. Può essere utile l'apposizione di colla di fibrina su queste superfici cruentate per ridurre le probabilità di insorgenza delle aderenze post-operatorie. Alcuni AA. (Mettler e Semm, 1988; Donnez e Nisolle, 1989) lasciano un drenaggio nel Douglas per almeno 24 ore, ma a noi e ad altri (Gomel *et al.*, 1986) pare che ciò sia superfluo.

Questo trattamento conservativo può essere utilizzato nel 95% delle gravidanze tubariche con tuba ancora integra tranne nel caso in cui l'emoperitoneo sia superiore a 2 litri o il diametro della gravidanza sia maggiore di 6 cm.

Trattamento chirurgico radicale

Consiste nella salpingectomia ed è indicato in alcune circostanze: quando la paziente non sia interessata a conservare la fertilità, quando la tuba è irreparabilmente danneggiata, o sia stata già interessata da una precedente gravidanza tubarica, quando la gravidanza si sviluppa dopo un intervento di salpingotomia.

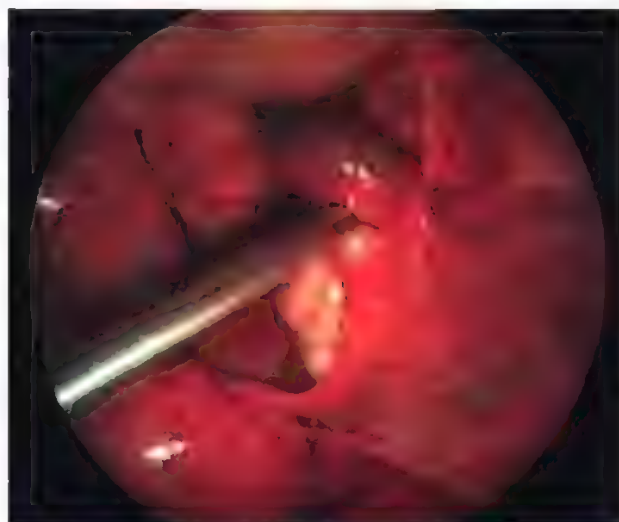


Fig. 4. Gravidanza tubarica sinistra: quadro laparoscopico. (Osservazione degli AA.).

Dopo aver iniettato in tutto il mesosalpinge il POR-8 si procede alla coagulazione, con la corrente bipolare o con la termocoagulazione, della regione istmo-cornuale che viene quindi sezionata con le forbici.

Successivamente il legamento tubo-ovarico viene afferrato, coagulato e sezionato. L'escissione completa della tuba viene ottenuta con una serie di manovre di coagulazione e di sezione che interessano tutto il mesosalpinge (fig. 5). La tuba viene estratta, se necessario, all'interno di un sacchetto endoscopico, attraverso uno dei trocar o attraverso l'incisione sovrapubica, che viene ampliata, o attraverso una colpotomia.

Terapia medica locale

Consiste nell'infiltrare la gravidanza tubarica con una soluzione contenente 20-40 mg di metotressato (Pansky *et al.*, 1989). Questa metodica viene utilizzata nelle gravidanze tubariche non rotte che risultano di difficile accesso per la presenza di una obesità di notevole entità o di una estesa sindrome aderenziale e nelle gravidanze tubariche interstiziali.

Complicanze

Le complicanze intraoperatorie sono legate ai rischi emodinamici causati dall'emorragia o dall'uso dei vasocostrittori. Si possono inoltre osservare lesioni a carico degli organi circostanti, causate da manovre scorrette o dall'impiego degli strumenti elettrici. Tra quelle post-operatorie la più frequente è il fallimento del trattamento, legato alla persistenza del materiale trofoblastico. La frequenza varia a seconda del tipo di tecnica utilizzata. Dopo un intervento di salpingectomia è inferiore allo 0,5% e può essere la conseguenza di una disseminazione peritoneale del materiale trofoblastico. Con la salpingotomia il tasso di fallimento si aggira intorno al 6%, a causa dell'incompleta rimozione del materiale endotubarico, mentre con il metotressato la percentuale è compresa tra il 10 e il 15% (Yao e Tulandi, 1997).

Il monitoraggio di questa complicanza viene effettuato con il ricorso ai dosaggi seriati della sub-unità beta-HCG: nel caso in cui i valori della beta-HCG non regrediscono nella maniera attesa è possibile la somministrazione del metotressato per via intramuscolare (Stovall e Ling, 1993).

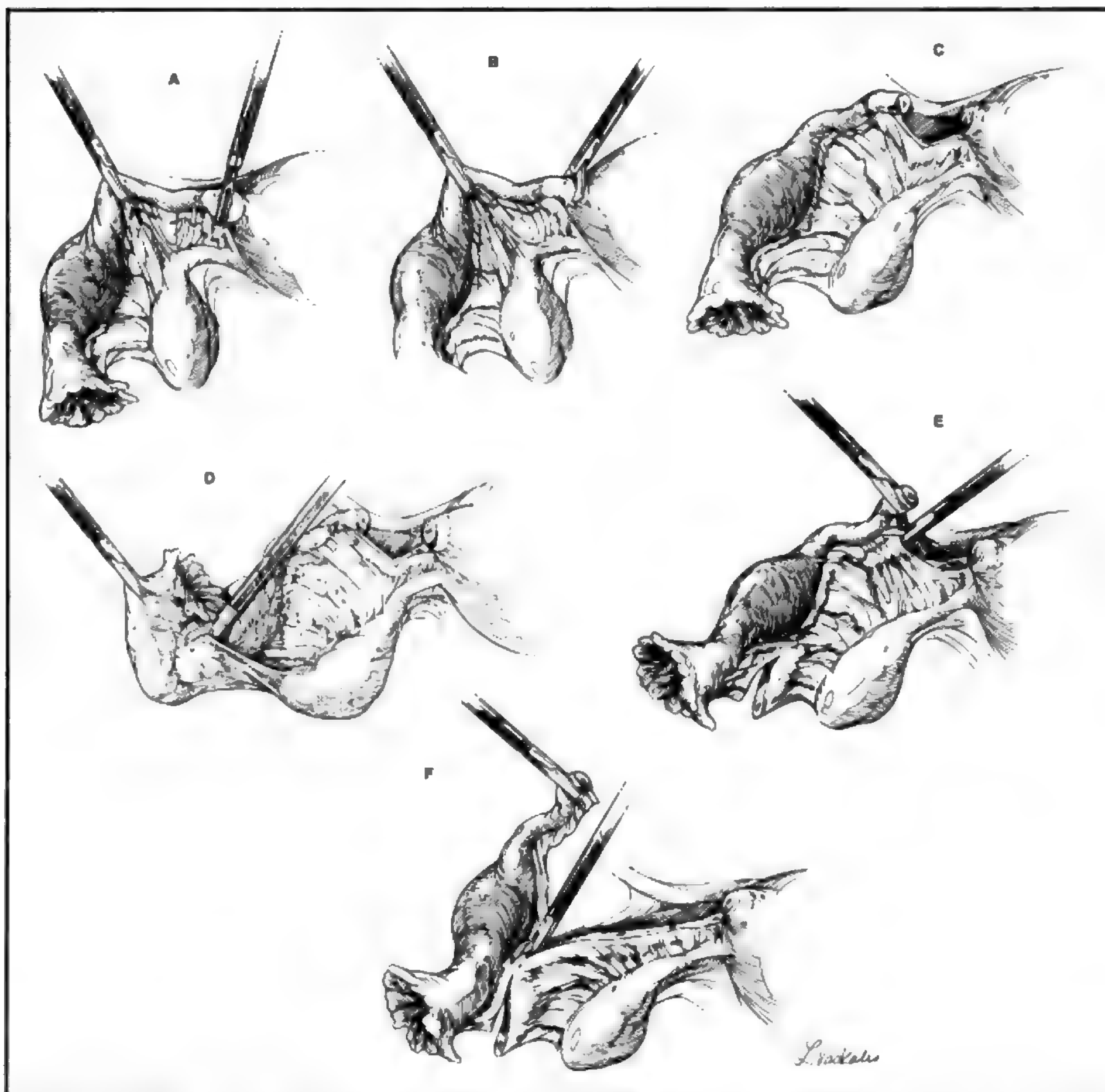


Fig. 5. Salpingectomia mediante elettrocoagulazione. A) Gravidanza tubarica ampollare: coagulazione della giunzione istmo-cornuale B e C) Sezione dell'arca coagulata a livello della giunzione istmo-cornuale. D) Coagulazione del legamento tubo-ovarico. E) Sezione del legamento tubo-ovarico. F) Il mesosalpinx viene coagulato e sezionato. (Da Gmel e Taylor, 1995, modificata).

L'emorragia secondaria è una complicanza eccezionale, così come il coriocarcinoma tubarico, mentre le aderenze post-operatorie si manifestano nel 15% circa dei casi (Keckstein *et al.*, 1992).

La frequenza delle fistole tubariche è poco conosciuta; secondo alcuni AA. (Keckstein *et al.*, 1992) è pari al 15%.

Il trattamento della gravidanza tubarica può essere considerato attualmente di pertinenza laparoscopica (Zouves *et al.*, 1992; Linares *et al.*, 1997).

Nella tab. II è stato riportato il sistema di calcolo del punteggio attribuito ai diversi segni clinici che si manifestano nei casi di gravidanza tubarica. Nella tab. III è stato riportato il sistema terapeutico.

Trattamento della sterilità da fattore tubarico

A partire dagli anni '80 la laparoscopia ha sostituito la microchirurgia come trattamento chirurgico di elezione della sterilità in virtù dell'introduzione del laser a CO₂ (Bruhat *et al.*, 1981) e della telecamera endoscopica.

Il primo intervento è stato l'adesiolisi. In seguito sono stati eseguiti interventi a maggior grado di complessità, dal trattamento dell'endometriosi fino alla neosalpingostomia (Daniell e Herbert, 1984).

Come per la microchirurgia esistono due scelte possibili riguardo alla strumentazione. Quella da noi praticata è basata sull'utilizzazione di strumenti convenzionali quali le forbici, le pinze

TAB. II. SISTEMA DI CALCOLO DEL PUNTEGGIO ATTRIBUITO AI DIVERSI SEGNI CLINICI CHE SI MANIFESTANO NELLE PAZIENTI AFFETTE DA GRAVIDANZA TUBARICA

	1	2	3
Giorni di amenorrea	> 49	≤ 49	≤ 42
Beta-HCG (mUI/ml)	≤ 1000	≤ 5000	> 5000
Progesterone (ng/ml)	≤ 5	≤ 10	> 10
Dolore	assente	provocato	spontaneo
Ematosalpinge (diametro in cm)	≤ 1	≤ 3	> 3
Emoperitoneo (volume in ml)	≤ 10	≤ 100	> 100

TAB. III. STRATEGIA TERAPEUTICA IN CASO DI GRAVIDANZA TUBARICA

Beta-HCG < 100	Beta-HCG ≤ 500 e/o score ≤ 13	Beta-HCG ≥ 5000 e/o score ≥ 13
↓	↓	↓
Astensione	MTX locale o i.m.	Laparoscopia

atraumatiche, l'elettrodo monopolare molto fine, le pinze bipolari da coagulazione strette e il sistema di lavaggio ed aspirazione. L'altra si avvale del laser a CO₂, non essendo gli altri tipi di laser (Argon, KTP, Nd:YAG) adatti a questo tipo di chirurgia.

Il vantaggio del laser, in termini di risultati, non è mai stato completamente dimostrato (Luciano *et al.*, 1987); il suo impiego, pertanto, a parte la maggiore facilità d'uso rispetto all'elettrochirurgia, si rivela una scelta di «lusso».

Adesiolisi

I vantaggi della adesiolisi laparoscopica sono legati alla mancata apertura del peritoneo, che impedisce il formarsi di nuove aderenze, alla pressione positiva causata dallo pneumoperitoneo che realizza una baroemostasi che limita i sanguinamenti, e alla minore incidenza di infezioni post-operatorie.

La tecnica chirurgica è la stessa indipendentemente dagli strumenti utilizzati (laser a CO₂, forbici e pinze monopolari o bipolari).

L'aderenza viene afferrata e messa in tensione in modo da esporre chiaramente l'area che deve essere sezionata. La sezione deve essere eseguita, strato per strato, parallelamente all'organo interessato, assicurando l'emostasi e procedendo dalle aderenze più semplici alle più complesse, dalle più superficiali alle più profonde, dal centro alla periferia. L'adesiolisi, pertanto, deve essere condotta dal Douglas verso le regioni annessiali (fig. 6).

L'adesiolisi laparoscopica è indicata in tutti i casi di sterilità tubarica; se le aderenze sono scarse, le probabilità di successo sono elevate. Se le tube sono chiuse la laparoscopia consente di stabilire l'entità del danno e di liberare l'ovaio dalle aderenze eventualmente presenti. Quest'ultima manovra risulta utile per favorire la funzione ovulatoria anche nelle pazienti che debbono essere sottoposte ad un programma di fecondazione assistita. I risultati dipendono dallo stadio delle aderenze. In caso di aderenze lievi o moderate il tasso di gravidanza è pari al 60% circa, rispetto

al 20% ottenuto in presenza di un grave coinvolgimento aderenziale (Bruhat *et al.*, 1983).

Neosalpingostomia

Se la parte distale della tuba è completamente occlusa con formazione di un idrosalpinge è necessario procedere alla creazione di un nuovo stoma.

La tecnica della neosalpingostomia consta di due tempi principali: l'apertura della tuba e l'eversione del padiglione. Nella maggior parte dei casi è indispensabile procedere ad una adesiolisi preliminare per liberare la tuba dalle aderenze periannessiali.

L'American Fertility Society ha proposto una classificazione basata sui fattori che possono influenzare la prognosi della neosalpingostomia (Gomel e Taylor, 1993; Gomel e Erenus, 1990): 1) diametro del tratto ampollare distale; 2) spessore della parete tubarica; 3) condizioni dell'endotelio tubarico; 4) estensione delle aderenze; 5) natura della aderenza. La fertilità globale dopo un intervento di neosalpingostomia si aggira intorno al 30%; il 90% delle gravidanze si ottiene entro 18 mesi dall'intervento (Canis *et al.*, 1991). Si tratta, quindi, di risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con gli interventi di microchirurgia.

Fimbrioplastica

Questo termine viene utilizzato per descrivere la ricostruzione del padiglione tubarico. Le fimbrie, infatti, agglutinandosi possono determinare un'occlusione parziale o totale della tuba. Le tecniche chirurgiche utilizzabili sono la disagglutinazione delle fimbrie e la correzione della fimosi prefimbriale, a seconda del danno che ha interessato la tuba. I risultati riportati in letteratura variano dal 26% di gravidanze intra-uterine e dal 13% di gravidanze extra-uterine (Dubuisson *et al.*, 1990), al 50% di gravidanze intra-uterine senza alcuna gravidanza extra-uterina (Canis *et al.*, 1991).

Anastomosi tubo-tubarica

Questo intervento, effettuato per via laparoscopica, risulta difficile, laborioso e non offre risultati migliori rispetto alla microchirurgia per via laparotomica che rappresenta a tutt'oggi la tecnica di scelta.

Malattia infiammatoria pelvica e ascessi tubo-ovarici

Da quando Dellenbach e coll. (Dellenbach *et al.*, 1972) per primi proposero nel 1972 il trattamento laparoscopico delle infezioni pelviche (PID [*Pelvic Inflammatory Disease*: v. MALATTIA INFIAMMATORIA PELVICA²]), il progressivo sviluppo di questa tecnica ha portato ad un protocollo ben definito che comprende la laparoscopia iniziale (fig. 7) seguita dal trattamento antibiotico e, dopo tre mesi, da un *second-look* laparoscopico. Si distinguono (Bieluch e Tally, 1983) cinque tipi di ascessi tubo-ovarici:

a) il piosalpinge vero: corrisponde ad una sovrainfezione di un preesistente idrosalpinge;

b) l'ascesso tubarico: secondario ad una occlusione tubarica recente causata da una conglutinazione delle fimbrie;

c) gli ascessi inter-tubo-ovarico e peri-tubo-ovarico: costituiti da complessi aderenziali tra ovaio, tuba ed organi circostanti;

d) l'ascesso ovarico isolato, spesso iatrogeno: conseguenza ad esempio di punture ecoguidate di cisti ovariche;

e) gli ascessi complessi: sono rappresentati dall'associazione di più tipi sopradescritti.

La tecnica con cui affrontare questa patologia non richiede una strumentazione particolare. Con un palpatore si mobilitano l'omento, l'intestino, e le aderenze per eviden-

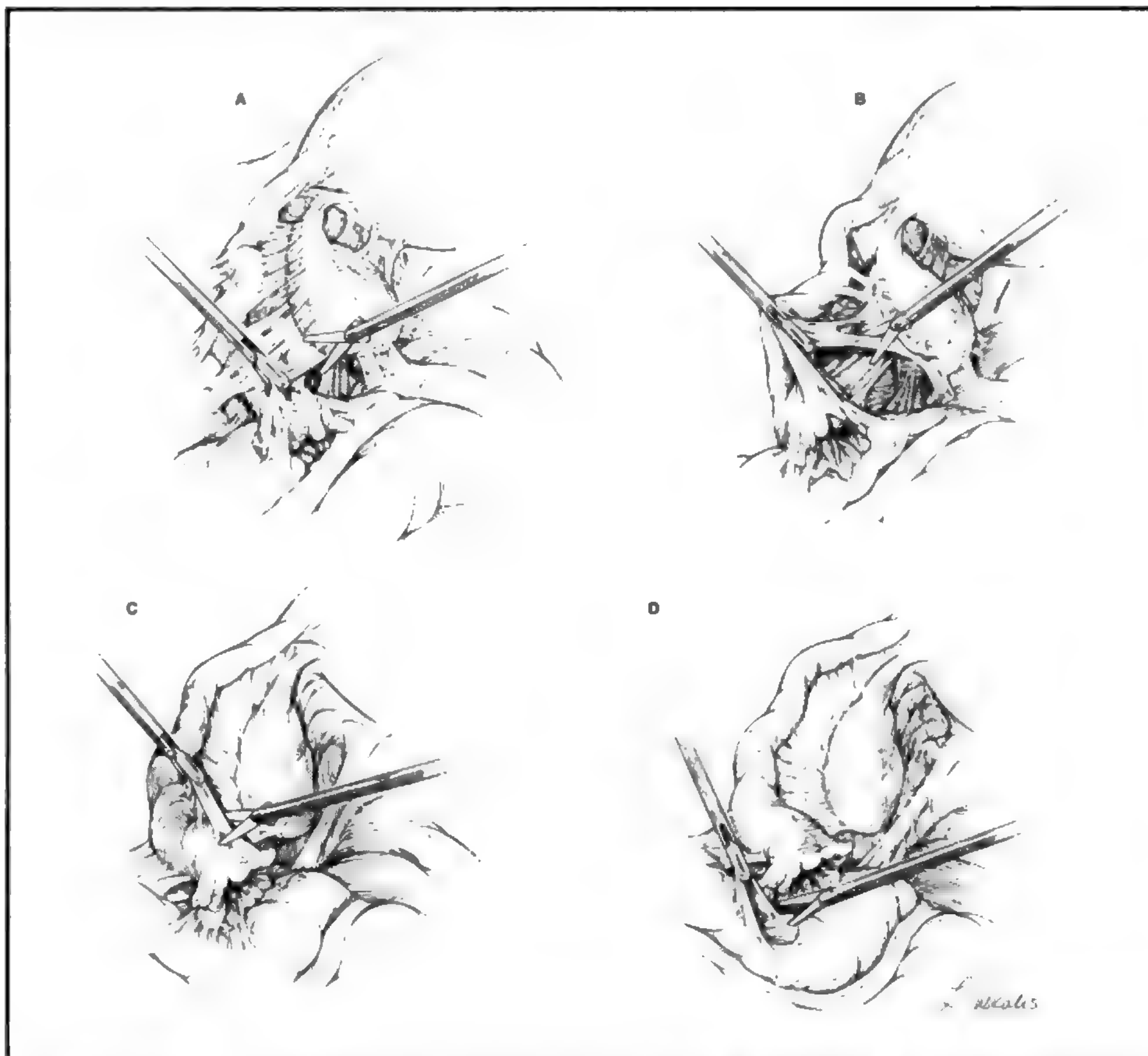


Fig. 6. Salpingo-ovariolisi. A) La lisi delle aderenze viene eseguita a partire dalla zona meglio esposta. B) Le aderenze vengono messe in tensione e sezionate uno strato alla volta parallelamente all'organo interessato. C) Le aderenze più estese vengono liberate da tutti i punti di attacco e rimosse dalla cavità peritoneale. D) La salpingo-ovariolisi viene completata. (Da Gomel e Taylor, 1995).

ziare l'ascesso. Lo si penetra con la cannula aspirante asportando tutto il pus, che viene inviato all'esame batteriologico, insieme agli essudati asportati ed al materiale fuoriuscito dagli osti tubarici (fig. 8, A). Una volta svuotata la cavità ascessuale si utilizza l'idrodissezione per separare i vari organi coinvolti nel processo flogistico. Con una pinza da biopsia si cerca di asportare la maggior quantità possibile di essudato infiammatorio necrotico così da migliorare la prognosi, come da tempo dimostrato (Hudspeth, 1975). Si valutano poi l'ovaio, che spesso costituisce una delle pareti dell'ascesso, e le tube, tenendo presente che l'edema flogistico può causare una occlusione funzionale. La chiave del successo sta nell'utilizzare una copiosa quantità di liquido di lavaggio durante l'intervento. Tale liquido può contenere polivinil pirrolidone iodio (Betadine[®]) o antibiotici opportunamente diluiti (ad es., Dalaem 1 fl., ogni 5 litri).

La pelvi e l'addome superiore, che a causa della posizione di Trendelenburg può essere interessato dal materiale infetto, debbono essere abbondantemente irrigati e il liquido di lavaggio deve essere accuratamente aspirato (fig. 8, B). Al termine è opportuno lasciare un'adeguata quantità di liquido che sembra utile per tenere i tessuti separati tra loro durante le fasi iniziali della guarigione al fine di evitare la formazione di aderenze post-operatorie.

Il trattamento antibiotico deve essere iniziato prima dell'intervento e deve essere protratto per 3-6 settimane. Noi utilizziamo un'associazione tra amoxicillina più acido clavulanico e una tetraciclina, salvo diversa indicazione dell'antibiogramma.

Le indicazioni all'esecuzione di una seconda laparoscopia dopo tre mesi sono rappresentate: dalla nulliparità, dal desiderio di gravidanza, dal piosalpinge vero, dall'infezione



Fig. 7. PID in fase acuta: quadro laparoscopico. (Osservazione degli AA.).

da *Chlamydia* e dalla necessità di controllare l'efficacia della terapia antibiotica (Le Boudec *et al.*, 1991). Il *second-look* laparoscopico consente di completare il trattamento chirurgico, di effettuare prelievi e, soprattutto, di formulare, sulla base del punteggio tubarico (tab. IV) e aderenziale (tab. V) (Canis *et al.*, 1991), un giudizio prognostico riguardo alla fertilità della paziente.

La laparoscopia è attualmente il trattamento di elezione della PID in fase acuta. I risultati riportati, infatti, sono concordi nel segnalare una percentuale di guarigione che

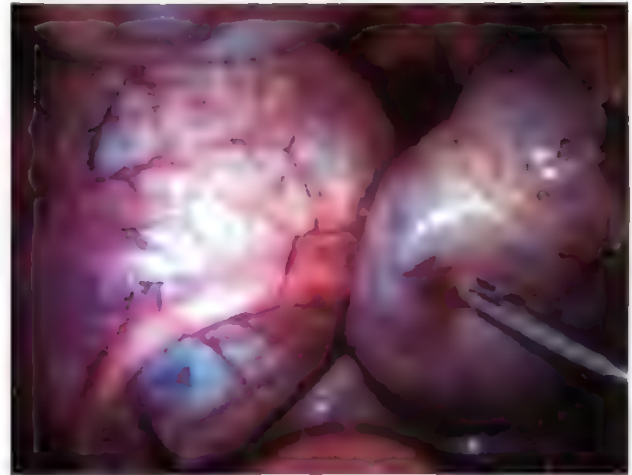


Fig. 9. Cisti ovariche bilaterali: quadro laparoscopico. (Osservazione degli AA.).

varia dal 90 al 100% dei casi trattati (Reich e McGlynn, 1987; Adducci, 1981; Henry-Suchet *et al.*, 1984).

Lo scopo del trattamento è quello di agire nel modo più rapido possibile in modo da ridurre l'incidenza delle sequele rappresentate dalla sterilità e dal dolore pelvico cronico. La somministrazione di un adeguato regime antibiotico e l'esecuzione della laparoscopia sembrano rappresentare, attualmente, il metodo migliore per raggiungere questo scopo (Eschenbach *et al.*, 1997).

Chirurgia dell'ovaio

Il trattamento per via laparoscopica delle masse annessiali (fig. 9) si è diffuso con sempre maggiore frequenza negli ultimi dieci anni (Dottino *et al.*, 1999; Canis *et al.*, 1997). L'intervento chirurgico si rende necessario essenzialmente

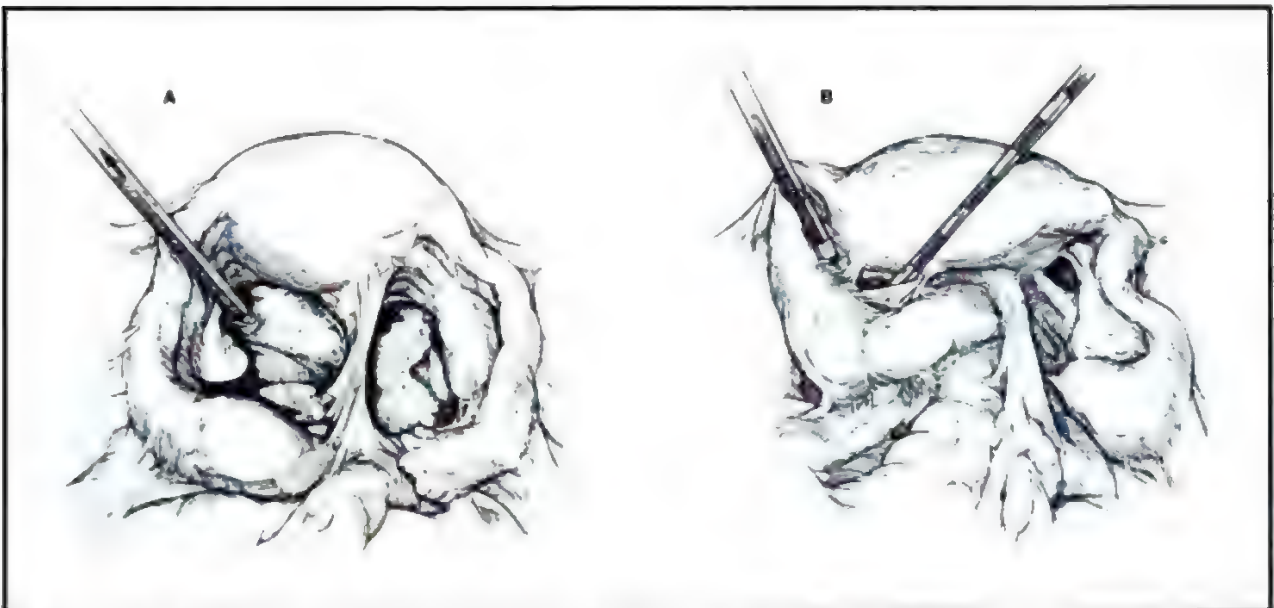


Fig. 8. Drenaggio dell'ascesso pelvico. A) Aspirazione del pus e rimozione dei tessuti necrotici. B) L'intervento viene completato da un copioso lavaggio della pelvi e dell'addome. (Da Gomel e Taylor, 1995).

TAB. IV. PUNTEGGIO (SCORE) ADERENZIALE

Organi	Tipo di aderenze	Superficie d'organo interessata dalle aderenze		
		1/3	2/3	3/3
Ovaio	velamentose	1	2	4
	ispessite	4	8	16
Tuba prossimale	velamentose	1	2	4
	ispessite	2	5	10
Tuba distale	velamentose	1	1	1
	ispessite	5	10	15

Punteggio totale: 0 assenze di aderenze; 1-6 aderenze lievi; 7-15 aderenze di modesta entità; > 15 aderenze di grado severo.

TAB. V. PUNTEGGIO (SCORE) TUBARICO

	0	2	5	10
Pervietà tubarica		Fimosi	Idrosalpinge	
Presenza di pliche della mucosa tubarica	normali		diminuite	assenza
Parete tubarica	normale		assottigliata	rigida

Punteggio totale: 2-5 stadio 1; 6-10 stadio 2; 11-15 stadio 3; > 15 stadio 4.

per due ragioni: a) perché i presidi diagnostici attualmente disponibili, come l'ecografia con sonda vaginale, il color Doppler, il dosaggio dei *markers* tumorali, nonostante i recenti progressi, non consentono di porre la diagnosi con sufficiente accuratezza (Bromley *et al.*, 1994); b) poiché in più del 50% dei casi di tumori maligni, sierosi e mucinosi, è possibile riscontrare la presenza di aree di epitelio benigno (Puls *et al.*, 1992).

Il classico trattamento laparoscopico delle cisti dell'ovaio (Canis *et al.*, 1997) da noi adottato è il seguente:

1) aspirazione del liquido peritoneale per l'esame istologico;

2) attenta ispezione dell'ovaio cistico, del peritoneo, dell'ovaio controlaterale, delle docce paracoliche, del diaframma, dell'omento, del fegato e dell'intestino, con eventuali biopsie di formazioni sospette;

3) le masse annessiali vengono agoaspirate solo se benigne o presunte tali, cercando di limitare lo *spilling* (fuoriuscita del liquido intracistico);

4) una volta svuotata e lavata, la cisti viene aperta e la parete cistica attentamente ispezionata.

Dopo aver escluso la natura maligna della lesione, è possibile attuare diverse procedure. Posti gli usuali tre ingressi laparoscopici, la sezione può essere ottenuta con le forbici, con l'elettrobisturi o con il laser. La dissezione dei tessuti può essere effettuata con le forbici, con le pinze smusse, con il laser o con l'idrodissezione. L'emostasi può essere ottenuta con la corrente mono- o bipolare o con l'applicazione di punti di sutura, di lacci o di *clips*. Di fondamentale importanza, inoltre, risulta la disponibilità di un sistema di lavaggio e di aspirazione e dei sacchetti laparoscopici.

Aspirazione, cistoscopia, fenestrazione

L'aspirazione è la manovra più semplice e può essere effettuata con una cannula provvista di ago collegata con l'aspiratore. Si tratta, tuttavia, di una procedura dotata di

una elevata incidenza di recidive e di uno scarso valore diagnostico: in una percentuale variabile dal 10 al 65% degli agoaspirati interpretati come benigni, infatti, è presente un tumore maligno (Trope, 1981). Per effettuare l'esame delle cisti è necessario praticare una piccola apertura nella parete della cisti, dopo averla svuotata (fig. 10). Se appaiono formazioni sospette (fig. 11) si può effettuare una biopsia per un esame estemporaneo. Se la cisti è di tipo funzionale e di diametro inferiore a 5 cm è possibile procedere alla fenestrazione che consiste nell'escissione di una ampia area di forma ellittica della parete cistica (Hasson, 1990).

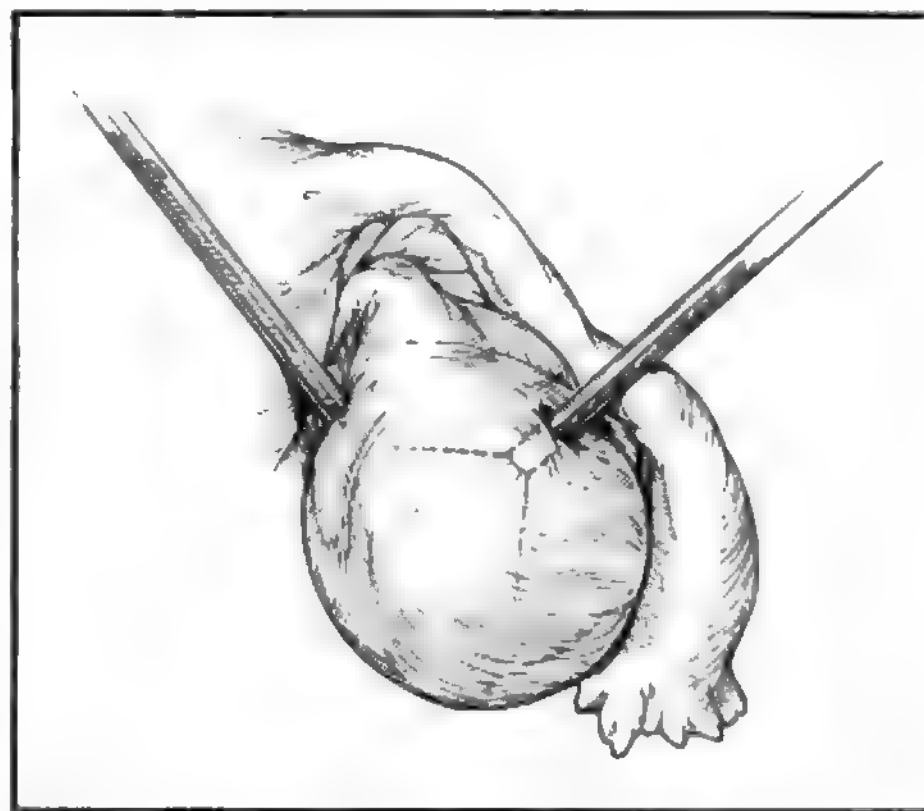


Fig. 10 Ispezione della cavità della cisti: cistoscopia. (Da Gomel e Taylor, 1995).

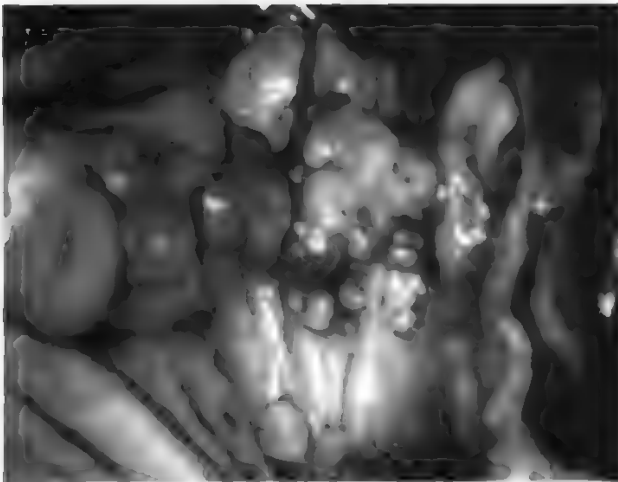


Fig. 11. Cistoscopia: presenza di vegetazioni endocistiche. (Osservazione degli AA.).

Cistectomia ovarica

Si intende con questo termine la completa asportazione della cisti: è ovvio che la parete della cisti dovrebbe rimanere integra il più a lungo possibile per facilitare l'escissione. Questo è soprattutto il caso delle cisti di 4-5 cm di diametro o delle cisti dermoidi che è preferibile rimuovere intatte. Una volta incisa la capsula della cisti, la si afferra con una pinza a denti mentre con un'altra pinza viene afferrata la parete della cisti. Con manovre di trazione e di contro-trazione è possibile individuare un piano di clivaggio che facilita l'enucleazione della cisti (fig. 12). L'individuazione del piano di clivaggio risulta agevolata dall'introduzione tra la capsula e la parete della cisti del liquido di lavaggio sotto pressione (idrodissezione). Dopo un'ispezione dell'ovaio, che consente di effettuare l'emostasi, i margini possono essere lasciati liberi. Alcuni AA. suturano i margini con punti in Vicryl 5.0 o 6.0 mentre altri AA. utilizzano la colla di fibrina.

La cisti, introdotta in un sacchetto endoscopico, viene estratta attraverso il trocar di diametro maggiore o mediante una colpotomia posteriore ed inviata all'esame istologico (fig. 13) (Mage *et al.*, 1990).

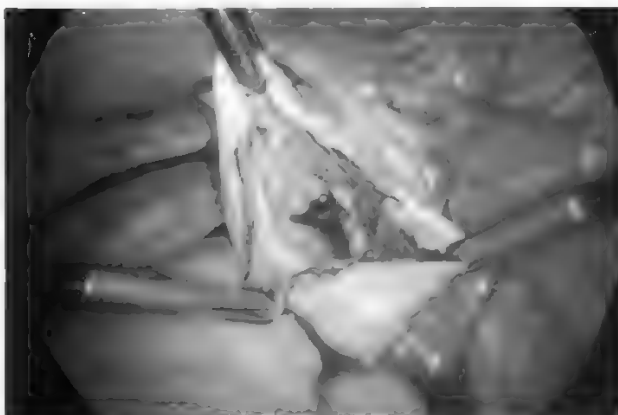


Fig. 12. Laparoscopia operatoria: cistectomia ovarica. La parete della cisti risulta ben distinguibile. (Osservazione degli AA.).

Ovariectomia e annessiectomia

Questi atti demolitivi sono indicati in tutte le pazienti in menopausa e nelle donne più giovani solo in determinati casi: quando la struttura ovarica appare compromessa o la cisti necessita di essere rimossa a causa della sua natura, nei casi di tumori mammari estrogeno-dipendenti o nei rari casi di carcinoma ovarico con storia eredo-familiare.

Sia l'ovariectomia che l'annessiectomia (figg. 14 e 15) possono essere eseguite con l'apposizione di lacci di Roeder, o con l'uso delle pinze bipolari e conseguente sezione con forbici, o con l'uso di suturatrici meccaniche (ENDOGIA) sui peduncoli (meso-ovarico e legamento utero-ovarico per l'ovaio più il legamento infundibulo-pelvico per l'annessio *in toto*) (Parker e Berek, 1990). Il pezzo operatorio può essere rimosso dopo frammentazione (*morcellamento*) oppure integro ampliando una delle brecce della parete addominale o attraverso una colpotomia posteriore.

Torsione dell'ovaio

Con questo termine si definisce la rotazione sul proprio asse per una volta (360°) o più di una parte o della totalità dell'annessio. Lo strozzamento vascolare che ne consegue è responsabile delle lesioni ischemiche della tuba e dell'ovaio, giustificando il trattamento chirurgico d'urgenza. Le cause della torsione sono rappresentate dalla presenza: di una cisti ovarica (73% dei casi) (fig. 16), di una sindrome aderenziale (6%), di una gravidanza extra-uterina (4%), di un idrosalpinge (2%); nel 4% dei casi la torsione è congenita e nell'11% dei casi l'annessio non è interessato da alcuna patologia (Hibbard, 1985; Steyaert *et al.*, 1998).

La torsione può essere definita: di lieve entità, se il colore dell'annessio è normale e l'edema non molto pronunciato; severa, se la tuba è rosso-violacea e l'ovaio è nero o grigio-blu ed entrambi appaiono notevolmente aumentati di volume, ma soprattutto se dopo la detorsione l'annessio riprende il suo colore normale in meno di 10 minuti; irreversibile, se l'annessio è *in toto* nero, in sfacelo, friabile, molto voluminoso e ricoperto di fibrina e la detorsione non determina alcun cambiamento dello stato ischemico. In quest'ultimo caso l'annessiectomia rappresenta l'unica possibilità terapeutica.

Negli altri casi la manovra è estremamente semplice. Può essere realizzata con un palpatore ed una pinza atraumatica e consiste nell'effettuare una detorsione, dopo aver individuato il senso di rotazione dell'annessio (Kamprath *et al.*, 1998). Come manovra complementare si impone la rimozione della causa che ha causato la torsione, ed eccezionalmente una pessia ovarica che può essere anche bilaterale.

Cisti paraovariche

Le cisti idatidee del Morgagni possono avere varie dimensioni. Di solito sono collegate alle tube da un esile peduncolo vascolarizzato che deve essere coagulato prima di essere sezionato. Le cisti paraovariche possono essere retroperitoneali. Per questo motivo bisogna incidere il peritoneo (il più distante possibile dal padiglione tubarico) con le forbici. Dopo aver afferrato il bordo del peritoneo con una pinza, si isola la cisti con un dissectore per via smussa e/o con l'idrodissezione fino ad enuclearla. Essendo la parete assai sottile spesso la cisti si rompe oppure la si svuota per facilitarne l'asportazione e si coagula il peduncolo vascolare. I lembi peritoneali non richiedono alcuna chiusura e la cisti viene rimossa come è già stato descritto in precedenza (Herbert *et al.*, 1990).

Sindrome dell'ovaio policistico

La sindrome dell'ovaio policistico (PCO: *Polycystic Ovary*) sin dalla sua definizione è stata trattata con la resezione

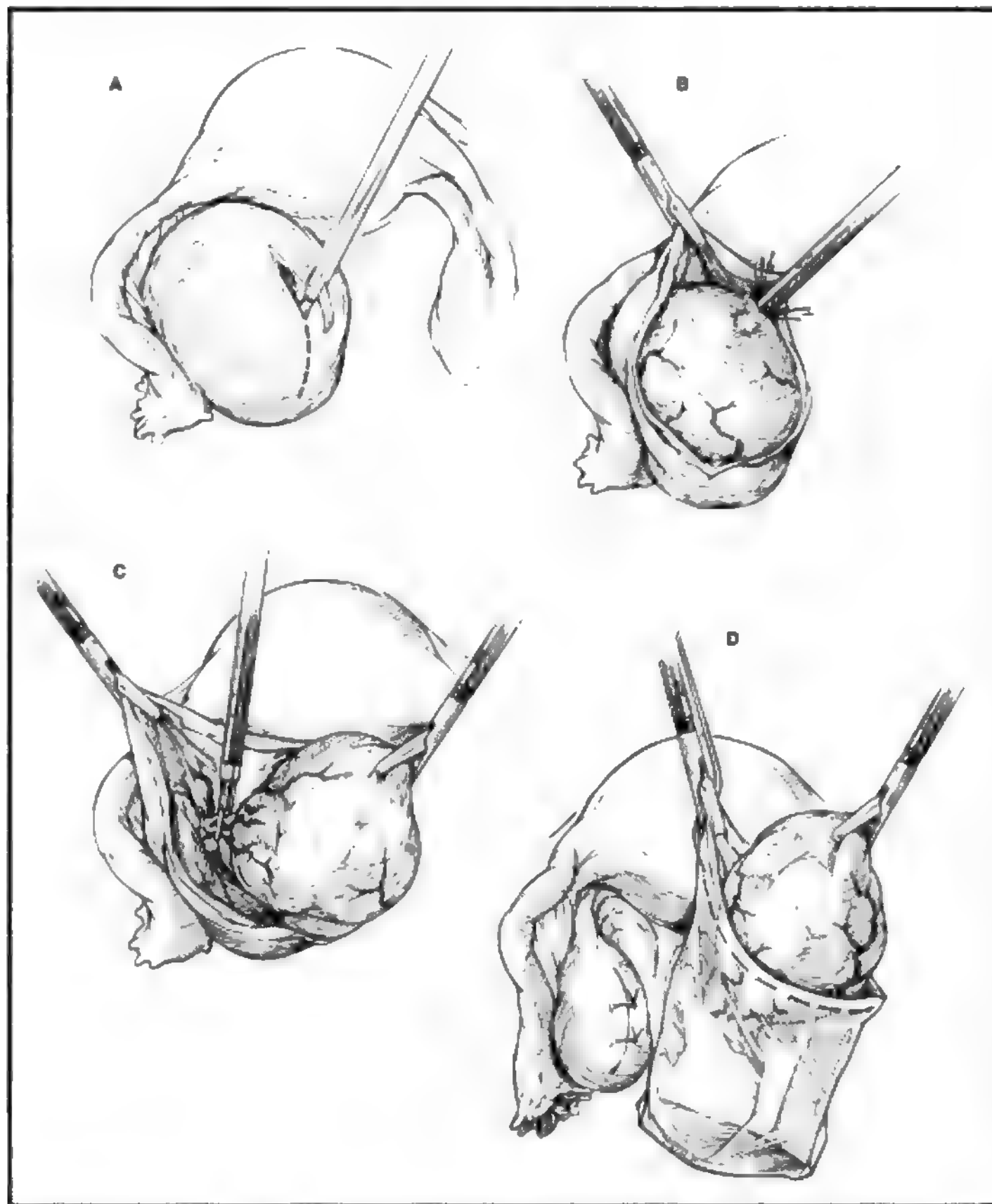


Fig. 13. Cistectomia ovarica con cisti integra. A) La corticale ovarica viene incisa lungo una linea opposta all'ilo. B) Viene ottenuto un piano di clivaggio tra la corticale e la capsula della cisti. La dissezione della cisti viene effettuata per via smussa e con l'idrodissezione. C) I vasi che irrorano la cisti vengono coagulati. D) Rimozione della cisti in un sacchetto di polietilene. (Da Gomel e Taylor, 1995).

cuneiforme dell'ovaio (Stein e Leventhal, 1935). Attualmente desta un notevole interesse il trattamento chirurgico per via laparoscopica che consiste nel *drilling* della corticale ovarica. Con questo termine si intende la creazione di numerose aperture nella corticale ovarica con l'elettrobisturi monopolare o con il laser (a CO₂; Nd:YAG; KTP). Dopo aver afferrato e sollevato con una pinza l'ovaio vi si praticano da 6 a 12 incisioni, ognuna delle quali profonda circa 3-4 mm e larga 3 mm.

I risultati in termini di ovulazione appaiono soddisfacenti (92%; Gjonnaess, 1984) ma la durata nel tempo del corretto funzionamento ovarico appare limitata (da 8 settimane a 3 mesi). Il trattamento chirurgico per via laparoscopica della PCO a causa dell'eventuale insorgenza di aderenze deve essere riservato alle pazienti che non rispondono ad un periodo adeguato di terapia medica.

Endometriosi

L'obiettivo del trattamento chirurgico dell'endometriosi è l'asportazione e la distruzione più completa possibile del tessuto endometriale e la correzione dei difetti anatomici

causati dalle aderenze e dalle lesioni cistiche (Cook e Rock, 1991; Adamson e Nelson, 1997; Nezhat *et al.*, 1998).

Gli impianti endometrioidici superficiali possono essere trattati per via laparoscopica con l'escissione o con la distruzione *in situ* tramite la coagulazione o la vaporizzazione (Canis *et al.*, 1989; Mettler e Semm, 1983).

Escissione

I margini della lesione vengono evidenziati con uno strumento tagliente. Il peritoneo circostante può essere o non essere coagulato; l'area di tessuto endometrioidico viene sollevata con una pinza da presa e sezionata dal tessuto normale sottostante. L'escissione può risultare agevole o molto difficoltosa a seconda della localizzazione, dello spessore e delle dimensioni dell'impianto endometrioidico.

Coagulazione

L'esposizione dell'area di endometriosi ad una temperatura compresa fra 60 e 80 °C determina la perdita della componente acquosa intracellulare e la coagulazione delle proteine.

Usando la coagulazione è praticamente impossibile controllare la profondità dell'effetto termico sul tessuto, per cui è possibile danneggiare le strutture adiacenti. Utilizzando l'endocoagulatore

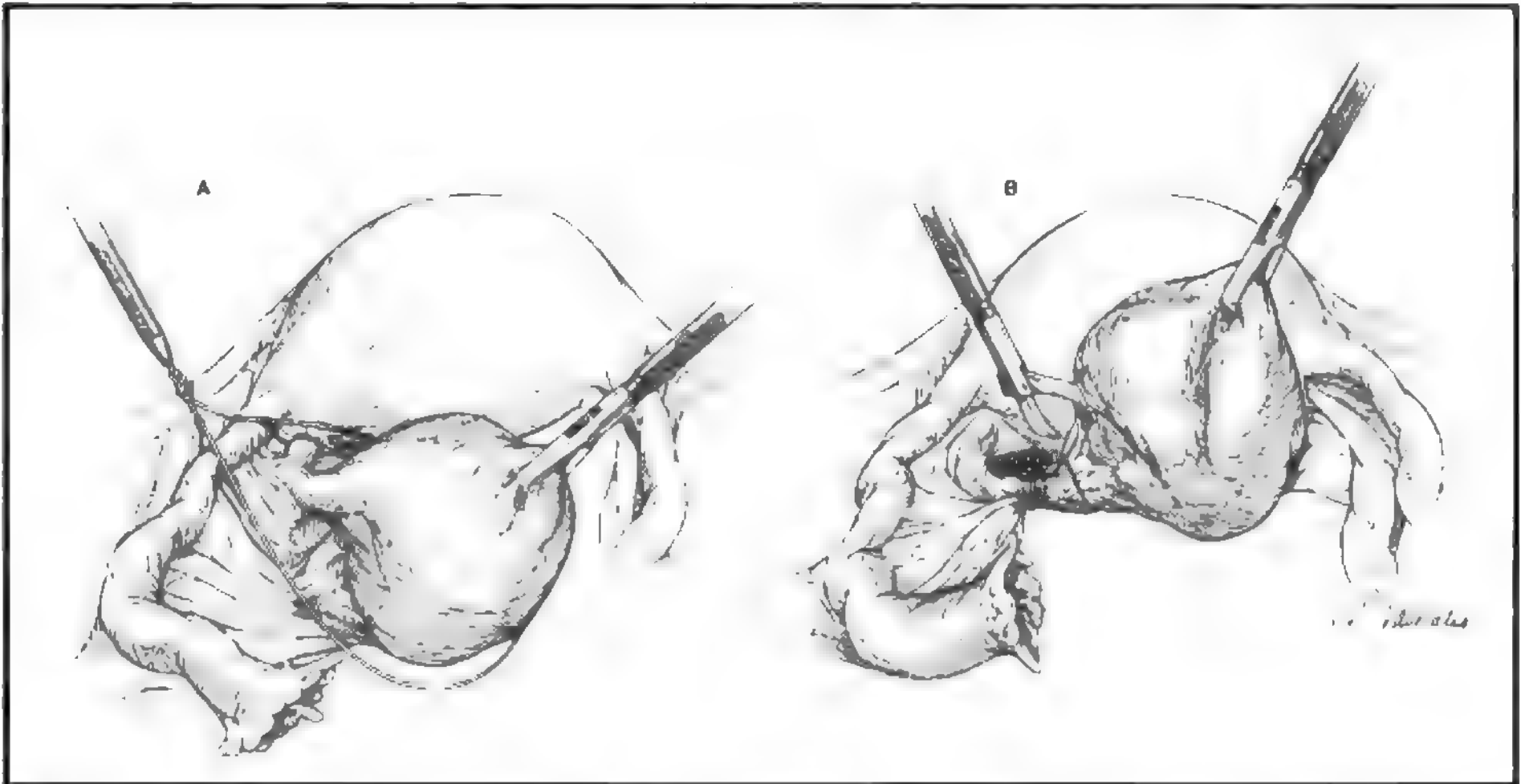


Fig. 14. Ovariectomia mediante lacci di Roeder per legare il meso-ovario. A) Applicazione di un laccio di Roeder. B) Sezione del meso-ovario dopo applicazione di 3 lacci di Roeder. (Da Gomel e Taylor, 1995).

(secondo Semm), questo rischio diminuisce. A 100 °C le proteine coagulate formano sulla superficie della lesione una sottile pellicola che previene la formazione di aderenze con il peritoneo integro. Quest'area viene successivamente ripertoneizzata grazie alla migrazione di istiociti e di fibroblasti.

Vaporizzazione

Viene ottenuta utilizzando un laser a CO₂ ad alta energia per un tempo breve. La rapida trasformazione dell'acqua intracellulare in vapore determina la trasformazione dell'energia termica in energia meccanica e, quindi, la separazione dei tessuti.

Scelta del trattamento

La scelta della metodica di trattamento delle lesioni endometriosiche per via laparoscopica può essere schematizzata nel modo seguente (Sutton e Diamond, 1993):

- 1) coagulazione: impianti endometriosici peritoneali superficiali;
- 2) laser vaporizzazione: impianti endometriosici peritoneali profondi da 1 a 3 mm ma in aree «sicure»; impianti endometriosici ovarici superficiali;
- 3) escissione: impianti endometriosici peritoneali super-



Fig. 15. Annessiectomia mediante legature. A) Il legamento infundibulo-pelvico viene legato. B) Dopo aver legato l'estremità prossimale della tuba e il legamento ovarico, i peduncoli vengono sezionati. (Da Gomel e Taylor, 1995).

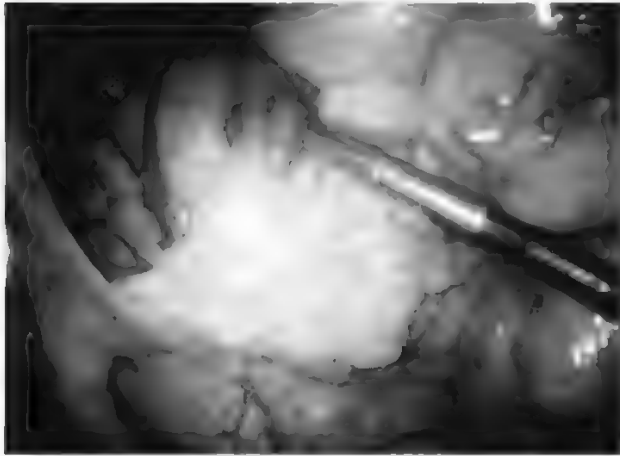


Fig. 16. Laparoscopia operatoria: cisti ovarica con torsione del peduncolo. (Osservazione degli AA.).

ficiali e profondi anche più di 3 mm; impianti endometriosici peritoneali profondi da 1 a 3 mm ma vicini all'uretere.

Quando non si disponga del laser a CO₂, l'endometriosi superficiale può essere trattata con l'endocoagulazione e con l'escissione.

La coagulazione eseguita mantenendo la sonda bottinata dell'endocoagulatore di Semm alla temperatura di 120 °C a contatto del tessuto per 15-20 sec si rivela necessaria per le lesioni che interessano l'utero, l'ovaio, la tuba e i legamenti utero-sacrali poiché in queste sedi non è possibile eseguire l'escissione del peritoneo (Gargiulo *et al.*, 1995).

L'adesiolisi (v. sopra, col. **3045) rappresenta il tempo più difficile e il principale limite al trattamento laparoscopico dell'endometriosi. Le aderenze devono essere sezionate solo dopo essere state messe in tensione e dopo aver evidenziato le strutture anatomiche coinvolte.

L'adesiolisi può essere effettuata con diversi metodi: il laser a CO₂, l'idrodissezione, le forbici, le pinze atraumatiche. Non è stato dimostrato, tuttavia, alcun vantaggio che consenta di preferire l'uno o l'altro di questi mezzi.

Gli impianti endometriosici profondi debbono essere asportati completamente insieme con il tessuto fibrotico circostante. L'interessamento profondo, retroperitoneale del cavo del Douglas, della pagina posteriore del legamento largo, dei legamenti utero-sacrali (Chapron *et al.*, 1997c) è presente tra il 31 e il 58% dei casi (Caffi *et al.*, 1991).

Non è frequente il riscontro di focolai endometriosici a carico dell'apparato urinario e del tubo digerente, e ancor più raro è quello nella faccia inferiore del diaframma. Il trattamento chirurgico laparoscopico dell'endometriosi in tali sedi varia a seconda dell'estensione della lesione, riconoscendo come solo confine i classici limiti della chirurgia endoscopica.

Nel trattare gli endometriomi ovarici, noi ci prefiggiamo quattro obiettivi:

1) escludere l'eventualità di una patologia ovarica maligna;

2) rimuovere tutto il tessuto endometriosico: nelle pazienti più anziane l'escissione completa è d'obbligo per l'eventualità di una trasformazione neoplastica (Heaps *et al.*, 1992);

3) ridurre al minimo il traumatismo a carico dell'ovaio per preservare il patrimonio follicolare;

4) cercare di prevenire la formazione di aderenze post-operatorie, molto frequenti dopo la chirurgia ovarica.

È stato da tempo dimostrato che in più del 90% degli endometriomi ovarici la parete della cisti altro non è che la corticale ovarica introflessa, per cui sono state descritte diverse modalità di asportazione (Fayez e Vogel, 1991): la cistectomia, la vaporizzazione con il laser a CO₂ (Sutton *et al.*, 1997), la escissione e lo *stripping* della parete cistica. Noi preferiamo quest'ultima modalità poiché può essere utilizzata per tutti gli endometriomi, indipendentemente dal diametro.

Il trattamento chirurgico dell'endometriosi per via laparoscopica presenta il non trascurabile vantaggio di ridurre il trauma peritoneale e quindi la formazione di nuove aderenze.

Miomectomia

La miomectomia laparoscopica è stata descritta da Semm e Mettler nel 1980 e risulta indicata soprattutto nelle pazienti desiderose di fertilità e sintomatiche. Le limitazioni alla miomectomia laparoscopica sono rappresentate: dal numero, dalle dimensioni e dal tipo di mioma. La presenza di 3 o più miomi di diametro uguale o superiore a 4 cm, oppure di un mioma di diametro superiore a 8 cm, la sede profondamente intramurale o sottomucosa, impongono il ricorso ad altre metodiche chirurgiche tradizionali o isteroscopiche o combinate con la laparoscopia, come la minilaparotomia (Dubuisson *et al.*, 1997).

La tecnica che utilizziamo per la miomectomia è differente a seconda della localizzazione del mioma.

Miomi peduncolati. – Il peduncolo viene coagulato con pinze bipolari e poi sezionato con le forbici. Dato che la parete uterina non viene interessata, non si rende necessaria alcuna sutura, nemmeno superficialmente, nella zona cruentata che si ripertoneizza senza aderenze (Dubuisson e Chapron, 1992).

Miomi sottosierosi e intramurali. – Si procede all'infiltrazione del miometrio circostante il mioma con una soluzione vasocostrittrice di POR-8 (5-10 ml) opportunamente diluita, quindi si effettua con il *crochet* o con l'elettrodo monopolare o con il laser una incisione verticalmente al mioma attraverso la pseudocapsula. Il mioma, facilmente riconoscibile per il suo colorito biancastro, viene enucleato.

È opportuno eseguire la sutura della parete uterina dopo l'asportazione di miomi di diametro superiore a 2 cm (fig. 17).

Miomi a sviluppo infralegamentario. – Sono i più difficili da trattare, poiché spesso è necessario procedere alla coagulazione e alla dissezione del legamento rotondo, alla dissezione vescicale e all'individuazione dei vasi uterini e degli ureteri.

La rimozione dei miomi di diametro non superiore a 3 cm può essere effettuata attraverso la breccia del trocar mediano che può essere leggermente ampliata. I miomi di diametro superiore possono essere rimossi dopo essere stati frantumati (*morcellement*) manualmente o, meglio, con l'impiego di apparecchi elettrici (*morcellators*) che rendono questa manovra meno faticosa e, soprattutto, più rapida.

Un'altra via elegante di estrazione dei miomi voluminosi è rappresentata dalla colpotomia posteriore.

Recentemente è stato proposto l'uso del laser a Nd:YAG per coagulare e quindi ridurre miomi sottosierosi e intramurali fino a 10 cm di diametro (miolisi) (Goldfarb, 1992; Nissolle *et al.*, 1993).

Il laser viene usato a 50 watt di potenza con una fibra da 600 µ per colpire il mioma in più punti concentrici. Dato che l'effetto coagulante del laser a Nd:YAG si espande per 5 mm attorno ad ogni punto colpito, un mioma del diametro di 5 cm richiede 10 applicazioni per diametro (quindi 75-100 in tutto).

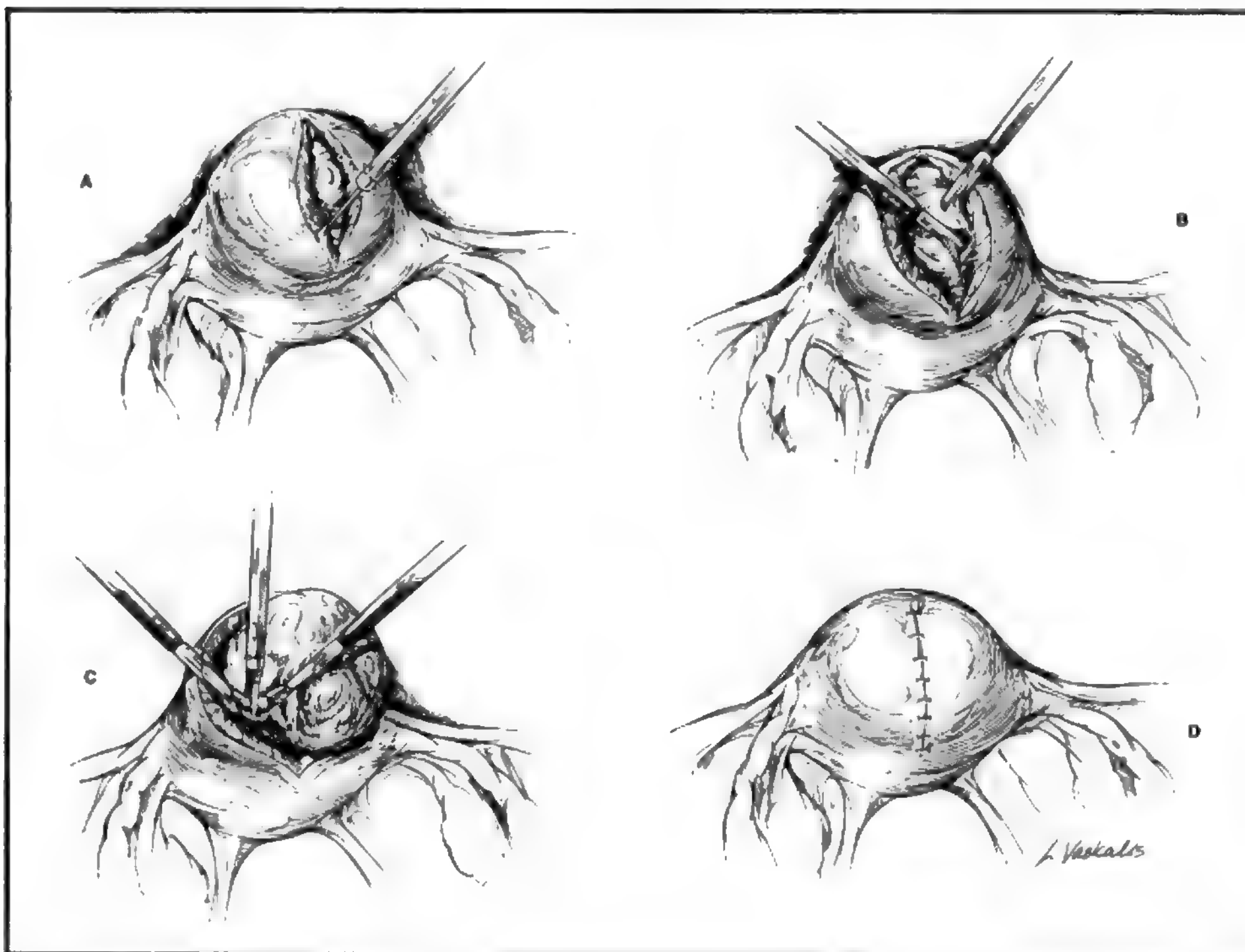


Fig. 17. Asportazione di un mioma intramurale. A) Si esegue una incisione verticale della parete dell'utero e della pseudocapsula a livello dell'apice del mioma. B) La dissezione viene eseguita esercitando contemporaneamente una trazione sul mioma. C) Il peduncolo vascolare viene coagulato prima di essere sezionato. D) Dopo l'accostamento del miometrio, la serosa viene suturata con una sutura continua con polyglactin 3-0. (Da Gomel e Taylor, 1995).

Questa tecnica ha destato molto interesse perché, non comportando la rimozione del pezzo operatorio, assicura un notevole risparmio di tempo. Consente, inoltre, di evitare molte delle difficoltà tecniche legate alla miomectomia laparoscopica poiché non è necessario eseguire manovre di dissezione, di sutura o di ricostruzione dei tessuti.

La riportata incidenza di tenaci aderenze nelle pazienti sottoposte alla miolisi, tuttavia, controindica l'esecuzione di questa tecnica nelle donne desiderose di prole.

Ablazione dei legamenti utero-sacrali (LUNA) e neurectomia presacrale

La neurectomia presacrale quale trattamento delle algie pelviche e della dismenorrea è stata proposta già alla fine del secolo scorso. Frangenheim nel 1972 ha introdotto la resezione parziale dei legamenti utero-sacrali per via laparoscopica e solo recentemente è stata descritta la neurectomia presacrale laparoscopica (Perez, 1990; Perry e Azziz, 1992).

LUNA (Laparoscopic Utero-Sacral Nerve Ablation)

Per eseguire questo intervento è necessario ottenere una perfetta visualizzazione del campo operatorio. Per questa ragione la paziente viene posta nella posizione di Trend-

lenburg accentuata in modo che il sigma non occupi la pelvi. Lo spostamento dell'utero in alto e in avanti attraverso il manipolatore uterino mette in tensione i legamenti utero-sacrali e facilita l'individuazione dell'uretere e del punto di inserzione del ramo cervicale dell'arteria uterina. I legamenti utero-sacrali possono essere sezionati con il laser (a CO₂; KTP), con l'elettrocoagulazione monopolare o bipolare, con le forbici o con il coagulatore a raggio di argon.

Indipendentemente dalla tecnica utilizzata la resezione deve essere effettuata nei 2 cm prossimali dei legamenti utero-sacrali dove passa la maggior parte delle fibre nervose. Le complicanze sono rappresentate da lesioni dell'uretere e dell'arteria uterina e dall'insorgenza, nelle pazienti giovani, del prolasso dell'utero. Il miglioramento della sintomatologia dolorosa è stato riportato in misura variabile dal 60 (Lichten, 1989) all'86% (Sutton, 1989) delle pazienti trattate.

Neurectomia presacrale

La tecnica laparoscopica è rimasta praticamente invariata rispetto a quella proposta per primo da Perez nel 1990. Dopo aver ottenuto una adeguata visualizzazione del campo operatorio si solleva il peritoneo del promontorio sacrale

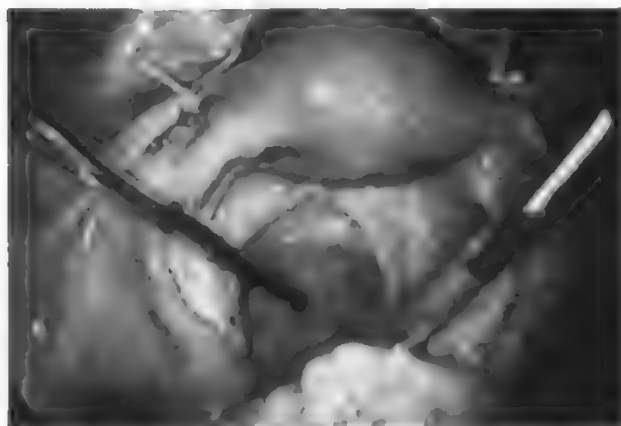


Fig. 18. Isteropessi per via laparoscopica: tecnica dei tre punti secondo Gargiulo. Si noti il punto che riunisce sulla linea mediana i legamenti utero-sacrali (utero-sacrale-pessia). (Osservazione degli AA.).

iniettando una soluzione diluita di POR-8 per ischemizzare lo spazio retroperitoneale. Il peritoneo viene inciso parallelamente all'asse longitudinale del sigma fino alla biforcazione dell'aorta. Vengono identificati, sulla destra, i grossi vasi e l'uretere e, sulla sinistra, l'arteria mesenterica inferiore e i vasi emorroidari superiori. Per via smussa si effettua la dissezione ed eventualmente l'asportazione del tessuto sottostante fino ad isolare il plesso ipogastrico inferiore, che viene sezionato per un tratto della lunghezza di 2-3 cm con le tecniche descritte per la LUNA. I margini dell'incisione peritoneale di solito non vengono suturati.

I rischi sono legati ad eventuali lesioni delle strutture vascolari mentre i risultati non sono ancora valutabili per l'esiguità dei dati finora disponibili. È opportuno, tuttavia, riservare questa tecnica alle pazienti sottoposte alla LUNA che risultino ancora sintomatiche.

Isteropessi

Con il termine di isteropessi vengono definite le tecniche chirurgiche volte a modificare la preesistente posizione del

corpo dell'utero. Si potrebbero elencare più di cento di queste tecniche (Bachmann, 1990), ma attualmente sono in uso solo quelle che prevedono l'utilizzo dei legamenti rotondi e dei legamenti utero-sacrali, come la isteropessi secondo Webster-Baldi, secondo Menge-Coffey, secondo Gillian-Doleris-Simpson. Quest'ultima, modificata con l'aggiunta della tecnica secondo Pestalozza, è stata utilizzata per la correzione della *sindrome di Louros* (dispareunia, dismenorrea, leucorrea, disuria, stipsi, cefalea, associate alla retroversione uterina).

Steptoe (1967), Patterson *et al.* (1978), Mann e Stenger (1978) hanno eseguito l'isteropessi secondo Gillian-Doleris-Simpson per via laparoscopica mentre Bruhat (Bruhat, 1989) e Manhes hanno adattato alla laparoscopia la tecnica di Alexander-Adams-Pellanda. Noi eseguiamo l'isteropessi per via laparoscopica sia con la duplicazione dei legamenti rotondi associata alla utero-sacrale-pessia (tecnica dei tre punti secondo Gargiulo [fig. 18]) sia secondo la tecnica di Webster-Baldi modificata secondo Gargiulo (Gargiulo, 1992).

Per quanto riguarda la prima tecnica si afferrano i legamenti rotondi da ambo i lati a circa 3-5 cm dall'utero e si fissa l'ansa ottenuta da detti legamenti alla parete uterina anteriore. Quindi con un altro punto si riuniscono i legamenti utero-sacrali sulla linea mediana.

La tecnica secondo Webster-Baldi è più complessa: consiste nella perforazione dei legamenti larghi bilateralmente, in sede avascolare, mediante una pinza con la quale si afferrano a circa 3-5 cm i legamenti rotondi le cui anse vengono fatte passare attraverso i fori praticati nei legamenti larghi e fissate sulla parete uterina posteriore. La tecnica di Webster-Baldi, modificata secondo Gargiulo, prevede un tempo ulteriore caratterizzato dalla utero-sacrale-pessia.

Nella nostra esperienza circa l'80% della pazienti hanno presentato una remissione totale della sintomatologia dolorosa con entrambe le tecniche. Gli incidenti sono rari (ematomi del legamento largo) e le complicanze assenti. L'intervento dei tre punti secondo Gargiulo è tecnicamente più semplice e veloce mentre l'isteropessi secondo Webster-Baldi, che comporta maggiori difficoltà d'esecuzione e tempi operatori più lunghi, sembra essere associata a risultati più duraturi e a un minor numero di recidive.

L'isteropessi per via laparoscopica rappresenta il trattamento di scelta della retroversoflessione uterina.

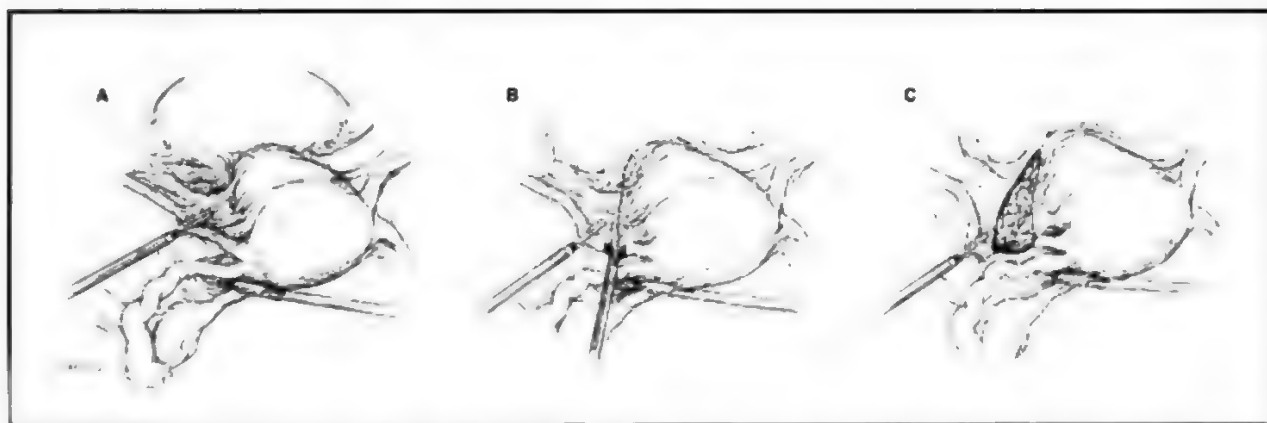


Fig. 19. Isteropessi per via laparoscopica. Legatura e sezione del legamento rotondo. A) Il legamento utero-ovarico viene afferrato e legato. B) Il legamento rotondo viene coagulato con corrente bipolare o monopolare. C) La coagulazione del flap vescicale ha inizio con l'incisione del peritoneo viscerale parallela all'utero. (Da Gomel e Taylor, 1995).



Fig. 20. Isterectomia per via laparoscopica. Legatura e sezione del legamento infundibulo-pelvico. (Da Gomel e Taylor, 1995).

Isterectomia

Negli Stati Uniti circa il 37% delle donne vengono sottoposte all'isterectomia entro il 55°-60° anno di età (Bach-

mann, 1990). La via più utilizzata negli U.S.A. è quella laparotomica (circa il 75%) mentre in Gran Bretagna e in Germania la via vaginale viene scelta nel 45-80% dei casi (Wilcox *et al.*, 1994). Attualmente solo una piccola parte delle isterectomie vengono effettuate per via laparoscopica: dal 2 al 22% nei centri con maggiore tradizione di chirurgia laparoscopica (Donnez, 1994; Chapron *et al.*, 1998b).

L'isterectomia per via laparoscopica può essere eseguita utilizzando diverse tecniche. Noi utilizziamo la classificazione proposta da Mage *et al.* (1995), modificata con l'integrazione dell'isterectomia sub-totale (Armellino *et al.*, 1995).

Questa classificazione segue un criterio anatomico progressivo riguardo alle strutture che vengono trattate per via laparoscopica:

1) il primo tipo comporta l'emostasi e la sezione dei peduncoli annessiali, dei legamenti rotondi e della sommità del legamento largo (figg. 19 e 20);

2) il secondo tipo comporta in più la dissezione della vescica e l'emostasi dei peduncoli uterini (figg. 21 e 22);

3) il terzo tipo comporta anche la dissezione della cervice per via intrafasciale, l'emostasi dei peduncoli cervico-vaginali e la incisione della vagina, che può così rappresentare (fig. 23) la via di estrazione dell'utero già liberato da tutte le sue connessioni vascolari e legamentose;

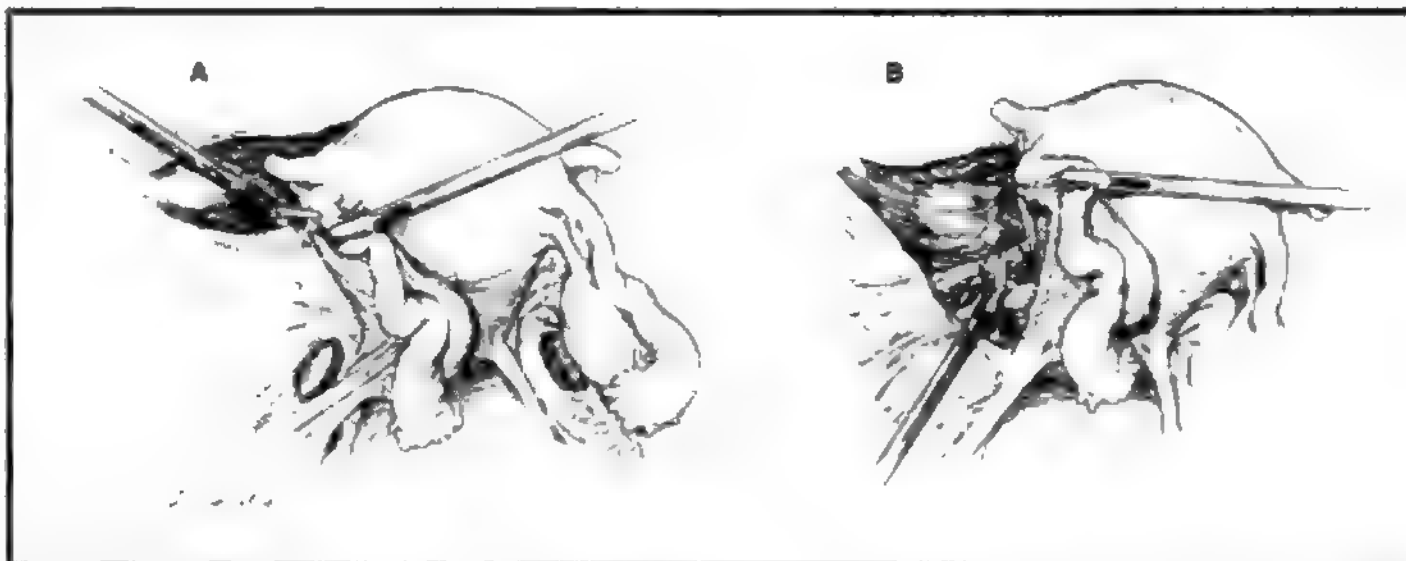
4) il quarto tipo prevede la sola via laparoscopica per la rimozione dell'utero (che viene sottoposto a manovre di *morcellement*) e per la sutura della cupola vaginale;

5) il quinto tipo è rappresentato dall'isterectomia sub-totale con conservazione dei legamenti sacrali e cardinali. Quest'intervento consente di ridurre il rischio del prolasso della cupola vaginale che rappresenta la più frequente complicanza a distanza.



Fig. 21. Isterectomia per via laparoscopica: dissezione della vescica. A) Completamento del *flap* vescicale mediante idrodissezione. B) Il peritoneo viene sollevato e la vescica scollata dall'utero. C) L'emostasi dei pilastri vescicali viene ottenuta con l'elettrocoagulazione. (Da Gomel e Taylor, 1995).

Fig. 22. Isterectomia per via laparoscopica: legatura e sezione dei vasi uterini. A) Il foglietto posteriore del legamento largo viene inciso procedendo verso il basso, parallelamente all'utero, e i vasi uterini vengono isolati. B) I vasi uterini vengono legati e sezionati. (Da Gomel e Taylor, 1995).



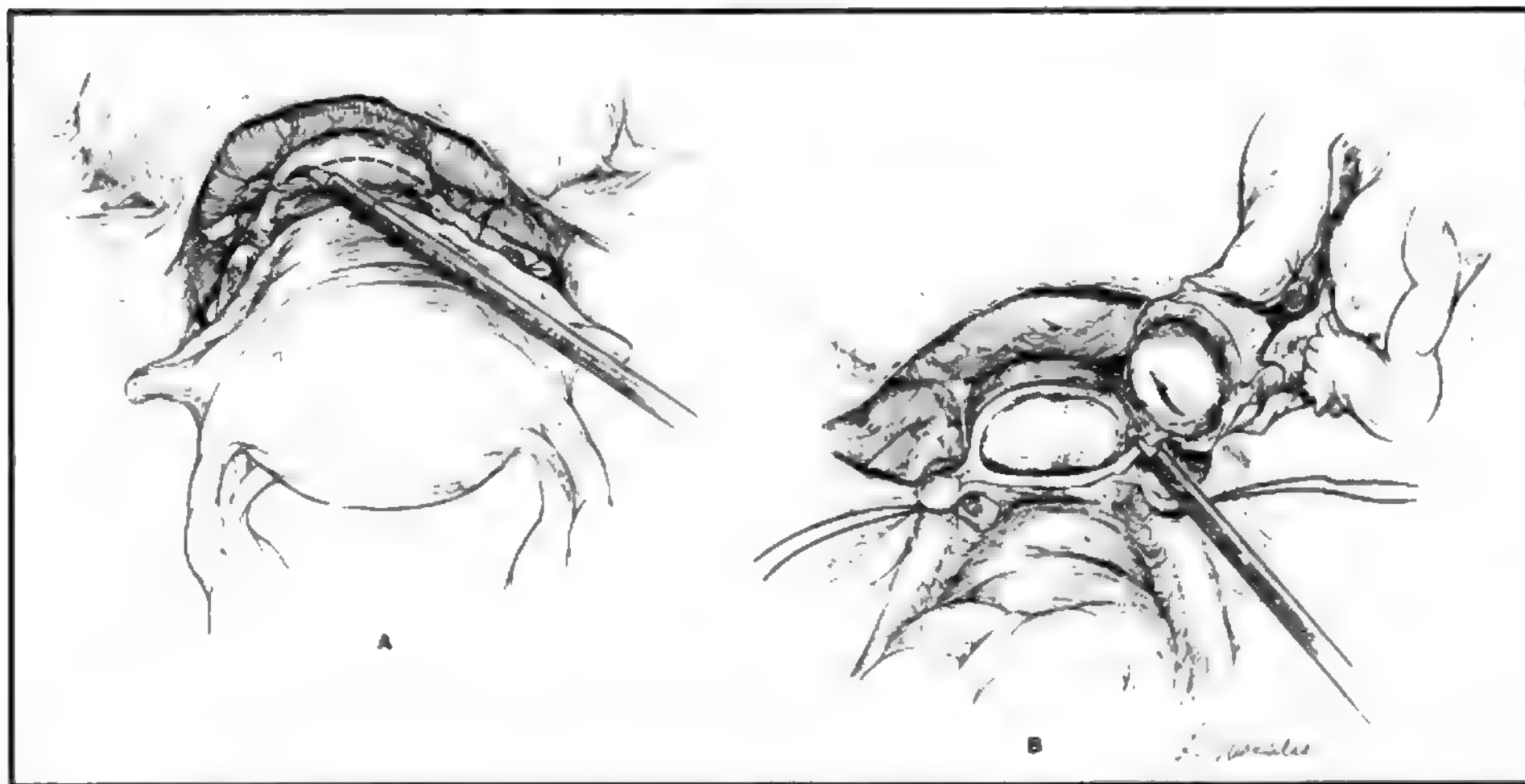


Fig. 23. Isterectomia per via laparoscopica: apertura dei fornici vaginali e incisione della volta vaginale. A) Il fornice vaginale anteriore viene aperto. B) La volta vaginale viene incisa lungo tutta la circonferenza della cervice. (Da Gomel e Taylor, 1995).

I primi due tipi costituiscono l'isterectomia vaginale assistita per via laparoscopica (LAVH: *Laparoscopically Assisted Vaginal Hysterectomy*), il secondo e il terzo tipo l'isterectomia totalmente laparoscopica (LH: *Laparoscopic Hysterectomy*) mentre il quinto tipo costituisce l'isterectomia laparoscopica sub-totale (CASH o LSH).

Noi siamo convinti che l'isterectomia sub-totale rappresenti il giusto compromesso tra la sospensione della cupola vaginale che viene effettuata per via laparotomica attraverso i legamenti utero-sacrali e i legamenti rotondi e le diverse tecniche di isterectomia per via laparoscopica che spesso non consentono l'esecuzione di questo tempo chirurgico.

Per ovviare al rischio di carcinoma della *portio* residua sono state proposte diverse tecniche di rimozione della giunzione squamo-colonnare. Noi utilizziamo lo strumento, ideato da Semm (1993) (figg. 24, 25 e 26), costituito da un cilindro a bordi taglienti che con la guida di un isterometro consente di asportare il tessuto cervicale.

Le controindicazioni all'isterectomia laparoscopica sono rappresentate dalle controindicazioni generiche legate al tipo di anestesia necessaria per eseguire la laparoscopia, dall'esistenza di un prolasso dell'utero e da un volume dell'utero superiore a quello di una gravidanza al 3° mese.

Le complicanze più frequenti interessano le vie urinarie e l'intestino. Sono stati descritti sanguinamenti da insufficiente emostasi dei peduncoli vascolari che complicano il 5-10% degli interventi.

L'esecuzione dei primi due tipi di isterectomia laparoscopica consente di allargare le indicazioni alla colpoisterectomia, eliminando le controindicazioni classiche di questa via (endometriosi, pregressa chirurgia pelvica, aderenze, patologie annessiali).

Noi riteniamo, in conclusione, che l'isterectomia vaginale assistita per via laparoscopica sia indicata quando è necessario eseguire l'asportazione totale dell'utero mentre negli altri casi possa essere eseguita l'isterectomia sub-totale laparoscopica.

Uroginecologia (trattamento della *stress incontinence*)

Dopo più di cento anni di esperienza nel trattamento chirurgico dell'incontinenza urinaria, con più di 150 tecniche descritte, oggi si ritiene che la colposospensione retropubica secondo Burch sia la tecnica che consenta di ottenere il maggior numero di successi. L'intervento di Burch risulta efficace nel 57-100% dei casi trattati (Lam e Hadley, 1991). L'esecuzione di questo intervento per via laparoscopica è stata descritta agli inizi degli anni '90 (Vancaille e Schuessler, 1991) ed è oggi ben codificata grazie alla perfetta conoscenza dello spazio del Retzius ed alla padronanza della tecnica di legatura dei nodi endoscopici (von Theobald *et al.*, 1997; Salvat *et al.*, 1998).

Due sono le vie di accesso allo spazio del Retzius: una retroperitoneale (Wattiez *et al.*, 1995) ed una transperitoneale (Liu, 1994).

Noi utilizziamo la prima: si effettua una incisione della cute, del sottocute e della fascia sulla linea mediana circa 2 cm al di sopra del pube. Dopo aver aperto lo spazio sotto-aponeurotico, un dito introdotto nel cavo sovrapubico consente di identificare i legamenti di Cooper e di scollare lateralmente e verso l'alto il sacco peritoneale in modo da rendere possibile l'inserimento dei due *trocars* operatori laterali. Il *trocar* ottico viene introdotto attraverso l'incisione cutanea. La tenuta dello pneumoperitoneo viene assicurata da una sutura a borsa di tabacco eseguita intorno al *trocar*. La CO₂ viene insufflata fino ad ottenere una pressione di circa 8-10 mmHg. Attualmente sono in commercio *trocars* monouso dotati di un palloncino gonfiabile. Il palloncino, dopo l'introduzione del *trocar*, viene posizionato sotto la fascia e gonfiato. La dissezione viene ottenuta per distensione grazie all'insufflazione effettuata sotto controllo visivo. Viene così eliminato il rischio di ipercapnia e di lesioni delle strutture anatomiche.

Attraverso la via transperitoneale (Liu, 1994) vengono identificati il pube, i legamenti di Cooper (visibili per tra-

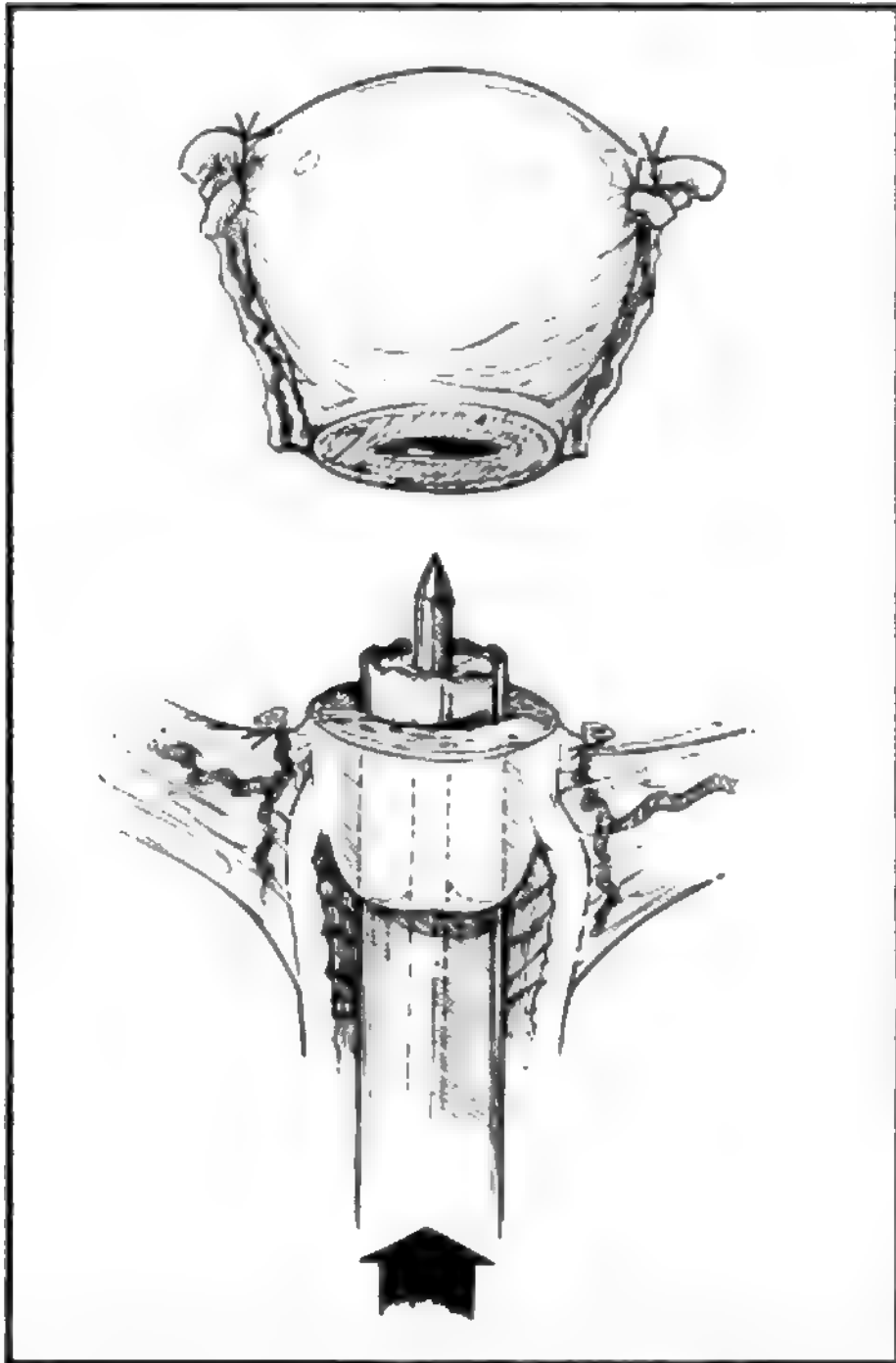


Fig. 24. Isterectomia sub-totale per via laparoscopica. Asportazione della giunzione squamo-colonnare (dopo che è stata completata l'isterectomia sub-totale) con lo strumento per la resezione calibrata dell'utero di Semm (CURT). (Da Gomel e Taylor, 1995).

sparenza) e i margini della vescica. Il peritoneo viene inciso con un elettrodo monopolare da un'arteria ombelicale all'altra, al di sopra del margine superiore della vescica. Lo pneumoperitoneo ottenuto ad una pressione di 8-10 mmHg causa una pneumodissezione che favorisce l'apertura dello spazio.

Dopo aver raggiunto lo spazio del Retzius, attraverso una delle due vie, ha inizio l'intervento di colposospensione vero e proprio. L'ago viene fatto passare attraverso il legamento di Cooper dall'alto verso il basso, trafiggendo una quantità di tessuto sufficiente a garantire un solido attacco all'angolo uretro-vescicale che viene evidenziato dal dito introdotto nella vagina da un assistente. Le complicanze sono rappresentate dalle emorragie legate all'emostasi imperfetta e dalle lesioni vescicali. È nostra abitudine, infine, lasciare un catetere a permanenza per almeno 48 ore. Il trattamento della *stress incontinence* per via laparoscopica sembra promettente, sebbene si rendano necessarie ulteriori valutazioni a causa della sua recente introduzione.

Oncologia ginecologica

Il ruolo della chirurgia laparoscopica nell'arsenale delle tecniche oncologiche ginecologiche deve essere considerato

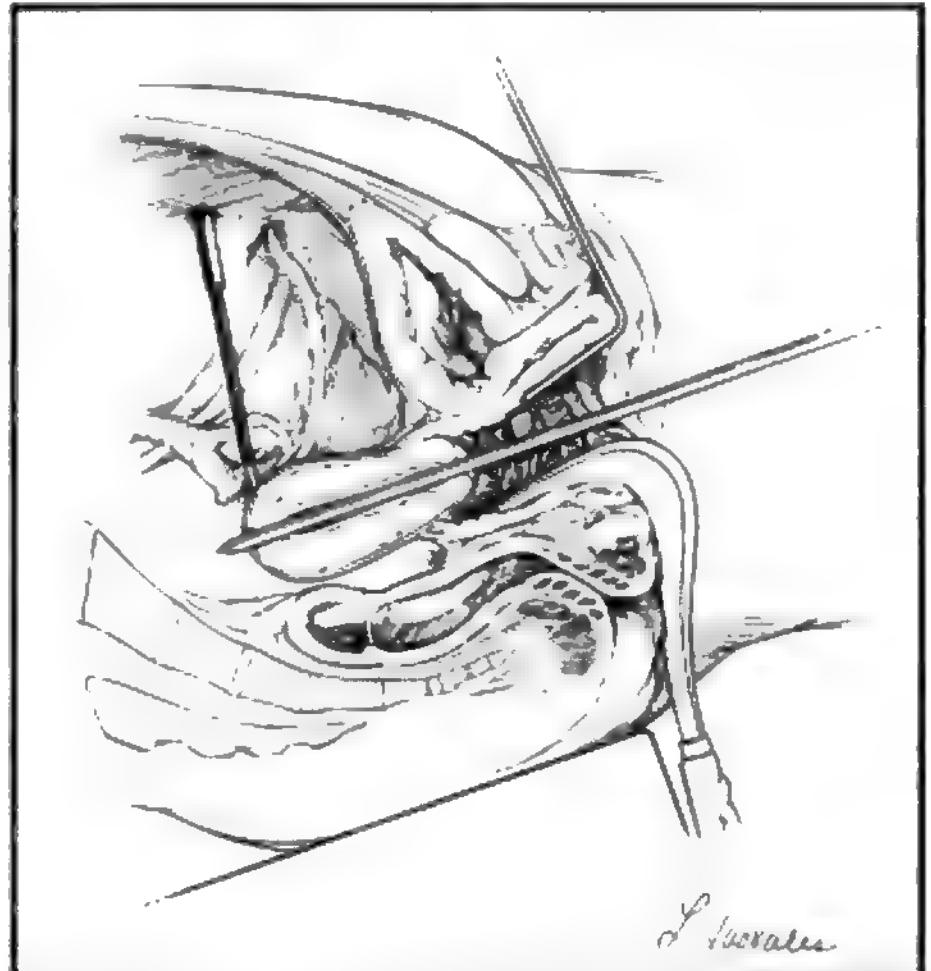


Fig. 25. Tecnica dell'isterectomia laparoscopica sub-totale secondo Semm. L'asta centrale del CURT viene fatta avanzare e il fondo dell'utero viene perforato sulla linea mediana. (Da Gomel e Taylor, 1995).

ancora sperimentale (Candiani *et al.*, 1997). La chirurgia oncologica per via laparoscopica, pertanto, deve essere eseguita solo nell'ambito di studi clinici condotti con accura-

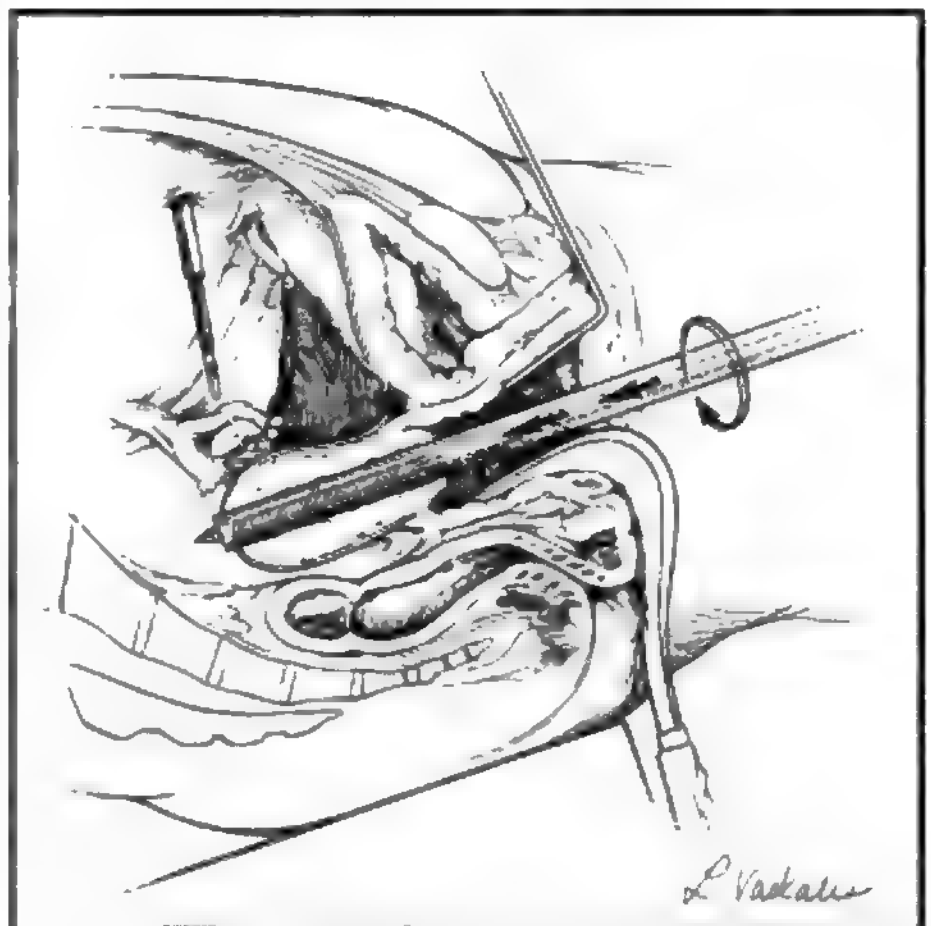


Fig. 26. Tecnica dell'isterectomia laparoscopica sub-totale secondo Semm. L'escissione della giunzione squamo-colonnare viene ottenuta con la rotazione in senso orario del cilindro tagliente del CURT. (Da Gomel e Taylor, 1995).

tezza (Candiani *et al.*, 1997; Darai *et al.*, 1998; Possover *et al.*, 1998; Lecuru e Taurelle, 1998).

Linfoadenectomia

La fallibilità dei metodi diagnostici indiretti (linfografia, T.A.C., agobiopsia, RNM) nell'evidenziare metastasi linfonodali di piccolo volume, associata all'eccessiva invasività della laparotomia, ha giustificato l'introduzione della linfoadenectomia pelvica e para-aortica laparoscopica nella stadiazione dei tumori ginecologici.

Il valore diagnostico di tali tecniche è stato oggetto di molti studi di controllo ed è ormai assodato che i risultati, in termini di linfonodi rimossi, sono sovrapponibili a quelli della chirurgia tradizionale. Si va infatti da una media di 5-7 linfonodi, asportati per via laparoscopica dall'area otturatoria e dalla catena mediale dei linfonodi iliaci esterni, ai 4,7-5,2 linfonodi rimossi per via laparotomica nelle stesse aree (Parra, 1992).

La linfoadenectomia laparoscopica è stata proposta nella stadiazione prechirurgica del carcinoma della cervice ed è stata inclusa nel trattamento del carcinoma della cervice in molti dipartimenti oncologici (Candiani *et al.*, 1997). Con questa tecnica è possibile trattare la maggior parte delle pazienti per via vaginale con l'operazione di Schauta evitando il ricorso alla laparotomia (Candiani *et al.*, 1997).

La linfoadenectomia pelvica laparoscopica può essere effettuata per via retroperitoneale o transperitoneale.

1. *Linfoadenectomia pelvica retroperitoneale.* - L'operatore si dispone tra le gambe divaricate della paziente ed esegue una incisione cutanea di 2 cm sulla linea mediana, 3-4 cm al di sopra della sinfisi pubica. Si incide longitudinalmente la linea alba che separa i muscoli retti dell'addome.

Si introduce il dito nella zona del cavo sovrapubico anteriormente allo spazio retroperitoneale del Retzius. In questo modo si esegue uno scollamento bilaterale liberando la parete anteriore della vescica dalla faccia posteriore del pube. Si raggiungono, sempre con il dito, per via smussa, i vasi iliaci esterni sulla cresta pettinea e si scolla il peritoneo pelvico dai suddetti vasi. Si introduce, quindi, un *trocars* da 10 mm attraverso il foro sovrapubico e lo si orienta dal lato che si vuole esplorare nello spazio retroperitoneale creato in precedenza. Si immette CO₂ per ampliare lo spazio e si introduce l'ottica. A questo punto l'operatore si dispone sul lato della paziente, controlaterale alla emipelvi presa in esame. Sotto controllo visivo attraverso il monitor si introducono 2 *trocars* da 5 mm nello spazio retroperitoneale creato, il primo rasente alla cresta pettinea, il secondo circa 5 cm al di sopra del primo. Si introducono attraverso questi *trocars* 2 pinze da presa. Quella superiore serve soprattutto a sollevare la «tenda» peritoneale in cui si visualizzano il legamento rotondo e il legamento ombelicale. Con la sua punta si collabora all'azione principale della seconda pinza, che è quella di scollare, per via smussa, il tessuto adiposo e di mettere in evidenza i vasi iliaci. Si vengono così ad evidenziare, in successione, la vena iliaca esterna, il nervo otturatorio e l'arteria iliaca esterna. Nel tessuto adiposo che circonda queste entità anatomiche sono presenti i linfonodi delle varie stazioni.

Utilizzando il celioestrattore (o pinza da zucchero) di Dargent (1992), si asporta il tessuto che viene inviato per l'esame istologico estemporaneo.

Sollevando bene la tenda peritoneale con la pinza superiore si mette in evidenza la biforcazione dell'arteria iliaca comune. Questa manovra consente di asportare anche i linfonodi interiliaci.

Si procede, infine, alla coagulazione con pinza bipolare dei vasi sanguinanti e si stende sul tessuto cruentato un velo di colla di fibrina umana.

2. *Linfoadenectomia pelvica transperitoneale.* L'ottica viene introdotta attraverso un *trocars* inserito in sede ombelicale. Prima di procedere alla linfoadenectomia è necessario individuare l'arteria ombelicale che, dopo l'incisione sulla parete addominale anteriore, l'arteria ombelicale viene afferrata con una pinza da presa e messa in trazione in modo da evidenziarne completamente il tratto che costituisce il limite mediale del campo operatorio, mentre

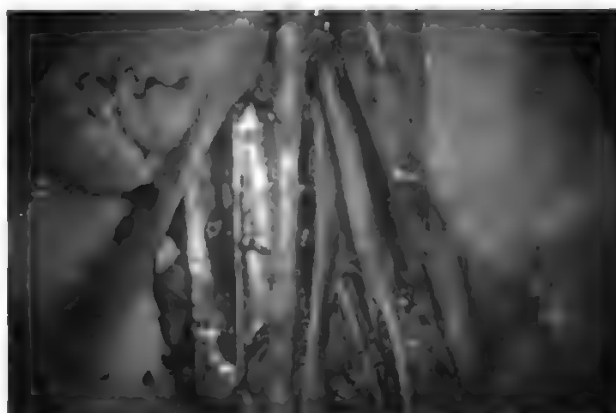


Fig. 27. Linfoadenectomia pelvica transperitoneale laparoscopica. Visualizzazione delle strutture vascolari e nervose dopo la linfoadenectomia. (Osservazioni degli AA.).

il limite esterno è definito dai vasi iliaci esterni. Si afferra, quindi, il legamento rotondo del lato in esame e con forbici bipolari lo si recide nella sua porzione intermedia. Si incide e si scolla il peritoneo viscerale seguendo il repere dell'arteria ombelicale. Con prudenza, con le pinze da presa e con le forbici, si esegue la dissezione del tessuto adiposo e linfatico sino ad evidenziare il nervo otturatorio e la fossa otturatoria. Procedendo in senso caudo-craniale si

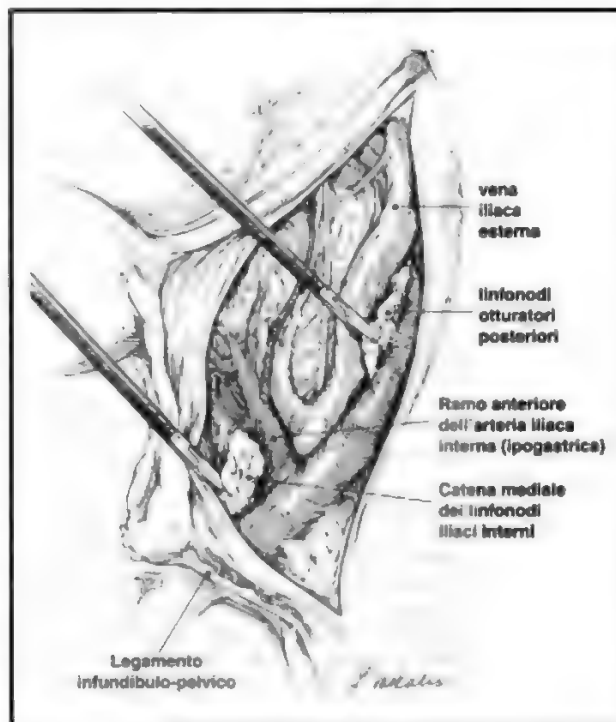


Fig. 28. Linfoadenectomia pelvica laparoscopica, veduta finale (lato destro). Al termine della linfoadenectomia pelvica l'operatore deve essere in grado di identificare il ramo anteriore dell'arteria ipogastrica, di spostare medialmente la vena iliaca esterna, di localizzare e asportare i linfonodi otturatorii posteriori situati al di sotto della vena iliaca esterna, di spostare in alto il legamento infundibulo-pelvico e di identificare, se necessario, la catena mediale dei linfonodi iliaci interni, fino al livello del promontorio del sacro. (Da Gomel e Taylor, 1995).

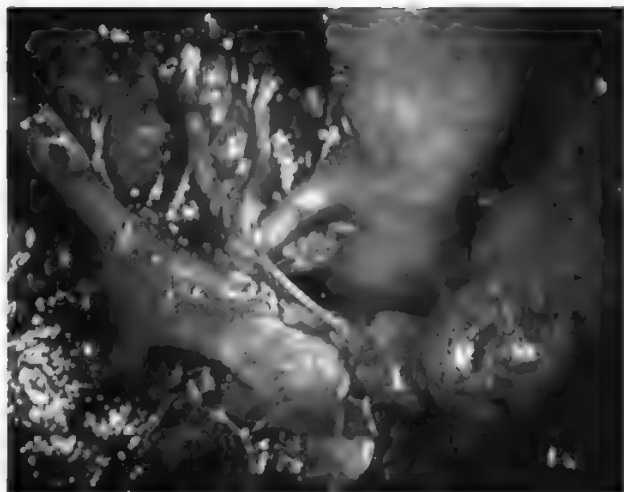


Fig. 29. Linfadenectomia paraortica: quadro finale. I vasi renali di sinistra appaiono ben evidenti. (Osservazione degli AA.).

liberano cautamente i linfonodi otturatori, iliaci interni ed interiliaci (figg. 27 e 28). Il materiale prelevato viene inviato per l'esame istologico estemporaneo. Gli stessi tempi vengono ripetuti sul lato opposto.

Alla fine dell'intervento si effettua un accurato lavaggio con acqua a 40 °C. L'emostasi viene effettuata con le pinze bipolari. I bordi del peritoneo viscerale vengono chiusi con *clips* metalliche.

3. *Linfadenectomia paraortica*. È stata descritta recentemente da Childers (1993). Dopo aver spinto l'intestino in alto a sinistra, si identifica l'aorta sotto il peritoneo fino alle radici dell'arteria mesenterica. Il peritoneo viene inciso a livello degli ultimi 5 cm dell'aorta e dei primi 2 cm dell'arteria iliaca comune destra mettendo così in evidenza e liberando poi per via smussa la parete anteriore dell'aorta e la vena cava alla sua destra. Si prepara così lo spazio retroperitoneale da cui si possono isolare ed asportare i linfonodi lateroaortici sinistri, i precavali, gli interaortocavali ed i laterocavali (figg. 29 e 30).

Per la stadiazione dei tumori ovarici la linfadenectomia paraortica deve essere estesa fino a livello della vena renale per asportare i linfonodi situati all'origine dei vasi ovarici.

Le pazienti destinate alla linfadenectomia debbono essere selezionate con estrema cura escludendo le pazienti obese o con estese aderenze intraddominali, in cui la disse-

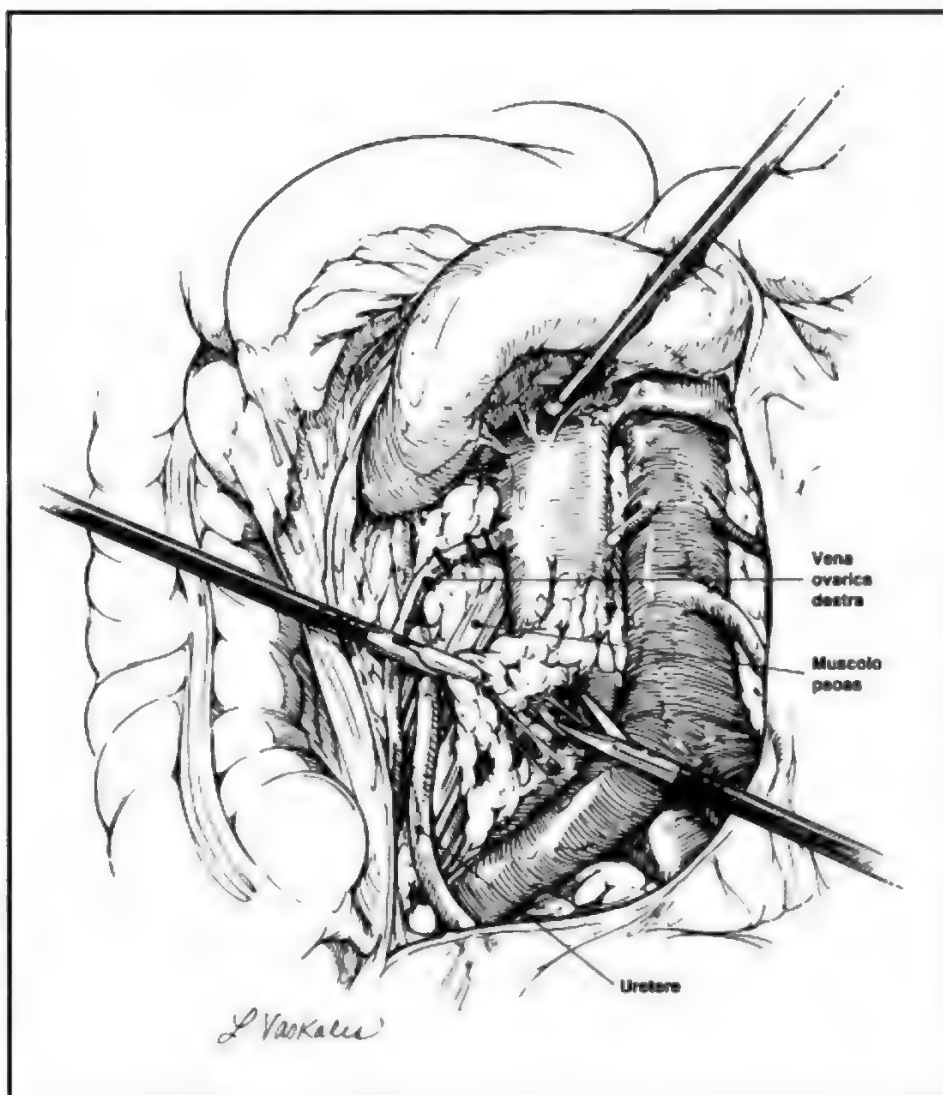


Fig. 30. Accesso all'area paraortica e dissezione dei linfonodi laterocavali e precavali. Il peritoneo posteriore è stato aperto lungo l'arteria iliaca comune di destra e l'aorta fino al livello della terza porzione del duodeno. Si noti il posizionamento delle *clips* sulla vena ovarica. (Da Gomel e Taylor, 1995).

zione paraortica e pelvica sarebbe problematica anche per via laparotomica, e quelle affette da gravi patologie respiratorie o cardiovascolari.

I rischi di danni iatrogeni sono simili a quelli della chirurgia laparotomica e sono rappresentati da lesioni vascolari, intestinali, vescicali e ureterali.

Noi eseguiamo la linfadenectomia laparoscopica per via transperitoneale nelle pazienti affette da neoplasie endometriali, ovariche e cervicali di diametro superiore a 4 centimetri. Questa via consente di effettuare anche la preparazione endoscopica dei legamenti cardinali e dei parametri durante la isterectomia radicale vaginale assistita per via laparoscopica (v. sotto), costituendo così il momento terapeutico della laparoscopia oncologica.

Trasposizione ovarica

Necessaria per evitare precoci castrazioni nelle giovani donne destinate alla radioterapia pelvica, la trasposizione ovarica laparoscopica ricalca i tempi di quella laparotomica: sezione dei legamenti annessiali, mobilizzazione dell'ovaio conservando la vascularizzazione del peduncolo infundibulo-pelvico e fissazione dell'ovaio con clips il più in alto e lateralmente possibile (Tulandi e Al Took, 1998).

Isterectomia radicale laparoscopica e isterectomia radicale vaginale assistita per via laparoscopica

L'isterectomia radicale laparoscopica (LRH: *Laparoscopic Radical Hysterectomy*) (Gynecologic Oncology Group Surgical Procedures Manual, 1989; Nezhat, 1992) e l'isterectomia radicale vaginale assistita per via laparoscopica (LARVH: *Laparoscopically Assisted Radical Vaginal Hysterectomy*) (Querleu, 1991; Dargent, 1992) sono state descritte pochi anni dopo la linfadenectomia laparoscopica.

Queste tecniche sono ancora in fase di valutazione ma la loro realizzabilità è stata ampiamente dimostrata. È opportuno precisare che sotto il termine di isterectomia «radicale» vengono compresi diversi interventi.

Gli interventi che comportano soltanto l'asportazione del tratto prossimale del parametrio medialmente all'uretere vengono compresi nella definizione di isterectomia radicale «prossimale» o «modificata».

L'isterectomia radicale «distale» o «classica» comporta l'asportazione di tutto il parametrio fino alla sua inserzione sulla parete pelvica.

La LRH è una isterectomia radicale «prossimale» e per questa ragione non assicura un grado soddisfacente di radicalità. Secondo Gomel e Taylor (1995) questo intervento viene eseguito più velocemente, più facilmente e con un grado maggiore di radicalità utilizzando contemporaneamente la via vaginale e quella laparoscopica. L'isolamento degli ureteri e la linfadenectomia vengono eseguiti per via laparoscopica mentre la sezione della cupola vaginale e del tratto prossimale dei parametri viene effettuata per via vaginale.

La LARVH è un'isterectomia radicale «distale» e può essere eseguita con tecniche diverse a seconda delle Scuole.

Nella LARVH secondo Gomel e Taylor (1995), il tempo laparoscopico comprende la linfadenectomia, la sezione dei vasi ovarici, la sezione delle arterie uterine alla loro origine e l'isolamento dell'uretere fino al livello della vescica (fig. 31). Il tempo vaginale comprende l'incisione della vagina e la sezione dei parametri a livello della loro inserzione sulla parete addominale (Gomel e Taylor, 1995).

Sia nella LRH che nella LARVH la sezione dei parametri viene effettuata con la coagulazione bipolare o con il bisturi elettrico (fig. 31).

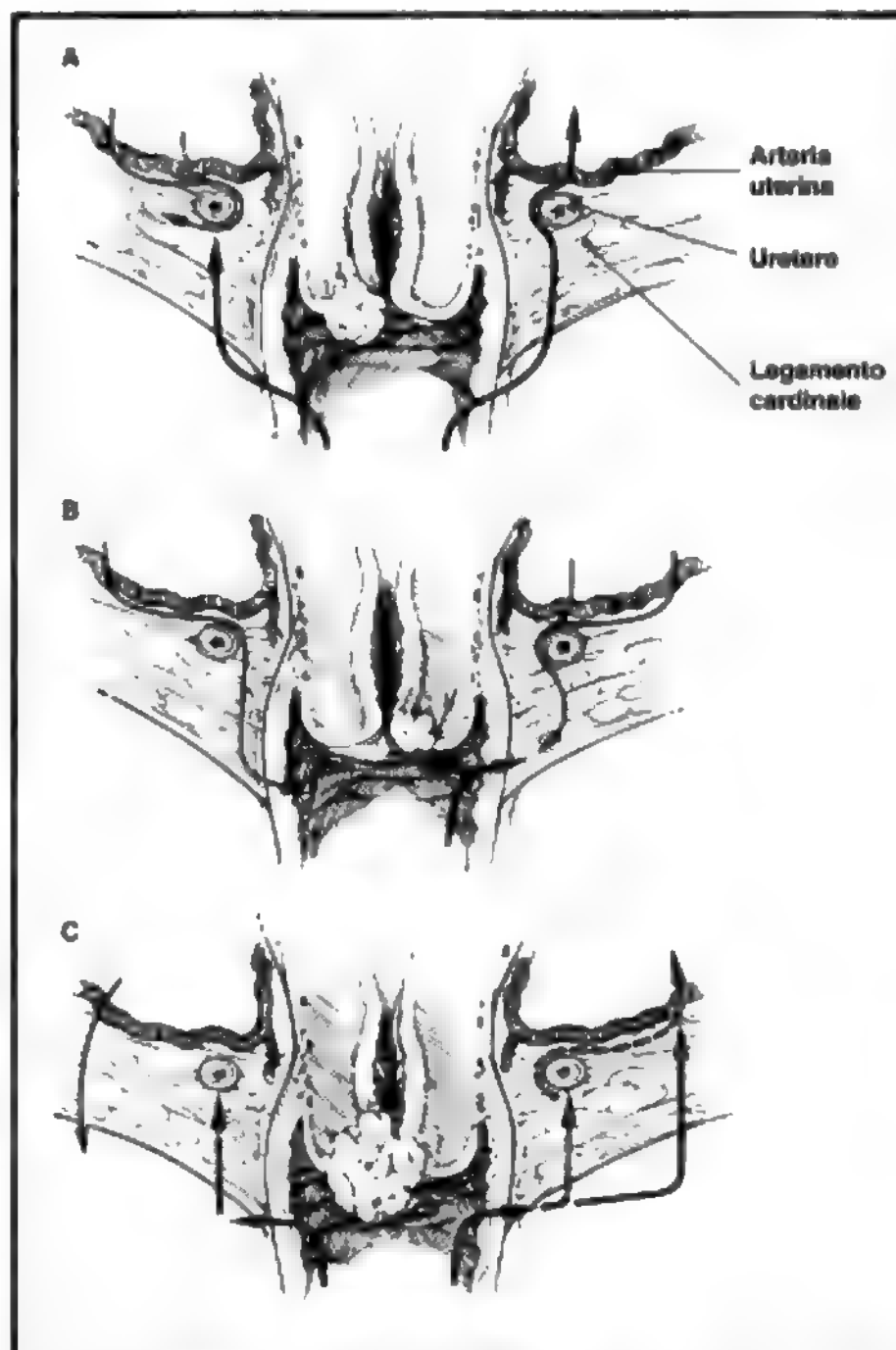


Fig. 31. Rappresentazione schematica delle diverse tecniche di isterectomia radicale. Le frecce provenienti dall'alto indicano i tempi laparoscopici dell'intervento, le frecce provenienti dal basso indicano i tempi vaginali. A) Isterectomia radicale modificata (MRH). Sul lato destro del disegno è stata raffigurata la MRH per via vaginale secondo la tecnica standard (tecnica di Schauta-Stoeckel). Sul lato sinistro è stata raffigurata la tecnica vaginale assistita per via laparoscopica di Querleu che prevede la sezione dell'arteria uterina alla sua origine (linea continua) o al livello del suo incrocio con l'uretere (linea tratteggiata). B) Isterectomia radicale modificata. Sul lato destro del disegno è stata descritta la tecnica di Canis *et al.* (1990) e di Nezhat *et al.* (1993). Alcuni tempi dell'intervento vengono eseguiti per via vaginale dopo la sezione parziale del tratto prossimale del legamento cardinale. Sul lato sinistro del disegno è stato rappresentato uno schema teorico dell'intervento totalmente laparoscopico. C) Isterectomia radicale. Sul lato destro del disegno è stata raffigurata la tecnica standard di Schauta-Amreich che prevede la liberazione dell'uretere, dell'arteria uterina (linea tratteggiata) e quindi la sezione del tratto distale del legamento cardinale (linea continua). Sul lato sinistro del disegno è stata raffigurata la tecnica assistita per via laparoscopica (secondo Dargent) che prevede dapprima la sezione del legamento cardinale per via laparoscopica e quindi la separazione dell'uretere dal pilastro vescicale per via vaginale (linea tratteggiata). (Da Gomel e Taylor, 1995).

La LARVH (detta anche *coelio-Schauta*) eseguita associando le due vie chirurgiche sfrutta i vantaggi e i tempi dell'approccio vaginale (relativa rapidità, eccellente eccesso dei parametri) e di quello laparoscopico (visione diretta degli ureteri e dell'origine delle arterie uterine, facile accesso agli spazi paravescicali e pararettali, linfadenectomia) assicurando un notevole grado di radicalità.

La LARVH potrebbe rivelarsi nel futuro la soluzione

chirurgica più logica poiché consente di evitare il disagio della laparotomia, la limitata radicalità della LRH e l'incisione perineale alla Schuchardt dell'intervento classico di Schauta.

Annessiectomia

Può essere eseguita per via laparoscopica mediante corrente bipolare, legatura o con l'impiego delle suturatrici automatiche (Gomel e Taylor, 1995). L'utilizzazione della corrente bipolare è la tecnica più veloce e meno costosa. È necessario afferrare gli annessi con una pinza ed esercitare una trazione allo scopo di esporre i legamenti ovarici.

L'identificazione dell'uretere e la scheletrizzazione dei vasi ovarici consentono di effettuare l'elettrocoagulazione in condizioni di efficacia e di sicurezza.

La tecnica contempla l'applicazione della corrente bipolare sui vasi ovarici che vengono gradualmente sezionati e la coagulazione dei monconi (Gomel e Taylor, 1995).

L'incisione del peritoneo delle due pagine del legamento largo viene effettuata dal legamento ovarico fino al corno uterino. Il peduncolo viene sollevato e sezionato dopo l'applicazione della corrente bipolare o di un endoloop (Gomel e Taylor, 1995). La rimozione del pezzo operatorio deve essere eseguita utilizzando il sacchetto endoscopico.

Omentectomia

L'omentectomia parziale o infracolica può essere eseguita per via laparoscopica con l'impiego dell'elettrochirurgia e delle forbici. L'omento viene reciso gradualmente attraverso multiple applicazioni di corrente monopolare o bipolare, seguite dalla sezione con le forbici (Gomel e Taylor, 1995).

Il pezzo operatorio, prima di essere rimosso per via vaginale insieme con l'utero o attraverso una minilaparotomia, viene adagiato nel cavo del Douglas o in una doccia paracolica (Gomel e Taylor, 1995).

Bibliografia

- Adamson G. D., Nelson H. P., *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 1997, **24**, 375.
 Adducci J. E., *Int. Surg.*, 1981, **66**, 359.
 American College of Obstetrics and Gynaecologists, *Gynecologic Oncology Group Surgical Procedures Manual*, 1989, Washington.
 Armellino F., Alovici C., Gargiulo T., L.S.H., *Isterectomia subtotale per via laparoscopica*, in *Endoscopia chirurgica in ginecologia*, 1995, C.I.C. Edizioni Internazionali, Roma, pp. 21-22.
 Bachmann G. A., *J. Reprod. Med.*, 1990, **35**, 839-862.
 Bachmann G. A., et al., *Obstet. Gynecol.*, 1998, **92**, 442.
 Bieluch W. M., Tally F. P., *Clinic Obstet. Gynecol.*, 1983, **93**, 103.
 Bromley B., Goodman H., Benecerraf B. R., *Obstet. Gynecol.*, 1994, **83**, 434-437.
 Bruhat M. A., *Coelioscopie opératoire*, 1989, Medsi McGraw Hill, New York.
 Bruhat M. A., Mage G., Manhes H., et al., *Acta Europ. Fertil.*, 1983, **14**, 113-116.
 Bruhat M. A., Mage G., Manhes H., Pouly J. L., *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 1981, **76**, 397-399.
 Bruhat M. A., Manhes H., Mage G., Pouly J. L., *Fertil. Steril.*, 1980, **33**, 411-414.
 Caffi T., Pallotti A., Gargiulo T., *Trattamento laparoscopico dell'endometriosi retroperitoneale*, in *Endoscopia chirurgica in ginecologia*, 1991, C.I.C. Edizioni Internazionali, Roma, pp. 101-102.
 Candiani M., et al., *Testo Atlante di chirurgia laparoscopica in Ginecologia*, 1997, Mosby Doyma Italia, Poli, Milano.
 Canis M., Mage G., Manhes H., et al., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1989, **150** (Suppl.), 15-20.
 Canis M., et al., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Repr.*, 1990, **19**, 921.
 Canis M., Mage G., Pouly J. L., et al., *Fertil. Steril.*, 1991, **56**, 616-621.
 Canis M., Mage G., Pouly J. L., et al., *Obstet. Gynecol.*, 1994, **83**, 707-712.
 Canis M., et al., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. Paris*, 1997, **26**, 293.

- Chapron C., et al., *Hum. Reprod.*, 1997a, **12**, 867.
 Chapron C., et al., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1998b, **27**, 55.
 Chapron C., et al., *J. Reprod. Med.*, 1997c, **42**, 201.
 Childers J., *Ref. Gyn. Obstet.*, 1993, **1**, 193-199.
 Cittadini E., *La sterilità umana*, 1976, Piccin ed., Padova, p. 403.
 Cook A. S., Rock J. A., *Fertil. Steril.*, 1991, **55**, 663-680.
 Daniell J., Herbert C. M., *Fertil. Steril.*, 1984, **41**, 558-563.
 Darai E., et al., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1998, **77**, 451.
 Dargent D., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Repr.*, 1992, **21**, 709-710.
 Dellenbach P., Muller P., Philippe E., *Infections utero-annexielles aigues*, *Encycl. Med. Chir. Gynecologie*, Paris, 1972, **470**, 1410.
 Donnez J., L.A.S.H., in *Les fibromes uterines*, Paris, 1994, pp. 163-175.
 Donnez J., Nisolle M., *J. Gynecol. Surg.*, 1989, **5**, 157-162.
 Dottino P. R., *Obstet. Gynecol.*, 1999, **97**, 223.
 Dubuisson J. B., Aubriot F. X., Cardone V., *Fertil. Steril.*, 1978, **47**, 225-228.
 Dubuisson J. B., et al., *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 1997, **9**, 233.
 Dubuisson J. B., Chapron C., *Chirurgie Endoscopique*, 1992, **4**, 12-15.
 Dubuisson J. B., et al., *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 1997, **9**, 233.
 Eschenbach D. A., et al., *Obstet. Gynecol.*, 1997, **89**, 184.
 Favez J. A., Vogel M. F., *Obstet. Gynecol.*, 1991, **78**, 660-665.
 Frangenheim H., *Laparoscopy and culdoscopy in gynecology*, 1972, Thieme, Stuttgart.
 Gargiulo T., *L'isteropepsi nella celiochirurgia moderna*, Atti del XV Congresso SIFES, 1992, Colesse Ed., Palermo, p. 149.
 Gargiulo T., Armellino F., Alovici C., *Gravidanza ectopica: non più limiti al trattamento laparoscopico*, in *Endoscopia Chirurgica in Ginecologia*, 1994, C.I.C. Edizioni Internazionali, Roma, 171.
 Gargiulo T., Armellino F., Alovici C., *Trattamento dell'endometriosi superficiale: vaporizzazione o escissione*, in *Endometriosi: fisiologia e clinica*, 1995, The Parthenon Publishing Group, New York-London, pp. 167-171.
 Giordano B., Contino B., Gippa R., Armellino F., Alovici C., Gargiulo T., *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 1994, **4**, 402-405.
 Gioannas H., *Fertil. Steril.*, 1984, **41**, 20.
 Goldfarb H. A., *J. Reprod. Med.*, 1992, **37**, 636-638.
 Gomel V., Erenus M., *The American Fertility Society, 46th Annual Meeting, Supplement (Abstract)*, 1990, P-497, S-106.
 Gomel V., Taylor P. J., in Insler V., Lunenfeld B. eds., *Reconstructive tubal surgery in the female infertility, male and female*, 1993, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Gomel V., Taylor P. J., *Diagnostic and operative gynecologic laparoscopy*, 1995, Mosby, St. Louis (traduzione italiana, 1998, UTET, Torino).
 Hasson H. M., *J. Reprod. Med.*, 1990, **35**, 863-867.
 Heaps J. M., Nieberg R. K., Berek J. S., *Obstet. Gynecol.*, 1990, **75**, 1023-1028.
 Henry-Suchet J., Soler A., Loffredo V., *J. Reprod. Med.*, 1984, **29**, 579.
 Herbert C. M., Segard J., Hill G. A., *Obstet. Gynecol.*, 1990, **75**, 139.
 Hibbard L. T., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1985, **152**, 456-461.
 Hudspeth A. S., *Arch Surg.*, 1975, **110**, 1233.
 Hulka J. F., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1975, **122**, 137-147.
 Kamprath S., et al., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1998, **78**, 113.
 Keckstein G., Keckstein S., Wolf A. S., *Int. J. Fertil.*, 1992, **37**, 82-85.
 Lam T., Hadley H. R., *Urol. Clin. North Am.*, 1991, **18**, 327-337.
 Le Boudec, Pouly J. L., Canis M., et al., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1991, **20**, 680-684.
 Lecuru F., Taurelle R., *Surg. Endosc.*, 1998a, **12**, 1.
 Lichten E. L., *Am. J. Gynecol. Health*, 1989, **3**, 144.
 Liu C. Y., *Baillière's Clin. Obstet. Gynecol.*, 1994, **8**, 789-798.
 Luciano A. A., Whitman G., Maier D. B., *Fertil. Steril.*, 1987, **48**, 1025-1029.
 Lundorff P., *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.*, 1997, **164**, 81.
 Mage G., Canis M., Manhes H., et al., *J. Gynecol. Surg.*, 1990, **6**, 71.
 Mage G., Masson F., Canis M., et al., *Laparoscopic Hysterectomy*, *Curr. Oper. Obstet. Gynecol.*, 1995, **7**, 283-289.
 Manhes H., Mage G., Pouly J. L., et al., *Nouv. Presse Med.*, 1983, **12**, 1431-1433.
 Mann W. J., Stenger V. G., *Obstet. Gynecol.*, 1978, **51**, 563.
 Mettler L., Semm K., *Int. J. Fertil.*, 1988, **33**, 389-392.
 Mettler L., Semm K., *Ir. J. Med. Sci.*, 1983, **152**, 26-28.
 Morice P., et al., *Contracept. Fertil. Sex.*, 1997, **25**, 375.
 Neiswander L. L., Toub D. B., *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparos.*, 1997, **4**, 269.
 Nezhat C. R., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1992, **166**, 864-865.
 Nezhat C. R., et al., *J. Gynecol. Surg.*, 1993, **9**, 105.
 Nezhat C. R., et al., *Fertil. Steril.*, 1998, **69**, 1048.
 Nisolle M., Smets M., Malvaux V., et al., *J. Gynecol. Surg.*, 1993, **9**, 95-99.
 Ostrzenski A., *J. Reprod. Med.*, 1998a, **43**, 361.
 Ostrzenski A., *Fertil. Steril.*, 1998b, **69**, 143.

LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA

- Palmer M. R., *Bull. Fed. Soc. Gyn. Obst.*, 1962, **14**, 298.
 Pansky M., Bukovski I., Golan A., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1989, **161**, 393-396.
 Parra R. O., *Staging laparoscopic pelvic lymphonodes dissection: comparison of results with open pelvic lymphadenectomy*, *J. Urol.*, 1992, **147**, 8755-8778.
 Patterson M. E., Jordan J. A., Logan R., *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 1978, **85**, 468.
 Perez J., *J. Reprod. Med.*, 1990, **35**, 625.
 Perry C. P., Azziz R., *Laparoscopic uterine nerve ablation, presacral neurectomy and appendectomy*, in Arziz, Murphy eds., *Practical manual of Operative Laparoscopy and Hysteroscopy*, 1992, Springer Verlag, New York.
 Possover M. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, **178**, 806.
 Puls L. E., Powell D. E., Depriest P. D. et al., *Gynecol. Oncol.*, 1992, **47**, 53-57.
 Querleu D., *J. Gynecol. Obstet. Biol. Repr.*, 1991, **20**, 747-748.
 Quinlan D. J. et al., *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.*, 1997, **4**, 215.
 Reedy M. B. et al., *J. Reprod. Med.*, 1997, **42**, 33.
 Reich H., McGlynn F., *J. Reprod. Med.*, 1987, **32**, 747.
 Rioux J. E., Yuzpe A. A., *Evaluation of female sterilization procedures*, in *Current Problems in Obstetrics and Gynecology*, vol. 11, 1979, Year Book, Chicago.
 Salvat J. et al., *Contracept. Fertil.*, 1998, **70**, 381.
 Semm K., *Intrafascial hysterectomy*, 1993, Wisap, Munich.
 Semm K., Mettler L., *Technical progress surgery via laparoscopy*, *Am. J. Obst. Gynecol.*, 1980, **138**, 121-127.
 Stein I. F., Leventhal M. L., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1935, **29**, 181.
 Steptoe P. C., *Laparoscopy in gynaecology*, 1967, Livingstone Edinburgh, p. 73.
 Steyaert H. et al., *Pediatr. Surg. Int.*, 1998, **13**, 384.
 Stovall T. G., Ling F. W., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, **168**, 1759-1762.
 Sutton C. J., Diamond M., *Endoscopic Surgery for Gynecologists*, 1993, Saunders, London, pp. 215-218.
 Sutton C. J., *Laser L.U.N.A.*, in Donnez J. ed., *Operative laser laparoscopy and hysteroscopy*, 1989, Nauwelaers Publishers, Brussels.
 Sutton C. J. et al., *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.*, 1997, **4**, 319.
 Trope C., *Neoplasia*, 1981, **28**, 117.
 Tulandi T., Al Took S., *Fertil. Steril.*, 1998, **70**, 381.
 von Theobald P. et al., *Surg. Endosc.*, 1997, **11**, 468.
 Wattiez A., Boughizane S., Alexandre F. et al., *Laparoscopic procedures for stress incontinence and prolapse*, *Curr. Operat. Obstet. Gynecol.*, 1995, **7**, 317-321.
 Wilcox L. S., Koonin L. M., Pokras R. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1994, **83**, 549-555.
 Yao M., Tulandi T., *Fertil. Steril.*, 1997, **67**, 421.
 Yoon I. B., King T. M., *J. Reprod. Med.*, 1975, **15**, 54-56.
 Zouves C., Urman B., Gornel V., *J. Reprod. Med.*, 1992, **37**, 205-209.

TEODORO MARUOTTI, FLAVIO ARMELLINO,
CARLO ALOVISI, TIGELLIO GARGILIO

LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA

1. laparoscopic pediatric surgery.

SOMMARIO

Premessa (col. 3079). - Tecnica (col. 3080). - Indicazioni (col. 3081).

Premessa

Sulla base dell'esperienza scaturita dalla laparoscopia diagnostica (v. LAPAROSCOPIA [VIII, 984; Agg. I, *4260]) e del grande sviluppo della laparoscopia chirurgica (v.*; v.***) nell'adulto, a partire dagli anni '90, anche in età pediatrica, ha avuto inizio la laparoscopia chirurgica, che si è andata poi rapidamente diffondendo tanto che allo stato attuale esistono casistiche numerose sulle sue applicazioni nei vari campi della patologia addominale.

La diffusione della laparoscopia chirurgica pediatrica [I. c. p.] si è avuta grazie agli stessi fattori che ne hanno consentito l'applicazione su vasta scala nell'adulto: decorso post-operatorio più semplice e indolore, più rapida canalizzazione intestinale, degenza molto più breve (in media inferiore di 3-4 giorni rispetto a quella della chirurgia convenzionale), minori incidenze di complicanze post-operative specie di coeliociti, meno fenomeni aderenziali ed infine, sul piano estetico, assenza di cicatrici. Tutti elementi

questi che compensano ampiamente il maggior costo degli interventi laparoscopici legato all'impiego della strumentazione necessaria, anche se con l'impiego di materiale riutilizzabile esso tende sempre più ad essere contenuto.

Anche per quanto riguarda la durata, all'inizio più lunga rispetto a quella della chirurgia tradizionale, essa si va riducendo mano a mano che aumenta l'esperienza degli operatori.

Un aspetto importante della chirurgia laparoscopica riguarda l'utilità o la necessità di convertire questa tecnica in un intervento di chirurgia tradizionale per l'insorgenza di complicanze non trattabili in corso di laparoscopia e di difficoltà tecniche che rendano difficile l'intervento.

Tecnica

La tecnica comprende due fasi consecutive: la prima per l'esecuzione del pneumoperitoneo, la seconda per l'introduzione del primo trocar per l'ottica e poi degli altri trocars in numero variabile, a seconda delle esigenze chirurgiche. Anche il calibro dei trocars è variabile a seconda dello strumentario da introdurre in addome: in genere in età pediatrica vengono utilizzati trocars da 3 o da 5 mm, ma sono disponibili anche cannule di diametro più piccolo (2,7; 2; 1,7 mm) o più grande (10; 12; 15 mm).

Negli ultimi anni, per quanto riguarda la creazione del pneumoperitoneo si è passati alla tecnica «open» (Esposito, 1997) introducendo il primo trocar sotto controllo diretto della vista poiché la tecnica «closed» che consisteva nel realizzare il pneumoperitoneo dopo l'introduzione dell'ago di Veress, è stata gradualmente abbandonata a causa delle complicazioni (peraltro rare, quali lesioni vascolari e/o di organi cavi) derivanti dall'introduzione del primo trocar alla cieca.

L'esecuzione del pneumoperitoneo deve essere quanto mai scrupolosa introducendo il gas (limitato oggi alla sola CO₂ essendo stato praticamente abbandonato il protossido di azoto) in maniera graduale sino a raggiungere le pressioni desiderate variabili da 4 a 12 mmHg a seconda dell'età e delle dimensioni del bambino.

Una volta eseguito il pneumoperitoneo si procede poi all'introduzione dell'ottica (di grado variabile da 0° a 70°) e quindi degli altri trocars che vanno posizionati in maniera diversa a seconda della patologia da trattare.

Prima di iniziare la laparoscopia va introdotto un catetere in vescica, se si deve lavorare nella parte bassa dell'addome, e un sondino naso-gastrico, se si devono esplorare strutture della parte alta. Infine è buona norma monitorare accuratamente nel corso dell'intero procedimento operatorio i vari parametri vitali (ECG, P.A., ossigenazione, pressione endoaddominale).

Gli aspetti peculiari della I. c. p. riguardano il posizionamento dei trocars; la strumentazione per l'esecuzione degli interventi; le modalità per effettuare l'emostasi e le legature e quelle per la rimozione di tumefazioni o di organi parenchimatosi.

Per quanto riguarda il posizionamento dei trocars, l'ottica viene inserita nella maggior parte dei casi, a livello ombelicale, mentre i trocars per gli strumenti operatori (in numero di 3 o 4) vengono posizionati a seconda della patologia da trattare, sempre rispettando il sistema della triangolazione che evita che gli strumenti possano incrociarsi tra loro.

Gli strumenti utilizzati in I. c. p. sono lunghi 20-25 cm rispetto ai 33 cm dell'adulto; i principali sono: una pinza da presa atraumatica possibilmente fenestrata, una forbice, un dissectore curvo ed un portaghi.

Le legature vengono realizzate sia con i fili di sutura tradizionali, oppure con *clips*, *endo-loop*, o suture auto-

TAB. I. INDICAZIONI ASSOLUTE ALLA LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA

Svuotamento e rimozione di cisti ovarica
Occlusioni intestinali da aderenze
Complicanze da <i>shunts</i> ventricolo-peritoneali
Testicoli endoaddominali (I e II tempo della tecnica di Fowler-Stephens)
Gonadectomie
Biopsie escissionali parenchimatose o di neoformazioni
Invaginazione intestinale (non complicata)
Colecistectomia
Reflusso gastro-esofageo

matiche, mentre l'emostasi può essere eseguita con sistema mono- o bipolare.

Quando è necessario l'impiego di drenaggi essi vengono fatti passare attraverso gli orifici dei *trocars*.

In caso di asportazione di organi, questi possono essere estratti sia direttamente attraverso l'orificio dei *trocars*, come avviene per la colecisti, oppure dopo l'introduzione in sacchi di plastica denominati *endo-bag*, come avviene per la splenectomia, all'interno dei quali l'organo viene frammentato con un morcellatore o col dito.

Indicazioni

Allo stato attuale le indicazioni alla l. c. p. possono essere distinte in assolute, relative ed evolutive.

Le indicazioni assolute (tab. I) comprendono le patologie per le quali nessun trattamento chirurgico convenzionale può essere ritenuto ideale mentre la laparoscopia è in grado di risolverli in maniera mininvasiva e in qualche caso addirittura in regime di *Day-Hospital*.

Esse comprendono il vuotamento o la rimozione di cisti ovariche soprattutto in epoca neonatale specie nei casi complicati da torsione o da processi infiammatori, le occlusioni intestinali da aderenze, le complicanze degli *shunts* ventricolo-peritoneali, il trattamento dei testicoli endoaddominali per i quali è possibile eseguire entrambi i tempi della tecnica di Fowler-Stephens per via laparoscopica (Esposito e Garipoli, 1997) o, come abbiamo realizzato recentemente, l'orchidopessi laparoscopica (fig. 1) in un tempo senza sezionare i vasi spermatici, le gonadectomie, le biopsie escissionali di organi parenchimatosi o di neoformazioni addominali. Anche l'invaginazione intestinale rappresenta una indicazione assoluta alla laparoscopia a meno che essa non sia complicata o non richieda una resezione intestinale nel qual caso è necessario completare l'intervento per via tradizionale, e così pure la colecistectomia,

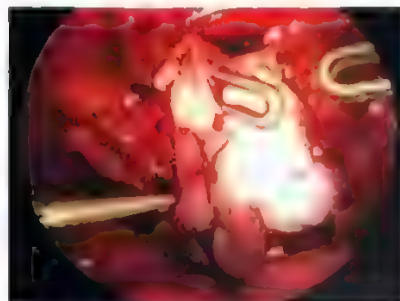


Fig. 1. Orchidopessi.

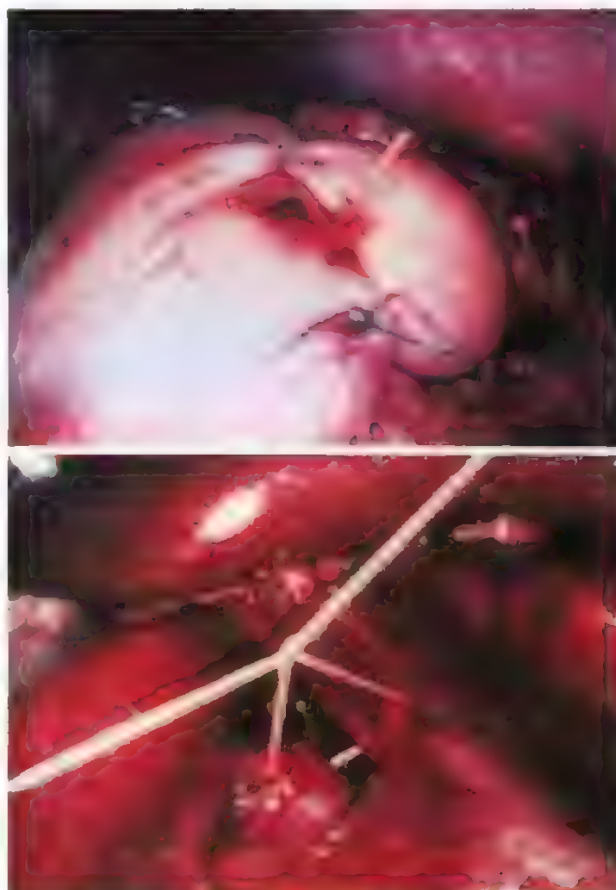


Fig. 2. Reflusso gastroesofageo. In alto: plastica secondo Nissen. In basso: sutura dei pilastri diaframmatici.

anche se le indicazioni a questo intervento in età pediatrica sono molto rare.

Infine la terapia laparoscopica rappresenta attualmente il «gold standard» nel trattamento dei pazienti affetti da reflusso gastroesofageo (fig. 2) refrattario alla terapia medica.

Le indicazioni relative (tab. II) comprendono le affezioni per le quali la laparoscopia si pone in alternativa alla chirurgia tradizionale rispetto alla quale può presentare i vantaggi della tecnica laparoscopica. Va inclusa in questo gruppo innanzitutto l'appendicectomia (fig. 3) in caso di appendicite acuta, specialmente nei casi complicati da peritonite diffusa o, soprattutto nei soggetti femminili, in caso di dubbio diagnostico. In questi casi infatti la laparoscopia

TAB. II. INDICAZIONI RELATIVE ALLA LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA

Appendicite acuta (anche con peritonite)
Acalasia esofagea
Diverticolo di Meckel
Duplicazioni digestive
Cisti mesenteriche
Vanocoele

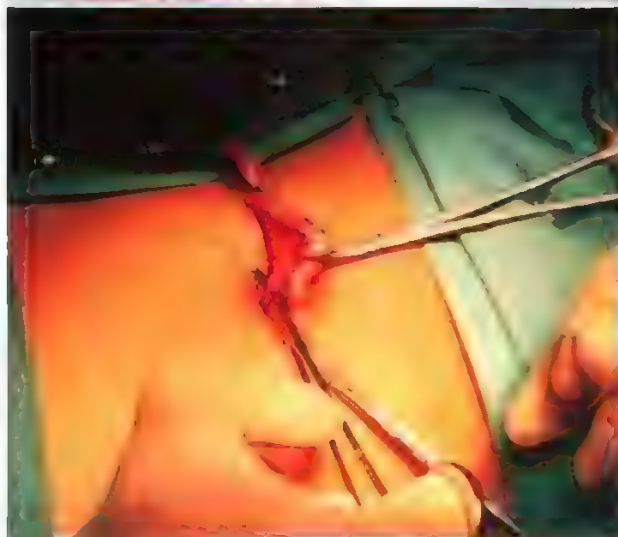
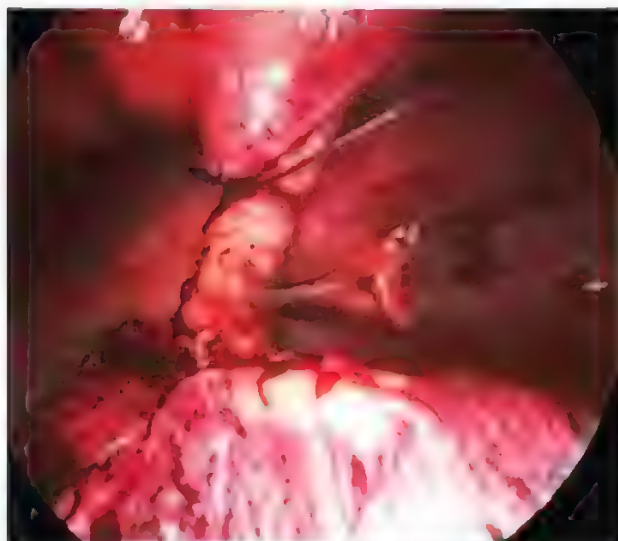
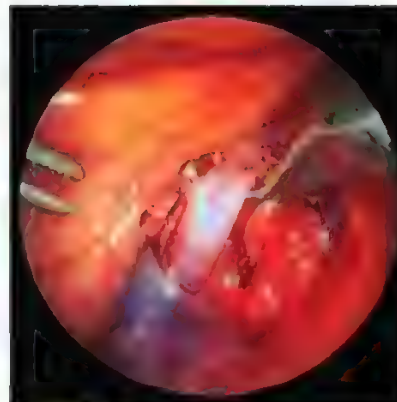


Fig. 3. Appendicectomia. *In alto*: asportazione con tecnica «in» dell'appendice in preda a infiammazione flemmonosa. *In basso*: asportazione dell'appendice con tecnica «out» per infiammazione catarrale.

Fig. 4. Varicocele: isolamento della vena spermatica.



permette una migliore visione addominale e consente di eseguire una toilette più completa ed accurata del cavo peritoneale rispetto alla chirurgia a cielo aperto. Inoltre altre indicazioni relative sono rappresentate dall'acalasia esofagea, dall'asportazione del diverticolo di Meckel, dalle duplicazioni digestive e dalle cisti mesenteriche, quando non richiedono una resezione intestinale. Anche il varicocele (fig. 4) può essere incluso in questo gruppo anche se nei casi di bilateralità l'indicazione per via laparoscopica diventa assoluta.

Le indicazioni evolutive (tab. III) infine sono quelle per le quali non esistono ancora sufficienti esperienze tali da farle considerare per ora una valida alternativa alla chirurgia tradizionale. Al primo posto v'è certamente la piloromiotomia (fig. 5) che presenta reali vantaggi solo nei casi in

TAB. III. INDICAZIONI EVOLUTIVE ALLA LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA

Piloromiotomia
Ernia inguinale
Splenectomia
Nefrectomia
Agangliosi intestinale
Traumi epatici e splenici

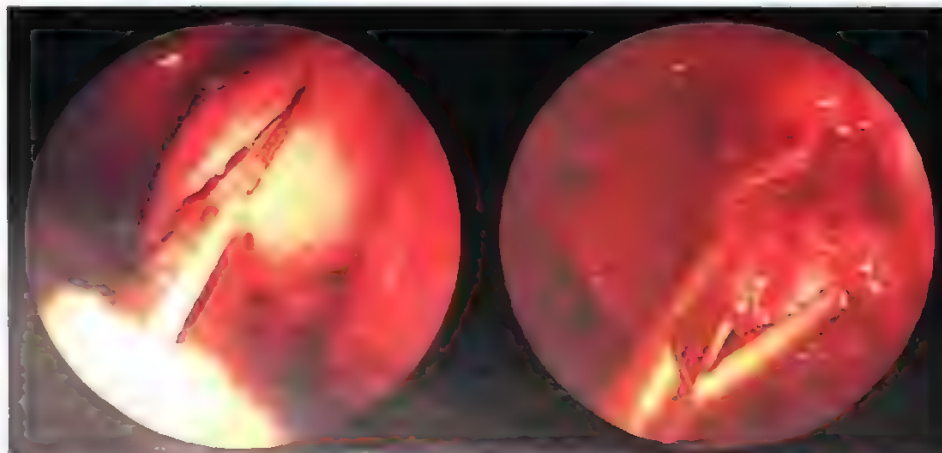


Fig. 5. Piloromiotomia. *A sinistra*: incisione dell'oliva pilorica. *A destra*: bene evidente la mucosa che si estroflette dai margini della piloromiotomia.

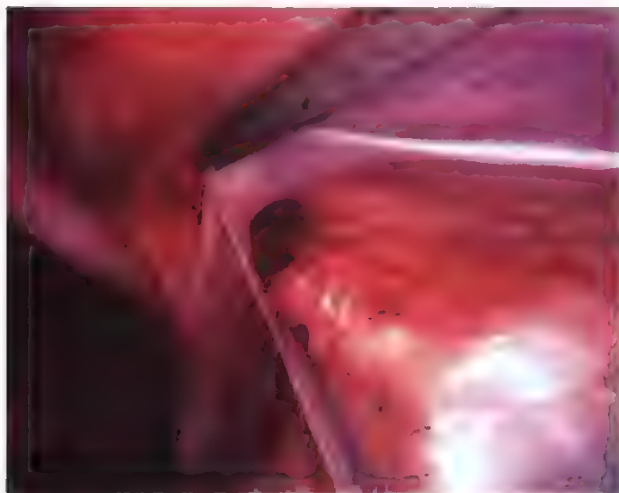


Fig. 6. Ernia inguinale congenita. In alto: bene evidente l'anello interno beante. In basso: sutura dell'anello interno.

cui l'oliva pilorica sia veramente molto grande. Anche il trattamento di un'ernia inguinale congenita (fig. 6) sembra un'indicazione interessante, soprattutto in caso di ernia recidivante nel qual caso la laparoscopia è certamente preferibile all'accesso tradizionale.

Sempre più numerose in questo gruppo sono poi le indicazioni (Esposito *et al.*, 1997) alla splenectomia (fig. 7) specialmente quando sia necessario effettuare nella stessa seduta una colecistectomia, alla nefrectomia (fig. 8) che attualmente viene realizzata per via retroperitoneale, agli interventi per agangliosi intestinale, al trattamento dei traumi epatici e splenici che non richiedano interventi ampiamente demolitivi, mentre restano confinate in esperienze isolate le indicazioni per le cisti del coledoco, per la colite ulcerosa e per le neoplasie addominali.

In conclusione così come la laparoscopia diagnostica rappresenta una indagine insostituibile per la definizione di patologie addominali non altrimenti diagnosticabili, così anche la l. c. p. si sta dimostrando una tecnica valida perché, evitando le incisioni della parete addominale e la manipolazione degli organi peritoneali, si viene a ridurre il dolore post-operatorio e le complicanze legate alla laparotomia quali la formazione di aderenze, le infezioni e la deiscenza della ferita.

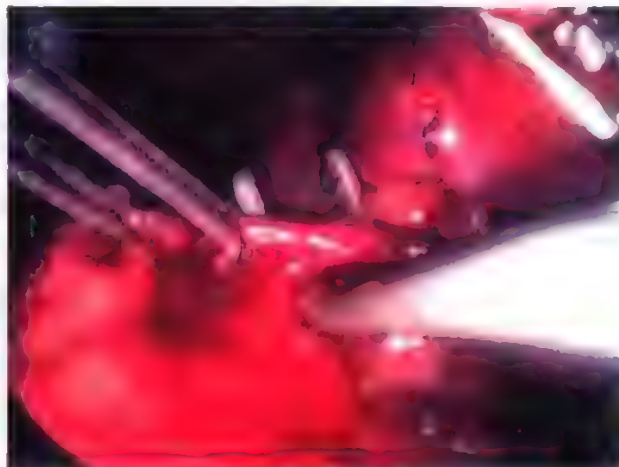


Fig. 7. Splenectomia: isolamento della vena splenica.

È prevedibile quindi che in futuro la laparoscopia chirurgica estenda sempre più le sue indicazioni nel bambino, spianando così la strada al suo routinario impiego con tutti i benefici psicologici, sociali, economici e tecnici facilmente immaginabili.



Fig. 8. Nefrectomia per rene multicistico. In alto: isolamento del rene. In basso: sua estrazione dall'addome.

LAPAROSCOPIA CHIRURGICA PEDIATRICA

Bibliografia

- Cortesi N., Ferrari P., Zambrada E. *et al.*, *Endoscopy*, 1976, **8**, 33-37.
 Esposito G., Porreca A., in «La laparoscopia in età pediatrica», *Aggiornamento del Medico*, 1986, **10**, 122-131.
 Esposito G., Porreca A., *Atlante di laparoscopia pediatrica*, 1991, Ed. Ciba-Geigy, Basel.
 Esposito C., Garipoli V., *J. Urol.*, 1997, **158**, 100-104.
 Esposito C., *Pediatr. Surg. Intr.*, 1997, **12**, 226-227.
 Esposito C., Corcione F., Garipoli V., Ascione G., *Pediatr. Surg. Intr.*, 1997, **12**, 509-510.
 Esposito C., Garipoli V., Leone L. *et al.*, *Eur. J. Coeliosurg.*, 1997, **1**, 73-75.
 Gans S. L., Austin E., *The technique of laparoscopy*, in Gans S. L., *Pediatric Endoscopy*, 1983, 10 ediz., Grune & Stratton, New York, pp. 151-194.
 Weis M. R., Seashore J. H., *J. Urol.*, 1987, **138**, 382-385.

CIRO ESPOSITO

LAPAROSCOPIA ECOGRAFICA: V. ECOGRAFIA**, *ecografia laparoscopica* (coll. **1748-1753).

LASER [v. Agg. I, coll. *4298-4462]

SOMMARIO GENERALE

FOTOSALDATURA LASER DEI TESSUTI IN MICROCHIRURGIA	col. 3087
ANGIOPLASTICA CORONARICA AL LASER	col. 3091
RIVASCULARIZZAZIONE TRANSMIOCARDICA MEDIANTE LASER	col. 3099
LASERTRISSIA DEI CALCOLI IN UROLOGIA	col. 3102
LASER IN ODONTOIATRIA	col. 3108

FOTOSALDATURA LASER DEI TESSUTI IN MICROCHIRURGIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3087). - **Microanastomosi vascolari** (col. 3087). - **Basi biologiche** (col. 3088). - **Tecnica chirurgica** (col. 3089). - **Varianti** (col. 3089). - **Problemi aperti** (col. 3090).

Introduzione

Per una curiosa coincidenza, il 1960 segna sia la data di nascita delle microanastomosi vascolari (Jacobson e Suarez) che quella dell'impiego della luce laser in medicina (Maimon).

In campo chirurgico, la luce laser fu impiegata inizialmente per ottenere la diresi dei tessuti, utilizzando laser di potenza elevata, dell'ordine di decine di watt. In seguito l'attenzione dei ricercatori si è rivolta al possibile impiego di questa tecnologia per ottenere la fotosaldatura di tessuti biologici, mediante l'assorbimento di radiazioni laser a bassa potenza da parte di questi; tali ricerche hanno interessato in modo più o meno sistematico tutti i vari tessuti molli.

Nell'ambito della sperimentazione strettamente microchirurgica, a parte gli sporadici tentativi di saldatura di strutture nervose periferiche, delle tube falloppiane e dell'intestino tenue, la fotosaldatura ha interessato essenzialmente le strutture vascolari.

Microanastomosi vascolari

I primi tentativi di ottenere la saldatura di monconi vascolari mediante un fascio di luce laser furono coronati da successo nel 1979 (Jain e Gorisch) con l'impiego di un laser Nd:YAG. Da allora ha preso inizio la linea di ricerca delle microanastomosi vascolari laser-assistite (LAMA = *Laser Assisted Microvascular Anastomosis*). L'attoria in evoluzione, sia dal punto di vista della ricerca della sorgente laser più

idonea — cosa, peraltro, apparentemente risolta — che da quello dell'applicazione clinica; questa diventerà, probabilmente, una procedura di routine con il miglioramento delle conoscenze del processo biologico della guarigione delle anastomosi e, in particolare, dei fenomeni biologici alla base dell'effetto di fotosaldatura indotto dalla luce laser.

Tra le varie sorgenti utilizzate successivamente, il laser a CO₂ (Neblett *et al.*, 1986) e ad argon (Godlewski *et al.*, 1986) sono stati quelli preferiti dai ricercatori, fino alle più recenti esperienze con il laser a diodo, adoperato inizialmente per riscaldare una sonda in ceramica con la quale, per contatto, venivano saldati i monconi vascolari (Unno *et al.*, 1989).

Basi biologiche

Studi di fotobiologia relativi all'interazione della radiazione laser con i tessuti hanno posto l'accento sulle modificazioni delle pro-

Fig. 1. Aspetto di LAMA arteriosa al termine dell'intervento.

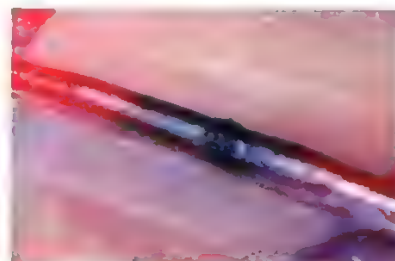


Fig. 2. Aspetto di LAMA venosa al termine dell'intervento.

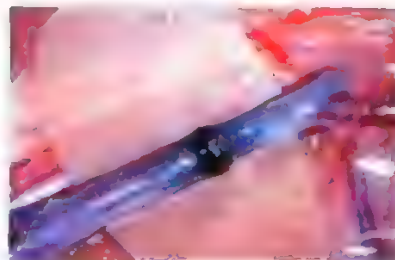


Fig. 3. Aspetto di LAMA arteriosa a 90 giorni dall'intervento.

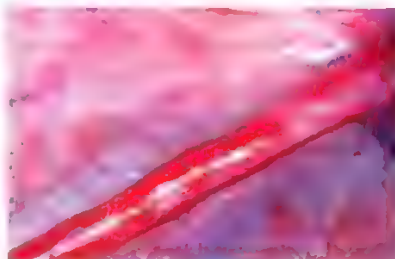
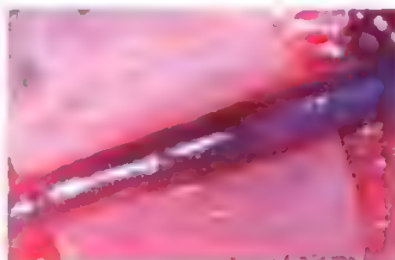


Fig. 4. Aspetto di LAMA venosa a 90 giorni dall'intervento.



teine della matrice extracellulare, in particolare del collagene e dell'elastina, quale base biologica del fenomeno della fotosaldatura; tale attivazione è mediata, essenzialmente, dall'incremento della temperatura nel sito di applicazione del fascio laser. Perciò, il controllo della temperatura è di fondamentale importanza per evitare danni termici da eccessivo riscaldamento dei tessuti irraggiati (White *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1989; Lemole *et al.*, 1991; Bass *et al.*, 1992). Le condizioni di irraggiamento, dipendenti dalla lunghezza d'onda della radiazione laser e dalla potenza impiegata, determinano differente penetrazione e deposizione di calore nei tessuti.

Il laser a diodo, dopo le ricerche effettuate presso la Columbia University (N.Y., USA), si è dimostrato particolarmente adatto alla fotosaldatura vascolare. La sua radiazione nel vicino infrarosso ($\lambda = 800-810$ nm), alle potenze attualmente disponibili (inferiori al Watt), non determina nessun effetto sui tessuti; tuttavia, l'applicazione di una soluzione di verde indocianina (Cardio-green®), pigmento caratterizzato da un picco di assorbimento in tale settore dello spettro, consente la saldatura di un'incisione longitudinale dell'aorta di coniglio direttamente con il fascio laser (Oz *et al.*, 1990). Utilizzando questo artificio per incrementare l'assorbimento ottico da parte dei tessuti, di recente è stato possibile allestire LAMA dei vasi femorali di ratto con una radiazione di potenza molto bassa (30 mW), equivalente ad una densità di potenza di soli 24 W/cm^2 (Reali *et al.*, 1993). In tal modo è possibile ottenere un'efficace fotosaldatura, con minimi rischi di danno termico.

Tecnica chirurgica

La tecnica della fotosaldatura laser dei monconi vascolari prevede, in genere, l'applicazione di tre o quattro punti di sutura, distribuiti simmetricamente lungo il diametro del vaso e, quindi, l'irraggiamento con il fascio laser nei settori così delimitati mentre, esercitando una delicata trazione su due punti contigui, si tengono tesi i bordi dei monconi, si da garantirne il contatto reciproco. La fase di irraggiamento, qualora si operi con laser a diodo, è preceduta dall'applicazione di una soluzione satura in plasma del cromoforo (Cardio-green®).

Vantaggi

La fotosaldatura dei tessuti mediante laser dei tessuti ha fatto seguito a innumerevoli tentativi di ridurre il trauma chirurgico rappresentato dai punti di sutura, in particolar modo su vasi di piccolo calibro, cioè con diametro da 1 a 3 mm, come quelli di solito interessati nell'attività microchirurgica, quale, per esempio, il trasferimento di lembi liberi. Collanti biologici e vari presidi chirurgici di metallo nobile (tantalio, platino) o di tessuto artificiale (polietilene, teflon) non si sono sinora affermati. Intorno ai punti di sutura e, sebbene in misura minore, intorno a qualsiasi materiale che assicuri la tenuta dell'anastomosi si sviluppa, durante il processo di guarigione, un processo flogistico più o meno intenso, caratterizzato dalla presenza di una reazione da corpo estraneo. L'assenza di materiale biologicamente estraneo a supporto della microanastomosi è il principale vantaggio della tecnica di fotosaldatura laser. Questo risultato è massimo quando, come si può osservare nelle figg. 1, 2, 3 e 4, è stato possibile ottenere LAMA senza l'applicazione di punti permanenti, ma solo di punti applicati durante l'irraggiamento del vaso e, quindi, rimossi a saldatura ottenuta (Gelli *et al.*, 1997). Il riscontro istologico del sito di anastomosi dimostra il ripristino quasi perfetto della parete arteriosa (fig. 5) e venosa (fig. 6). Il laser a diodo, utilizzato in quella ricerca (fig. 7), presenta indubbi vantaggi rispetto ad altre sorgenti: l'associazione del cromoforo consente di operare a una potenza ottica molto più bassa (30 mW), riducendo al minimo i rischi di danno termico; il costo minore, la facilità di manutenzione, il modesto ingombro e la possibilità di trasmettere il raggio in fibra ottica fanno sì che questa sorgente laser rappresenti l'ideale strumento per l'attività clinica.

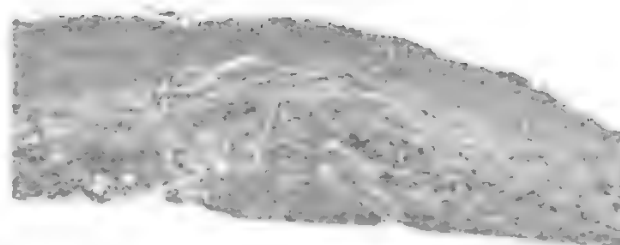


Fig. 5. Sezione di LAMA arteriosa a 90 giorni dall'intervento (colorazione ematossilina-eosina, $\times 250$).

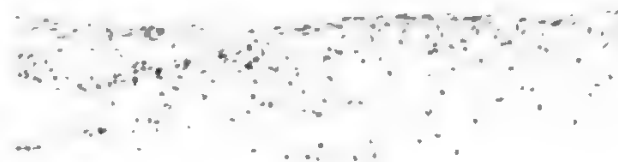


Fig. 6. Sezione di LAMA venosa a 90 giorni dall'intervento (colorazione ematossilina-eosina, $\times 250$).



Fig. 7. Sistema laser a diodo ($22 \times 25 \times 16$ cm, 3 kg), progettato dall'Istituto di Elettronica Quantistica (C.N.R.) di Firenze. Sorgente laser della Spectra Diode (San José, CA, USA); $\lambda = 800-810$ nm, potenza massima 0,5 Watt; trasmissione della radiazione in fibra ottica (diametro $400 \mu\text{m}$).

Problemi aperti

L'unica segnalazione di microanastomosi laser-assistite nella pratica clinica è riferita con laser a CO_2 , relativamente a sei pazienti affetti da patologia traumatica della mano e solo in un caso è riferito insuccesso (Kiyoshige *et al.*, 1991).

La tecnica di fotosaldatura laser è, sinora, sostanzialmente confinata in campo sperimentale a motivo delle problematiche specifiche che ciascun tessuto presenta relativamente ai parametri di irraggiamento: attualmente, la ricerca è rivolta in modo particolare al monitoraggio della temperatura e allo studio dei problemi connessi al suo variare (Kliozé *et al.*, 1994; Martinot *et al.*, 1994; Shenfeld *et al.*, 1994).

Relativamente al campo microchirurgico, mentre è difficile prevedere un'applicazione clinica delle tecniche di fotosaldatura dei nervi, si può ritenere più vicina — e non solo per la precedente segnalazione — la tecnica LAMA, una volta raggiunta una migliore conoscenza dei fenomeni biologici alla base dell'effetto di fotosaldatura indotto dalla luce laser.

Bibliografia

- Bass L. S., Moazami N., Pocsidio J. *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, 1992, **12**, 500.
 Gelli R., Pini R., Toncelli F. *et al.*, *J. Reconstr. Microsurg.*, 1997, **13**, 199.
 Godlewski C., Pradal P., Rouy S., *World J. Surg.*, 1986, **10**, 829.
 Jacobson J. H., Suarez E. L., *Surg. Forum*, 1960, **11**, 243.
 Jain K. K., Gorisch W., *Surgery*, 1979, **85**, 684.
 Kiyoshige Y., Tsuchida H., Hamasaki M. *et al.*, *J. Reconstr. Microsurg.*, 1991, **7**, 225.
 Kliozé S. D., Poppas D. P., Rooke C. T. *et al.*, *J. Urol.*, 1994, **152**, 744.
 Lemole G. M., Anderson R. R., DeCoste S., *Proceedings of Bio-medical Optics '91, SPIE Conference*, 1991, **1422**, 116.
 Maimon T. H., *Nature*, 1960, **187**, 493.
 Martinot V. L., Mordon S. R., Mitchell V. A. *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, 1994, **15**, 168.
 Murray L. W., Su L., Kopchok G. E., White R. A., *Lasers Surg. Med.*, 1989, **9**, 490.
 Neblett C. R., Morris J. R., Thomsen S., *Neurosurgery*, 1986, **19**, 914.
 Oz M. C., Chuck R. S., Johnson J. P. *et al.*, *Vasc. Surg.*, 1990, **24**, 564.
 Oz M. C., Johnson J. P., Parangi S. *et al.*, *J. Vasc. Surg.*, 1990, **11**, 718.
 Reali U. M., Gelli R., Giannotti V. *et al.*, *J. Reconstr. Microsurg.*, 1993, **9**, 203.
 Shenfeld O., Ophir E., Goldwasser B., Katzir A., *Lasers Surg. Med.*, 1994, **14**, 323.
 Unno N., Sakaguchi S., Koyano K., *Lasers Surg. Med.*, 1989, **9**, 160.
 White R. A., Kopchok G. E., Donayre C. E. *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, 1988, **8**, 83.

UMBERTO MARIA REALI

ANGIOPLASTICA CORONARICA AL LASER

SOMMARIO

Introduzione (col. 3091). - **Interazioni laser-tessuto** (col. 3092). - **Considerazioni tecniche** (col. 3093). - **Indicazioni e controindicazioni** (col. 3095). - **Complicanze** (col. 3096). - **Conclusioni** (col. 3097).

Introduzione

Con l'introduzione ed i successivi numerosi campi di applicazione dell'angioplastica coronarica transluminale percutanea, anche le limitazioni insite nell'utilizzo stesso di questa tecnica sono divenute rapidamente ovvie. Nonostante l'ampio successo dell'angioplastica coronarica convenzionale con palloncino (v. ANGIOPLASTICA TRANSLUMINALE PERCUTANEA [v.*; v.**]) ed il progresso effettuato sia nei materiali per la costruzione dei cateteri e dei palloncini da angioplastica sia nelle tecnologie di utilizzo degli stessi, l'incidenza di ristenosi compresa fra il 30 ed il 50% dei casi, rimane ancora oggi la maggiore limitazione di questa tecnica percutanea di rivascularizzazione. Negli ultimi anni sono stati proposti, svariati metodi alternativi per il trattamento non chirurgico della malattia aterosclerotica coronarica, soprattutto nel tentativo di ridurre l'incidenza di ristenosi e di altre complicanze proprie dell'angioplastica

tradizionale nel trattare particolari tipi di lesioni complesse quali stenosi diffuse dell'albero coronarico ed occlusioni croniche totali. L'angioplastica convenzionale con palloncino aumenta il calibro luminale grazie ad una frattura, compressione o dislocazione della placca aterosclerotica stessa. Il meccanismo d'azione dell'angioplastica coronarica al laser (dalle iniziali delle parole inglesi *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* e cioè «amplificazione della luce attraverso l'emissione di radiazioni») è basato sulla riduzione del volume della placca tramite un'ablazione termica della placca stessa. Teoricamente, questa tecnica dovrebbe aumentare la percentuale di successo della procedura di rivascularizzazione ed al tempo stesso ridurre l'insorgenza di complicanze acute e di ristenosi tardiva.

La prima applicazione del laser per vaporizzare una placca aterosclerotica fu effettuata nel 1963 da McGuff. Due decenni dopo, Choy e collaboratori (1984) impiegarono per la prima volta sulle coronarie di un paziente sottoposto ad un intervento di toracotomia, un laser ad argon ad onda continua con un semplice sistema di fibre ottiche. Nonostante il buon successo della procedura, tutti i segmenti trattati andarono incontro a ristenosi, soprattutto per il danno termico subito dalla parete vasale. Da questa esperienza iniziale, i progressi effettuati nella tecnologia del laser associati ad un miglioramento delle conoscenze sulle interazioni tra laser e tessuti biologici e ad una migliore definizione delle indicazioni cliniche, ha fatto in modo che le applicazioni di questa tecnica si siano ampliate. Lo scopo di questa voce è quello di dare brevi cenni sul funzionamento tecnico dei sistemi di angioplastica al laser, cui faranno seguito le indicazioni e le controindicazioni nell'utilizzo di questo particolare tipo di metodica con particolare enfasi sulla selezione del tipo di lesioni che possono essere trattate e dei potenziali rischi che ne possono generare.

Interazioni laser-tessuto

Le interazioni del laser con i tessuti biologici (v. LASER*; *4323-4328) dipendono soprattutto dalla lunghezza d'onda della luce laser impiegata, dal tipo di laser adoperato ed infine dalla capacità di assorbimento del tessuto su cui l'energia al laser viene impiegata. La maggior parte dei tessuti biologici assorbono la luce ultravioletta in una banda compresa tra 200 e 320 nm (Golobic e Bohley, 1992). La placca aterosclerotica assorbe fortemente la luce ultravioletta in una banda compresa tra i 290 ed i 320 nm, mentre il DNA assorbe l'ultravioletto in un banda compresa tra i 260 ed i 280 nm. Le interazioni laser-tessuto sono di tre diversi tipi: interazioni di tipo *termico*, interazioni di tipo *fotodissociativo*, ed interazioni di tipo *elettromeccanico*. Le interazioni termiche sono non specifiche e sono correlate soprattutto all'energia termica assorbita e trasferita all'acqua presente nel tessuto. Questo meccanismo è solitamente causato da laser ad onda continua in una banda visibile (laser ad argon) o in una banda vicina all'infrarosso (Nd:YAG laser). Le interazioni di tipo fotodissociativo vengono prodotte quando l'energia generata dal laser rompe i legami fra il carbonio e l'azoto e carbonio-carbonio presenti nelle proteine e nei lipidi del tessuto stesso. Queste interazioni sono indotte principalmente da laser ad eccimeri tipo il laser ad XeCl. L'ultimo tipo di interazioni, quelle elettromeccaniche, sono dovute all'elevato campo elettrico generato dall'energia prodotta dal laser, che provoca un'espansione del plasma con un effetto d'onda d'urto (Boulnois, 1992). Questo effetto può produrre una dissezione non solo nel tessuto sottoposto all'azione del laser ma anche distalmente alla zona trattata.

Considerazioni tecniche

Nella pratica clinica vengono attualmente utilizzati due tipi di sistemi: il laser ad eccimeri e quello ad olmio. Il laser ad eccimeri contiene una miscela fatta da un gas inerte (Xenon) ed un composto alogeno altamente diluito (cloro), i quali formano un dimero (Xenon-cloro: XeCl) che può essere eccitato da una stimolazione con una scarica elettrica ad alto voltaggio. Questo tipo di laser genera una luce con una banda a 308 nm, una durata di impulso di 135 nsec, una carica di 200 mJ/frequenza, ed una fluenza (densità dell'energia dell'impulso) di 30-60 mJ/mm². Il laser ad olmio (olmio-trizio-aluminium-garnet laser [Ho:YAG] ed olmio-trizio-scandium-gallium-garnet laser) sono laser allo stato solido che emettono delle radiazioni con impulsi nella porzione intermedia dello spettro infrarosso con una lunghezza d'onda di 2,1 µm, una durata di impulso di 250 µsec, un ciclo di ripetizione di 3,5 Hertz, ed un'energia di impulso superiore a 600 mJ. La radiazione ultravioletta generata dal laser ad eccimeri è assorbita in maniera predominante dalle proteine e dagli acidi mentre gli infrarossi sono assorbiti dall'acqua presente nei tessuti.

Il laser ad eccimeri e quello ad olmio sono generalmente usati con cateteri «over the wire». Per il laser ad eccimeri, i cateteri hanno un diametro usualmente compreso tra 1,3 e 2,4 mm, contengono un fascio di fibre ottiche delle dimensioni di 50-61 µm, e sono compatibili con cateteri guida del diametro di 0,014 pollici o del diametro di 0,018 pollici. Laser di tipo *concentrico* (fig. 8) e di tipo *eccentrico o direzionale* (fig. 9), sono disponibili in commercio ed attualmente utilizzati in differenti *trials* clinici. Se si esclude la porzione centrale del catetere, l'area attiva occupata dalle fibre ottiche, rappresenta il 20-25% della superficie totale alla punta del catetere stesso. Cateteri guida di 8 o 9 French possono essere utilizzati per l'introduzione del sistema al laser nell'albero circolatorio. In linea generale, il catetere al laser dovrebbe essere almeno di 1,0 mm più piccolo (o minore dei 2/3) del diametro maggiore del vaso da ricanalizzare per ridurre il rischio di perforazione. L'angioplastica al laser è solitamente eseguita grazie all'introduzione del si-

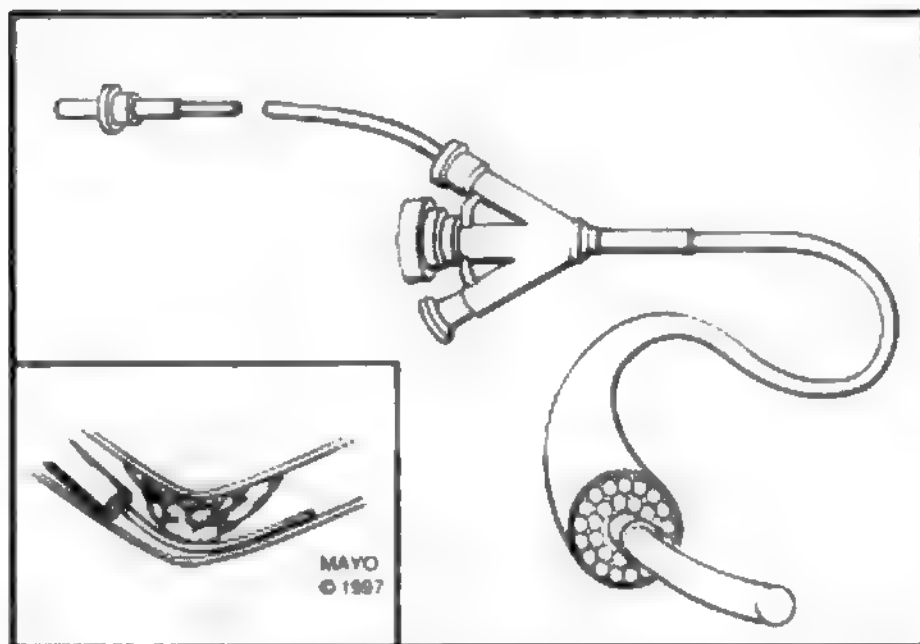


Fig. 8. Rappresentazione schematica di un catetere «over the wire» di tipo *concentrico* per angioplastica coronarica al laser. Il disegno del catetere fa sì che vi sia meno spazio inutilizzato alla punta del catetere stesso ed al tempo stesso permette di mantenere una buona flessibilità e maneggevolezza del sistema. L'insero in figura mostra il potenziale rischio nell'utilizzo di un catetere di tipo *concentrico* per il trattamento di lesioni su segmenti angolati. Il catetere seguirà la via di minore resistenza con conseguente perforazione o dissezione della parete vascolare normale.

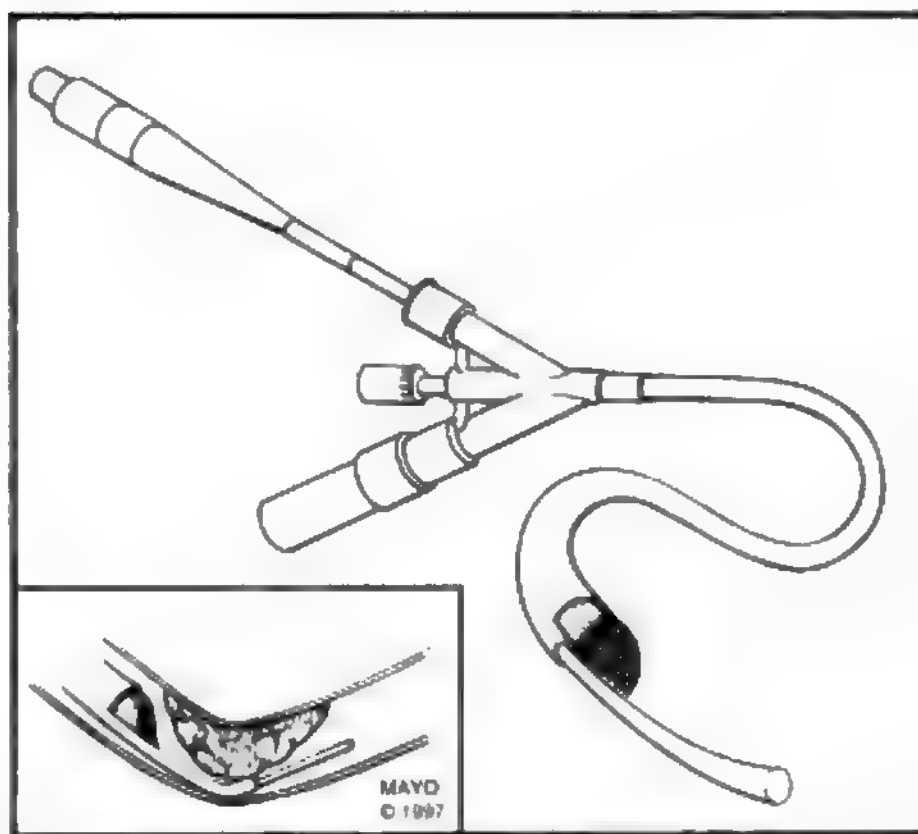


Fig. 9. Rappresentazione schematica di un catetere *eccentrico o direzionale* per angioplastica coronarica al laser. Il lume per lo scorrimento della guida è posizionato in modo *eccentrico* ed all'estremità opposta del fascio di fibre ottiche. La parte distale può venire facilmente ruotata per permettere l'ablazione di placche aterosclerotiche *eccentriche* senza pericolo di dissezione o perforazione dell'albero coronarico.

stema al laser ad una velocità di avanzamento di 0,5-1,0 mm/sec in un catetere guida posizionato attraverso la lesione coronarica. La velocità di avanzamento non dovrebbe mai eccedere quella di ablazione del tessuto. Un'infusione salina preriscaldata è solitamente iniettata durante il trattamento con il laser ad una velocità di infusione di 1-2 ml/sec per ridurre al minimo il rischio di dissezione coronarica e diminuire la formazione di bolle di vapore e di traumi acusto-meccanici alla parete vasale (Baumbach *et al.*, 1994; Deckelbaum *et al.*, 1995). L'energia utilizzata durante una procedura di angioplastica al laser con sistemi ad eccimeri è compresa fra i 20-25 mHz di «rate» di ripetizione e una fluenza di 40-60 mJ/mm². Energie più basse vengono generalmente utilizzate per lesioni dovute a ristenosi e per il trattamento di lesioni su innesti venosi, mentre energie più alte sono impiegate per lesioni aterosclerotiche non precedentemente trattate e per lesioni altamente calcifiche.

Il laser ad olmio (Ho:YAG laser) consiste di un catetere a fibre ottiche di diametro compreso fra 50 e 100 µm. Il fascio di fibre ottiche è disposto in maniera *concentrica* intorno ad un lume centrale di diametro compreso tra 0,014 e 0,018 pollici. A seconda del diametro del catetere utilizzato, possono essere impiegati cateteri guida di 8 o 9 French. Attualmente, sono disponibili cateteri al laser del diametro di mm 1,4; 1,5; 1,7 e 2,0. Il catetere è solitamente avanzato lentamente attraverso la lesione, generando una piccola serie di impulsi (tipicamente dagli 8 ai 12) ad una frequenza di ripetizione di 5 impulsi/sec. Al termine di ogni ripetizione, il catetere viene reintrodotto per permettere un flusso coronarico anterogrado e diminuire la temperatura nell'area trattata. Il sistema di angioplastica al laser, a differenza dell'angioplastica convenzionale con palloncino, non è un sistema espandibile: un catetere laser di 1,5 mm di diametro non può quindi creare un canale più grande di 1,5 mm. Un trattamento con angioplastica convenzionale è solitamente necessario dopo aver utilizzato

l'angioplastica al laser per ottenere delle stenosi residue inferiori al 30%.

Indicazioni e controindicazioni

Con il progressivo sviluppo e l'aumentato successo delle nuove tecniche percutanee di rivascularizzazione non chirurgica per il trattamento dell'aterosclerosi coronarica come gli *stent*, l'aterectomia rotazionale o quella direzionale (v. ATERECTOMIA CORONARICA**), le indicazioni correnti per l'utilizzo dell'angioplastica al laser sono diminuite. Molti sistemi al laser sono stati introdotti subito dopo i progressi effettuati nella costruzione ed impiego delle fibre ottiche per la visualizzazione dell'albero coronarico (Choy *et al.*, 1984) e sia il laser ad eccimeri che quello ad olmio sono stati da una parte accolti in maniera entusiastica dalla comunità scientifica e dall'altra con molte riserve, ma sempre oggetto di un'intensa attività di ricerca.

Le seguenti indicazioni cliniche all'utilizzo dell'angioplastica al laser scaturiscono da una serie di dati sperimentali e dall'esperienza clinica accumulata nel corso di diversi *trials*. I sistemi al laser vengono oggi principalmente impiegati per il trattamento di: 1) lesioni prossimali che interessano l'ostio dei vasi coronarici (Sabri *et al.*, 1994; Eigler *et al.*, 1993); 2) stenosi lunghe su vasi con angolo minore di 45 gradi (Bittl *et al.*, 1992a; 1992b); 3) stenosi su innesti venosi; 4) occlusioni croniche totali una volta che la guida metallica per l'avanzamento del catetere sia stata posizionata efficacemente al di là della stenosi (Schofer *et al.*, 1996); 5) stenosi severe che non possono essere trattate con l'angioplastica convenzionale (praticamente questa indicazione è attualmente decaduta grazie all'introduzione di palloncini a basso profilo); 6) lesioni aterosclerotiche non espandibili con angioplastica convenzionale come placche aterosclerotiche altamente calcifiche (Ahmed *et al.*, 1996). Sebbene ulteriori studi siano necessari per determinare l'esatto ruolo dell'angioplastica al laser per il trattamento della ristenosi, un'indicazione emergente è quella per il trattamento della ristenosi dovuta al posizionamento di *stent* intracoronarici (Mehran *et al.*, 1993).

In linea generale, lesioni contenenti calcio od associate a trombosi coronarica dovrebbero essere trattate con sistemi laser al Ho:YAG rispetto che con sistemi laser ad eccimeri. A riprova di ciò, Estella e collaboratori (1993) hanno dimostrato che il successo clinico del laser ad eccimeri in presenza di lesioni calcifiche o di trombi intracoronarici diminuisce dal 95% al 56% ($p < 0,00001$), e che lo sviluppo di particolari complicanze quali embolie coronariche, infarto del miocardio o occlusione acuta del vaso aumentano in maniera significativa. Nello studio effettuato da Estella, la presenza di una lesione trombotica è stata identificata come la più importante variabile predittiva di insuccesso della procedura di angioplastica al laser. Contrariamente ai risultati di Estella, un altro studio effettuato da de Marchena *et al.* (1996) ha dimostrato l'efficacia dell'utilizzo del laser Ho:YAG nel trattamento dell'ischemia coronarica acuta in una popolazione di pazienti in cui quest'ultima era dovuta ad una trombosi coronarica nel 44% dei casi. In questo studio, la presenza o l'assenza di trombosi non ha inficiato il successo della procedura di rivascularizzazione mediante angioplastica al laser. È comunque importante sottolineare che nonostante l'angioplastica al laser sia considerata una metodica ad «alta tecnologia» rispetto a quella convenzionale, nessuno studio ha finora dimostrato un'efficacia superiore del trattamento al laser rispetto all'angioplastica tradizionale nella prevenzione della ristenosi coronarica.

Attualmente le controindicazioni dell'angioplastica con

laser ad eccimeri o ad Ho:YAG sono rappresentate da: 1) presenza di lesioni su vasi estremamente tortuosi con un angolazione maggiore di 60 gradi; 2) presenza di dissezione coronarica prima del trattamento; 3) incapacità al passaggio ed a un sicuro posizionamento distale della guida al di là della stenosi coronarica; 4) presenza di una lesione non protetta sul tronco comune; 5) diametro del vaso da trattare minore rispetto al diametro del catetere con sistema al laser utilizzato; 6) lesioni aterosclerotiche calcifiche altamente eccentriche; 7) lesioni presenti alla biforcazione di due rami coronarici.

Complicanze

Negli Stati Uniti, la creazione di diversi registri quali ad esempio il *Percutaneous Excimer Laser Angioplasty (ELCA) Registry* (Baumbach *et al.*, 1994; Bittl *et al.*, 1993), il *Laser Coronary Angioplasty (ELCA) Registry* (Litvack *et al.*, 1994; Holmes *et al.*, 1994), il *NACI* (Holmes Jr., dati non pubblicati), e il *Holmium Laser Coronary Registry* (de Marchena *et al.*, 1994), hanno permesso di valutare l'efficacia, il successo e l'incidenza di complicanze dell'angioplastica coronarica al laser. L'incidenza delle più frequenti complicanze osservate con l'uso dei sistemi al laser è riportata in tab. I.

Una dissezione coronarica è la complicanza emersa più frequentemente con l'utilizzo del laser ad eccimeri da questi studi. In uno studio pilota, Geschwind (Geschwind *et al.*, 1992) ha dimostrato come questa complicanza sia la più frequente anche con l'utilizzo del laser Ho:YAG. In un interessante studio effettuato, Quan e Hodgson (1996) hanno dimostrato che il trattamento con laser ad infrarossi provoca un danno minore sulla parete vasale di quello ad eccimeri, quando si utilizzino livelli di energia e frequenze di impulsi raccomandati da diversi autori nella letteratura. I meccanismi implicati nella dissezione coronarica legata all'utilizzo del laser ad eccimeri sono dovuti all'espansione del plasma e alla creazione di bolle di vapore (Van Leeuwen *et al.*, 1992; Isner *et al.*, 1992), propagazione di onde pressorie risultanti in un barotrauma della parete vasale (Haase *et al.*, 1992; Tomaru *et al.*, 1992), e l'utilizzo di cateteri di diametro maggiore di 1,4 mm con energie superiori ai 50 mJ/mm².

La perforazione coronarica, definita angiograficamente dalla visualizzazione del mezzo di contrasto al di fuori del lume vasale, è un'altra potenziale complicanza del laser ad eccimeri e di quello al Ho:YAG, con un'incidenza intorno al 2%. Holmes e collaboratori (1994) in una revisione di 2759 pazienti arruolati nel Registro ELCA, hanno documentato un'incidenza di perforazione del 1,3%. In pazienti con questo tipo di complicanza, il *bypass* coronarico di emergenza, l'infarto miocardico, e la mortalità vengono ad essere significativamente aumentati. In uno studio effettuato da Bittl *et al.* (1993), né il diametro delle fibre che compongono il sistema al laser, né particolari caratteristiche morfologiche della lesione sono stati associati ad un aumentato rischio di perforazione.

Vasi trattati con angioplastica al laser Ho:YAG sembrano essere meno soggetti a spasmo; comunque questo tipo di complicanza è facilmente risolvibile nella maggioranza dei casi con l'utilizzo intracoronarico di nitroglicerina o con brevi gonfiaggi del palloncino da angioplastica convenzionale. L'incidenza di complicanze maggiori non differisce significativamente tra il laser ad eccimeri e quello ad Ho:YAG. Come in tutte le tecniche di rivascularizzazione non chirurgica, esiste una curva di apprendimento e l'incidenza di complicanze è inversamente proporzionale all'esperienza dell'operatore.

TAB. I. INCIDENZA DELLE DIVERSE COMPLICANZE DOPO TRATTAMENTO CON ANGIOPLASTICA AL LASER

	Perforazione coronarica (%)	Vasospasmo (%)	Dissezione (%)	Embolizza- zione (%)	CABG ^(a) (%)	Infarto miocardico transmurale (%)	Infarto miocardico non-Q (%)
ELCA (Litvack <i>et al.</i> , 1994) (3595 lesioni)							
Totale pazienti (%)	1,2	1,2	13	1,1	3,8	2,1	2,3
Pazienti 1-2000	1,6				4,0	2,3	
Pazienti 2000-3000	0,4				3,4	1,7	
PELCA (Baumbach <i>et al.</i> , 1994; Bittl <i>et al.</i> , 1993) (1595 lesioni)	2,1	4,9	14,4	1,4	3,1	1,0	2,3
NACT (Holmes, dati non pub- blicati) (1000 lesioni)	1,6		9,1		4,5	0,7	
Hc:YAG (Holmes <i>et al.</i> , 1994) (365 lesioni)	1,9	6,6	0,8	0,3	2,7	0,5	0,8

^(a) Coronary Artery Bypass Grafting

Conclusioni

L'inizio dell'utilizzo dell'angioplastica coronarica al laser ha coinciso con l'introduzione nella pratica clinica delle tecniche di rivascolarizzazione percutanea. Purtroppo, la dimostrazione che questa metodica non fosse in grado di ridurre l'incidenza di ristenosì, ha influenzato il suo stesso utilizzo, non permettendogli di raggiungere una popolarità nella comunità interventistica come quella raggiunta dall'angioplastica tradizionale con palloncino. Con la successiva introduzione ed il sempre maggiore utilizzo degli *stent* intracoronarici, la proliferazione di neointima con conseguente ristenosì all'interno dello *stent* è divenuta una complicanza frequente. L'angioplastica coronarica al laser ha oggi finalmente trovato una nicchia di applicazione nel trattamento di questo tipo di complicanza. In aggiunta, questa metodica sembrerebbe essere un eccellente mezzo per frantumare la placca aterosclerotica coronarica se utilizzata contemporaneamente con l'angioplastica con palloncino o con gli *stent* intracoronarici. Diversi studi in via di svolgimento dimostreranno se il campo di utilizzo dell'angioplastica coronarica a laser possa essere ulteriormente espanso da queste nuove indicazioni.

Bibliografia

- Ahmed W. H., al-Anazi M. M., Bittl J. A., *Am. J. Cardiol.*, 1996, **78**(9), 1045-1046.
- Baumbach A., Haase K. K., Rose C., Oberhoff M., Hanke H., Karsch K. R., *Lasers Surg. Med.*, 1994a, **14**(1), 3-6.
- Baumbach A., Bittl J. A., Fleck E., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994b, **23**, 1305-1313.
- Bittl J. A., Sanborn T. A., Tchong J. E., Siegel R. M., Ellis S. G., *Am. J. Cardiol.*, 1992a, **70**, 1553-1559.
- Bittl J. A., Sanborn T. A., Excimer laser-facilitated coronary angioplasty. Relative risk analysis of acute and follow-up results in 200 patients. *Circulation*, 1992b, **86**, 71-80.
- Bittl J. A., Ryan T. J. J., Keaney J. F. J., *et al.*, The percutaneous Excimer Laser Coronary Angioplasty Registry. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1993, **21**(5), 1158-1165.
- Boulnois J. L., *Photophysical process in laser-tissue interactions*, in R. Ginsburg, H. Geschwind eds., *Primer on Laser Angioplasty*, 2 ed., 1992, Futura Publishing Co., Mount Kisco, N.Y., pp. 45-99.
- Chov D. S., Stertzer S. H., Myler R. K., Marco J., Fourinal G., *Clin. Cardiol.*, 1984, **7**, 377-381.
- Deckelbaum L. I., Natarajan M. K., Bittl J. A., *et al.*, The Percutaneous Excimer Laser Coronary Angioplasty (PELCA) Investigators. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1995, **26**(5), 1264-1269.
- de Marchena E. J., Mallon S. M., Knopf W. D., *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1994, **73**, 113-121.
- de Marchena E., Larrain G., Poseda J. D., *et al.*, Holmium laser-assisted coronary angioplasty in acute ischemic syndrome. *Clin. Cardiol.*, 1996, **19**(4), 315-319.
- Eigler N. L., Weinstock B., Douglas J. S. J., Goldenberg T., Hartzler G., Holmes D., *et al.*, Excimer laser coronary angioplasty of aorto-ostial stenoses. Results of the excimer laser coronary angioplasty (ELCA) registry in the first 200 patients. *Circulation*, 1993, **88**, 2049-2057.
- Estella P., Ryan T. J. J., Landzberg J. S., Bittl J. A., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1993, **21**(7), 1550-1556.
- Geschwind H., Kvasnicka J., Nakamura F., *et al.*, *Angiology*, 1992, **43**, 259-260.
- Golobic R. A., Bohley T. K., *Principles of operation of an excimer laser angioplasty system*, in R. Ginsburg, H. Geschwind eds., *Primer on Laser Angioplasty*, 2 ed., 1992, Futura Publishing Company, Mount Kisco, N.Y., pp. 171-183.
- Haase K. K., Hanke H., Baumbach A., *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, 1993, **13**, 263-270.
- Holmes D. R. J., Reeder G. S., Ghazzal Z. M. B., *et al.*, Coronary perforation after excimer laser coronary angioplasty: The Excimer Laser Coronary Angioplasty Registry Experience. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 330-335.
- Isner J. M., Pickering J. G., Mosseri M., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1992, **19**, 1619-1621.
- Litvack F., Eigler N., Margolis J., Rothbaum D., Besnahan J. F., Holmes D., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **23**, 323-329.
- McGuff P. E., Buschnell D., Soroff H. S., *Surg. Forum*, 1963, **14**, 143-145.
- Mehran R., Mintz G. S., Popma J. J., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1997, **29**, 77A.
- Quan K. J., Hodgson J. M., *Cathet. Cardiovasc. Diagn.*, 1996, **38**, 50-55.
- Sabri M. N., Cowley M. J., DiSciascio G., *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1994, **73**(2), 122-125.
- Schofer J., Kresser J., Rau T., *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1996, **78**(7), 836-838.
- Tomaru T., Geschwind H. J., Boussignac G., Lange F., Tahk S. J., *Am. Heart J.*, 1992, **123**, 896-904.
- Van Leeuwen T. G., Van Erven L., Meertens J. H., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1992, **19**, 1610-1618.

JEAN GREGOIRE, GIUSEPPE SANGIORGI
E DAVID R. HOLMES

RIVASCOLARIZZAZIONE TRANSMIOCARDICA
MEDIANTE LASER

SOMMARIO

Premessa (col. 3099). - **Presupposti teorici e anatomici** (col. 3099). - **Cenni storici** (col. 3100). - **Note di tecnica** (col. 3100). - **Indicazioni** (col. 3101). - **Risultati** (col. 3101).

Premessa

In alcuni pazienti affetti da cardiopatia ischemica mancano i presupposti anatomici per l'esecuzione del *bypass* aorto-coronarico, per cui tale intervento non può essere indicato. Questo è il motivo che ha spinto numerosi ricercatori verso lo studio di tecniche alternative di rivascolarizzazione miocardica, quali ad es. la *rivascolarizzazione transmocardica mediante laser*.

Presupposti teorici ed anatomici

Il sangue raggiunge il miocardio prevalentemente attraverso il circolo coronarico e, in minima quantità, direttamente dalle camere ventricolari. L'idea di una diretta comunicazione vascolare tra il circolo coronarico e le camere cardiache risale addirittura al '700 con gli studi anatomici di Raynold Vieussens e di Lancisi.

Fu Wearn nel 1933 ad indagare in maniera particolarmente approfondita la natura delle comunicazioni vascolari tra il miocardio e le cavità cardiache. Egli utilizzò per i suoi esperimenti cuori umani provenienti da persone decedute per motivi diversi; la dimostrazione delle comunicazioni arteriose si basava sulla iniezione intracoronarica di celloidina e sulla successiva osservazione dei preparati istologici al microscopio ottico. Attraverso questa metodica Wearn dimostrò che esistono quattro vie attraverso le quali il sangue abbandona il circolo coronarico: mediante anastomosi extracardiache con vasi bronchiali e mediastinici; attraverso capillari e vene (quindi per mezzo del seno coronarico e delle vene di Tebesio); attraverso i vasi arterio-luminali in comunicazione con le camere cardiache ed infine per mezzo di un sistema di vasi definiti arterio-sinusoidali posti in comunicazione con il lume cardiaco dai sinusoidi endocardici.

I vasi *arterio-luminali* ed *arterio-sinusoidali*, descritti per la prima volta da Wearn, rappresentano il substrato anatomico per la vascolarizzazione miocardica a partenza dalle cavità cardiache. Il primo tipo di vasi è costituito da branche arteriolari, di diametro compreso tra 0,2 e 1 mm, decorrenti per un breve tratto in prossimità dell'endocardio e in diretta comunicazione con il lume cardiaco, da cui il nome di vasi arterio-luminali. Il secondo tipo è rappresentato da rami arteriolari che poco dopo l'origine evolvono in strutture sinusoidali anch'esse in comunicazione con le camere cardiache; la somiglianza delle pareti dei vasi arterio-sinusoidali con quelle dei capillari, la medesima distribuzione e lo stretto contatto con le strutture muscolari, sembrano indicare che soprattutto questo secondo tipo di vasi possa contribuire alla vascolarizzazione miocardica traendo sangue direttamente dalle cavità.

Un evidente sviluppo delle connessioni vascolari tra le camere cardiache (soprattutto il ventricolo di destra) e il circolo coronarico è un reperto costante nel cuore di pazienti affetti da atresia della valvola polmonare. In questa condizione la proliferazione di sinusoidi intramiocardici capaci di mettere in comunicazione il ventricolo destro con le arterie coronarie è sostenuta dall'ipertensione ventricolare che si manifesta fin dal periodo fetale. Il passaggio di sangue direttamente dal ventricolo destro ai vasi arteriosi con cui i sinusoidi si comunicano sembra compromettere l'apporto di ossigeno al cuore, e l'ischemia miocardica documentata nel-

l'atresia polmonare appare correlata a questo fenomeno. Tale situazione dimostra comunque la possibilità di una comunicazione tra una camera ventricolare ed il circolo coronarico.

Studi di anatomia comparata hanno dimostrato che la perfusione miocardica nei rettili e nelle rane è affidata prevalentemente al flusso di sangue che raggiunge le pareti attraverso condotti vascolari comunicanti con le cavità cardiache.

Nel cuore umano si ritiene che il flusso ematico transmocardico, la cui esistenza è stata dimostrata da Wearn, sia modesto. Alcuni AA., in particolare Pifarè, dubitano addirittura dell'esistenza di tale flusso. Secondo Pifarè, infatti, il passaggio di sangue dal ventricolo al miocardio è reso fisiologicamente impossibile dal fatto che la pressione intraparietale è superiore alla pressione intraventricolare in entrambe le fasi della rivoluzione cardiaca. Oggi appare comunque assodato che, seppur minimo, un flusso transmocardico esista, anche se tuttora non è stato accertato se il sangue fluisca attraverso i vasi comunicanti durante la sistole o durante la diastole. In ogni caso, alcuni AA. danno grande importanza a questo tipo di flusso, avanzando l'ipotesi che in corso di malattia coronarica esso possa consentire il mantenimento della vitalità miocardica nelle zone ischemiche.

Sulla base di tali osservazioni da molti anni vengono sperimentate tecniche per la creazione di canali artificiali che provvedano direttamente alla vascolarizzazione del miocardio ischemico, veicolando il sangue a partire dalla cavità ventricolare sinistra.

Cenni storici

Nel 1956 Massimo e Boffi proposero il primo tentativo di rivascolarizzazione transmocardica su cani, mediante l'impianto di condotti di plastica a forma di T il cui braccio verticale veniva posto in comunicazione con il lume del ventricolo sinistro, mentre il braccio orizzontale veniva inserito nella parete del miocardio. Secondo gli AA. di tale esperimento, l'elevata pressione con la quale il nuovo flusso ematico raggiunge il miocardio favorirebbe lo sviluppo di una circolazione miocardica collaterale ed anastomotica. Nonostante i risultati in termini di perfusione miocardica fossero promettenti, questa tecnica venne abbandonata perché l'incisione del miocardio per l'inserimento dei condotti provocava un importante danno meccanico a cui faceva seguito una degenerazione fibrosa del tessuto miocardico circostante alla protesi impiantata.

Nel 1965 Sen e successivamente altri ricercatori proposero un nuovo approccio alla rivascolarizzazione transmocardica attraverso la creazione di numerosi canali mediante un'agocannula con diametro di 1,2 mm. Gli studi istopatologici eseguiti sulle aree di miocardio così trattate dimostrarono che il lume dei canali neofornati rimaneva pervio per un tempo superiore ad 8 settimane, consentendo un discreto flusso ematico dal ventricolo alla parete ed aumentando la sopravvivenza degli animali da esperimento dopo legatura dell'arteria interventricolare anteriore. Tuttavia, come dimostrato da Pifarè nel 1969, i canali creati con questa metodica tendono ad occludersi in seguito alla deposizione parietale di fibrina, interrompendo così il flusso sanguigno dalla camera ventricolare al miocardio. Le osservazioni di Pifarè determinarono il temporaneo abbandono delle ricerche volte ad ottenere una rivascolarizzazione transmocardica.

Nel 1981 Mirhoseini, seguito poi da altri AA., aprì la strada alla canalizzazione miocardica utilizzando per primo la tecnologia laser.

Note di tecnica

Per la rivascolarizzazione transmocardica viene utilizzato un laser ad anidride carbonica di classe 4 (i dispositivi laser vengono distinti in 4 classi di appartenenza in base alla lunghezza d'onda, al contenuto di energia e alle caratteristiche degli impulsi del raggio [v. LASER*, col. *4344]). La radiazione luminosa viene emessa con una frequenza pari a

10,6 μm , quindi nel campo dei raggi infrarossi, favorendo un elevato assorbimento da parte del tessuto biologico e permettendo una rapida vaporizzazione tessutale con minimo danno termico alle strutture circostanti.

La potenza che il dispositivo laser può esprimere è pari a 800 W erogabili in un periodo di tempo compreso tra 10 e 100 millisecc. I fori prodotti hanno un diametro di 1 mm. L'apparecchiatura è dotata di un dispositivo che permette la sincronizzazione dell'emissione del fascio luminoso con l'attività elettrica del cuore, rendendo possibile l'emissione del raggio e quindi la creazione del canale durante la fase di massima espansione volumetrica del ventricolo (telediastole), al fine di evitare danni alle strutture adiacenti.

L'energia laser, prodotta in una cabina di considerevoli dimensioni (203 x 176 x 94 cm [altezza x lunghezza x profondità]), viene convogliata attraverso un braccio articolato contenente un sistema di specchi e che termina in un manipolo con lunghezza focale pari a 125 mm. Affinché l'operatore veda ciò che sta facendo mentre opera con il raggio del laser a CO_2 , che è invisibile, viene inviato in parallelo un debole raggio proveniente da un «laser pilota», ad es. ad elio-neon. Il raggio pilota illumina la zona esattamente in corrispondenza a quello di lavoro, in modo che sia possibile operare con precisione millimetrica.

Un altro tipo di laser utilizzato per la rivascolarizzazione transmiocardica è quello a neodimio-YAG: anche questo tipo di dispositivo emette una radiazione nel campo degli infrarossi, con lunghezza d'onda di 2,1 μm , veicolabile per mezzo di un sistema a fibre ottiche flessibili. Quest'ultima caratteristica consente di creare i canali transmiocardici a partire dall'endocardio, con un approccio percutaneo, evitando così la necessità di ottenere l'esposizione del cuore tramite sternotomia o toracotomia e la perforazione del miocardio a tutto spessore.

La rivascolarizzazione transmiocardica mediante laser completa le possibilità di trattamento della cardiomiopatia ischemica, allargando l'indicazione chirurgica a pazienti altrimenti consegnati ad una prognosi non modificabile.

Indicazioni

Le indicazioni attuali alla rivascolarizzazione miocardica mediante laser sono le seguenti:

- a) *angina pectoris* refrattaria a terapia medica massimale;
- b) malattia coronarica multivascolare dimostrata angiograficamente;
- c) presenza di almeno un segmento miocardico ischemico del ventricolo sinistro (suddiviso in anteriore, laterale, inferiore, posteriore) in cui non sia identificabile angiograficamente un ramo coronarico adatto a *bypass* aortocoronarico.

Risultati

Sono stati eseguiti complessivamente nel mondo circa 1200 interventi.

Il rischio operatorio delle casistiche più recenti riporta una mortalità ospedaliera tra il 5 ed il 10%. Il rischio è legato particolarmente alla funzione ventricolare sinistra preoperatoria, considerando che l'applicazione dell'energia laser su una estesa superficie di miocardio può determinare nel periodo perioperatorio una depressione della funzione contrattile dovuta ad edema miocardico.

I risultati a distanza dimostrano scomparsa o miglioramento significativo della sintomatologia anginosi nell'80% circa dei casi trattati.

Come avvenga la perfusione del miocardio attraverso i neocanali creati con il laser non è ancora stato chiarito; in particolare esistono solo evidenze indirette di un flusso ematico transmiocardico e non è noto in quale fase del ciclo

cardiaco questo si verifichi. Inoltre lo sviluppo di tale flusso sembra richiedere un periodo di tempo durante il quale la rete sinusoidale miocardica nativa si anastomizza con i neocanali.

L'esperienza compiuta con la rivascolarizzazione transmiocardica mediante laser porta ad alcune considerazioni:

a) la procedura comporta un rischio operatorio significativo, soprattutto in pazienti con una compromissione preoperatoria della funzione contrattile;

b) i soggetti trattati sono il risultato di una selezione estremamente poco favorevole all'interno della popolazione di pazienti affetti da cardiopatia ischemica, o per estensione periferica della malattia o per compromissione della funzione contrattile;

c) è opportuno un atteggiamento aggressivo del periodo perioperatorio in termini di monitoraggio e di trattamento in tutti i pazienti sottoposti a rivascolarizzazione miocardica mediante laser, ma in modo particolare nei casi con significativa disfunzione contrattile preoperatoria.

In conclusione, quindi, questa tecnica si propone come completamento delle possibilità di trattamento della cardiopatia ischemica, allargando l'indicazione chirurgica a pazienti altrimenti consegnati ad una prognosi non modificabile.

V. anche: LASER*, *laser in cardiocirurgia* (col. *4395); CARDIOCHIRURGIA**, *rivascolarizzazione transmiocardica con laser* (col. **878).

Bibliografia

- Deckelbaum L. I., *Laser Surg. Med.*, 1994, **15**, 315-341.
 Donatelli F., Triggiani M., D'Ancona G., Blasio A., Santoro F., Marchetto G., Benussi S., Grossi A., *G. Ital. Cardiol.*, 1997, **27**, 431-435.
 Frazier O. H., *Circulation*, 1994, **90**, 1-640.

ADALBERTO GROSSI E FRANCESCO DONATELLI

LASERTRISSIA DEI CALCOLI IN UROLOGIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3102). - **Sorgenti laser** (col. 3103): *Laser al neodimio*. - *Laser a coloranti*. - *Laser ad alessandrite*. - *Laser ad olmio*. - *Laser ad eccimeri*. - **Fotosensibilizzazione dei calcoli urinari e risultati terapeutici** (col. 3105).

Introduzione

La litotrixxia laser si basa sulla possibilità di produrre un plasma in corrispondenza del calcolo da frammentare. Impulsi laser con potenze di picco molto elevate vengono trasmessi attraverso fibre ottiche di quarzo molto sottili (200-300 μm) sulla superficie del calcolo. Se l'energia è sufficiente e la radiazione viene assorbita, l'impulso laser vaporizza la materia. La bolla di gas che si forma viene ionizzata ed espande con velocità supersonica; l'espansione del plasma produce un *effetto di cavitazione*, ovvero un'onda d'urto di pressione e temperatura che si espande e si contrae in un tempo inferiore al millisecondo, su dimensioni inferiori al millimetro, generando la litotrixxia. Questa concatenazione di fenomeni non è altro che la conversione dell'energia elettromagnetica dell'impulso laser in energia elettromeccanica (Ihler e Hirth, 1991).

L'efficienza di tale conversione è legata alla densità di potenza dell'impulso laser rilasciato sul calcolo ed all'assorbimento della radiazione laser da parte del calcolo stesso (Cecchetti e Tasca, 1993).

I primi tentativi di litotrixxia laser si devono a Mulvaney e Beck (1968), i quali utilizzarono un laser al *rubino* impulsato con emissione intorno a 694 nm. L'energia rilasciata al calcolo era di 300 J/cm² e ogni impulso aveva la durata di

300 μ sec. Benché questa intensità di energia fosse sufficiente ai fini della litotrixxia, lo sviluppo del calore associato al trattamento era tale da risultare potenzialmente dannoso per i tessuti. Un ulteriore problema riguardava la trasmissione degli impulsi che avveniva attraverso una rudimentale barra di quarzo rigida. Solo successivamente, con lo sviluppo e il perfezionamento delle fibre ottiche in quarzo, la litotrixxia laser ha conosciuto gli albori dell'applicazione clinica.

Un passo fondamentale è derivato dall'impiego delle sorgenti impulsate, in modo da ottenere la conversione dell'energia elettromagnetica degli impulsi laser in energia elettromeccanica, evitando la conversione in energia termica potenzialmente dannosa per i tessuti dell'apparato urologico.

Sorgenti laser (v. LASER*, coll. *4308-4323)

Laser al neodimio

I primi incoraggianti risultati nell'ambito della litotrixxia furono ottenuti con l'impiego di un laser al neodimio (Nd-YAG) impulsato con emissione alla lunghezza d'onda di 1064 nm. Tale sorgente operava in regime «*Q-switched*», con emissione di impulsi di durata di circa 10-20 nsec. Per tale esperienza furono utilizzate fibre del calibro di 300-400 μ m con energie per impulso di poche decine di mJ (Pensel *et al.*, 1981). Con tali parametri si ottiene con facilità la formazione di plasma necessaria alla litotrixxia ma la densità di potenza è molto alta, al punto da avvicinarsi alla soglia di distruzione delle fibre ottiche. Questo inconveniente fu superato abbassando i livelli di energia degli impulsi ed utilizzando un accoppiatore optomeccanico, ovvero una barretta meccanica posizionata all'estremità della fibra, in grado di assorbire la radiazione e trasferire l'onda d'urto prodotta sul calcolo.

Tuttavia, tale dispositivo all'estremità della fibra riduceva la visibilità endoscopica, condizionando le manovre operative funzionali alla litotrixxia. Pertanto il laser al Nd-YAG «*Q-switched*», pur costituendo una sorgente allo stato solido strutturalmente semplice ed affidabile, a causa delle particolarità descritte, non ha i requisiti di praticità necessari all'uso clinico.

Laser a coloranti

È sicuramente la sorgente laser che ha avuto il maggior successo nell'utilizzo clinico come litotritore. I laser a coloranti (*dye lasers*) hanno come sostanza attiva un composto organico colorante (rodamina, cumarina) disciolto in un liquido (glicole). La sostanza attiva viene eccitata attraverso lampade a flash coassiali o parallele e l'emissione avviene su un ampio spettro di lunghezze d'onda.

Watson *et al.* (1987; 1989) hanno identificato i parametri di funzionamento del laser a coloranti ed hanno dimostrato che alla lunghezza d'onda di 504 nm si hanno le condizioni migliori di efficacia e sicurezza operativa. Questa lunghezza d'onda garantisce, infatti, un ideale compromesso tra efficacia della litotrixxia e basso assorbimento della radiazione da parte dei tessuti. Gli altri parametri identificati per un funzionamento ottimale sono una durata degli impulsi di 1-3 μ sec, un'energia per impulso di 80-140 mJ ed un diametro delle fibre ottiche di 200-320 μ m.

Le esperienze cliniche condotte con i lasers a coloranti, con l'utilizzo di tali parametri, hanno comportato una percentuale di successo intorno al 90% (Watson e Wickham, 1989; Cecchetti *et al.*, 1992; Tasca *et al.*, 1993).

Laser ad alexandrite

Il litotritore a laser ad alexandrite è un laser impulsato allo stato solido che funziona in regime «*Q-switched*» come il

Nd-YAG, la durata degli impulsi è di 150-250 nsec. Come il *dye laser* è in grado di emettere su uno spettro di lunghezze d'onda tra 700 e 800 nm, e normalmente ha un'emissione intorno a 755 nm. Tale lunghezza d'onda è scarsamente assorbita dall'acqua e dalla parete delle vie urinarie con indubbio vantaggio in termini di sicurezza operativa. L'utilizzo di fibre ottiche del diametro di 200-320 μ m e di energie pari a 60-80 mJ per impulso hanno comportato, da un lato un'efficace litotrixxia, dall'altro un precoce danneggiamento della fibra dovuto alla elevata densità di potenza. Per ridurre questo inconveniente sono stati messi a punto dei sistemi elettro-ottici in grado di allungare la durata degli impulsi fino ad 1 μ sec (Engelhardt *et al.*, 1989).

Tuttavia per ottenere la frantumazione di calcoli duri o poco assorbenti, si allungano i tempi di trattamento con conseguente danneggiamento delle fibre ottiche (Mattioli *et al.*, 1991; Cecchetti e Tasca, 1993; Cecchetti *et al.*, 1993).

Laser ad olmio

Il laser ad olmio (Ho-YAG) è un laser allo stato solido impulsato, con emissione nell'infrarosso intorno a 2100 nm. A questa lunghezza d'onda l'acqua assorbe intensamente la radiazione, pertanto i calcoli che notoriamente vi sono immersi presentano un elevato assorbimento indotto dell'impulso laser. Il litotritore laser ad olmio utilizza fibre in quarzo con basso coefficiente di ioni OH (dette «*water free*») con diametri di circa 300 μ m. Per ottenere la frantumazione dei calcoli si utilizzano impulsi della durata di 300 μ sec con livelli di energia da 500 mJ ad 1 J. I livelli di densità di potenza sono più bassi rispetto al laser a coloranti o ad alexandrite, cosicché la distruzione del calcolo non si verifica attraverso la formazione di plasma e la conseguente onda d'urto. La litotrixxia ha luogo in questo caso attraverso un meccanismo di ablazione che produce un'erosione del calcolo nella zona circostante il punto di contatto con la fibra ottica.

In sostanza, il litotritore laser ad olmio sfrutta l'assorbimento della radiazione da parte dell'acqua che si comporta come mediatore ottico, inducendo un elevato assorbimento dell'impulso laser sulla superficie bagnata del calcolo. Pertanto ogni tipo di calcolo, indipendentemente dalla sua composizione e quindi dal grado di assorbimento della radiazione, può essere frantumato con il laser ad olmio. Un ulteriore vantaggio derivante dall'uso di questa sorgente è il modesto impatto meccanico che il calcolo subisce durante la litotrixxia; in virtù di ciò il rischio di migrazione prossimale dell'urolita è modesto. D'altro canto le pareti della via escrettrice contigue al calcolo sono, come tutti i tessuti biologici, ricche d'acqua e, di conseguenza, potenzialmente danneggiabili se investite dalla radiazione emessa a 2100 nm. Ne deriva che sono necessarie precisione ed accuratezza nel posizionare la fibra ottica la cui estremità deve essere posta a contatto solo con la superficie del calcolo da trattare.

Le sperimentazioni *in vitro* e cliniche con il laser ad olmio hanno dimostrato risultati complessivamente sovrapponibili a quelli ottenuti con il laser a coloranti presentando però un'invasività ed un rischio operatorio maggiori.

Watson e Smith (1993) hanno dimostrato che gli effetti degli impulsi emessi dall'olmio alla massima energia erogabile di 1 J, sono comparabili con quelli emessi dal laser a coloranti con 65 mJ.

Laser ad eccimeri

Tra gli altri tipi di laser impulsati utilizzati per la frantumazione dei calcoli vi sono i laser ad eccimeri. Benaim *et al.* (1992) hanno utilizzato una sorgente allo XeCl con emissione a 308 nm; gli impulsi erogati veicolati in fibre ottiche

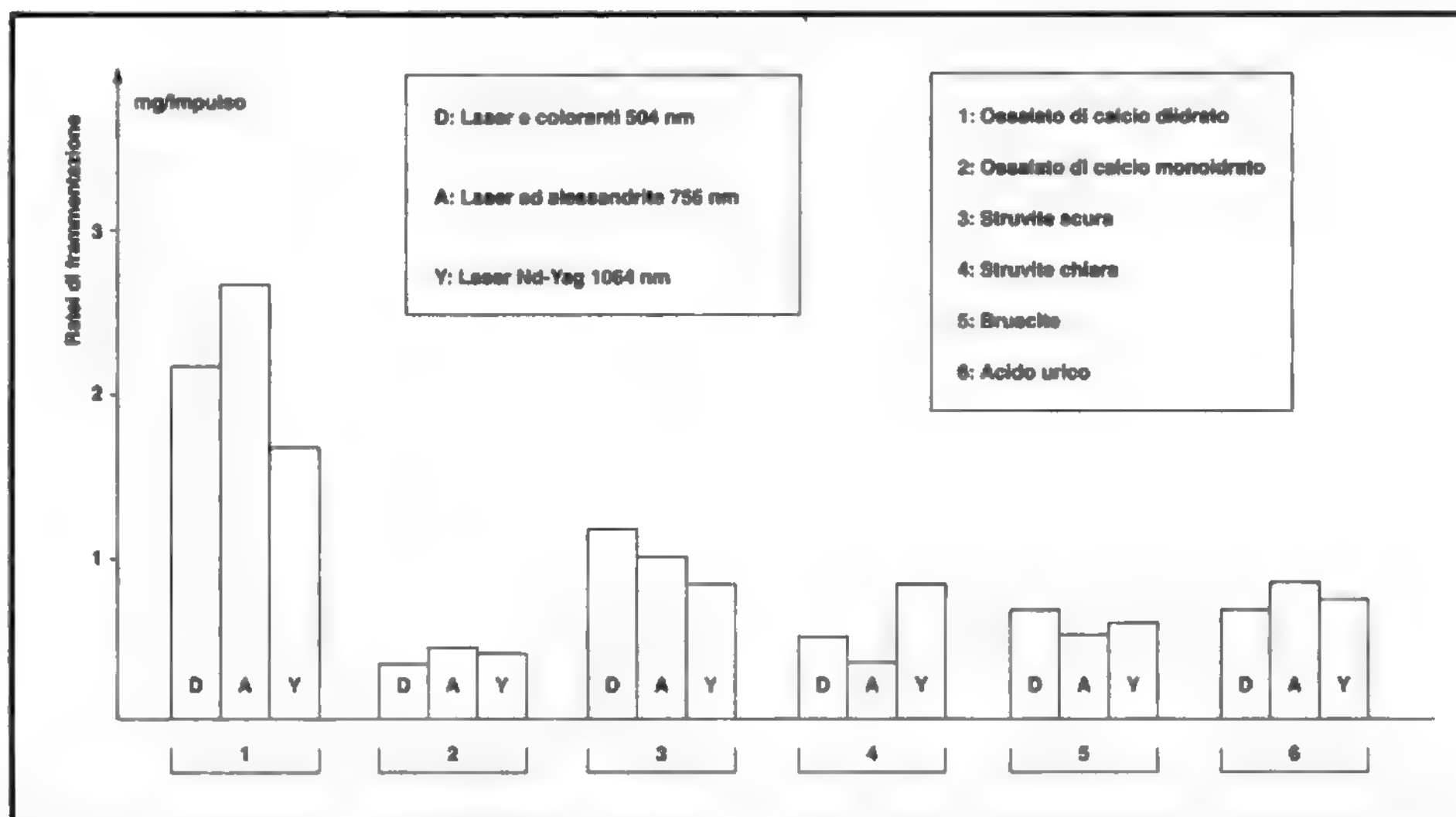


Fig. 10. Ratei di frantumazione di calcoli urinari ottenuti con litotrittori laser.

di 400 μ m di diametro, avevano una durata di 100-150 nsec con un'energia per impulso di 50-100 mJ.

Il vantaggio di utilizzare il laser ad eccimeri come litotritore risiede nel fatto che alla lunghezza d'onda di 308 nm l'assorbimento della radiazione è molto alto per qualunque tipo di calcolo, ma anche per le pareti delle vie urinarie. Pertanto con tale sorgente si possono trattare con successo tutti i tipi di calcoli, tenendo conto però che esistono gli stessi rischi operatori come per il laser ad olmio. In più, il laser ad eccimeri presenta una complessità strutturale con costi di acquisto e di gestione molto più elevati rispetto agli altri litotrittori laser.

Fotosensibilizzazione dei calcoli urinari e risultati terapeutici

Uno dei parametri fondamentali relativi alla litotrissia laser non adeguatamente analizzati, era l'entità dell'assorbimento della radiazione da parte del calcolo. Questo parametro condiziona la sequenza dei fenomeni che sono responsabili della litotrissia. Dagli studi *in vitro* da noi condotti alla fine degli anni '80, su più di 300 calcoli urinari di diversa composizione sottoposti a trattamento con laser al Nd-YAG, a coloranti e ad alessandrite, era emerso come i calcoli più difficilmente frammentabili fossero quelli di ossalato di calcio monoidrato (*wewellite*) e quelli di *brushite*. La distribuzione degli istogrammi relativi ai ratei di frammentazione dei calcoli, ordinati secondo valori crescenti di lunghezza d'onda, ci aveva suggerito inoltre che la quantità di materiale frammentato è proporzionale alla quantità di radiazione assorbita da parte del calcolo (fig. 10).

Ne deriva che ogni sostanza in grado di aumentare l'assorbimento di energia laser da parte del calcolo è destinata ad aumentare l'entità della frantumazione prodotta. Dall'analisi allo spettrofotometro delle sostanze da noi selezionate come utilizzabili quali fotosensibilizzatori della laser-

trissia dei calcoli *in vivo* (figg. 11 e 12), era emerso come la rifamicina (*Rifocin*[®]) ed il verde di indocianina (*Cardio-Green*) assorbissero intensamente la radiazione emessa rispettivamente alle lunghezze d'onda di 504 nm (*dye laser*) e 755 nm (*alessandrite*), e fossero pertanto potenziali mediatori della litotrissia con l'uso delle relative sorgenti.

I test *in vitro* condotti su calcoli di cistina, notoriamente refrattari alla litotrissia, hanno confortato la nostra ipotesi

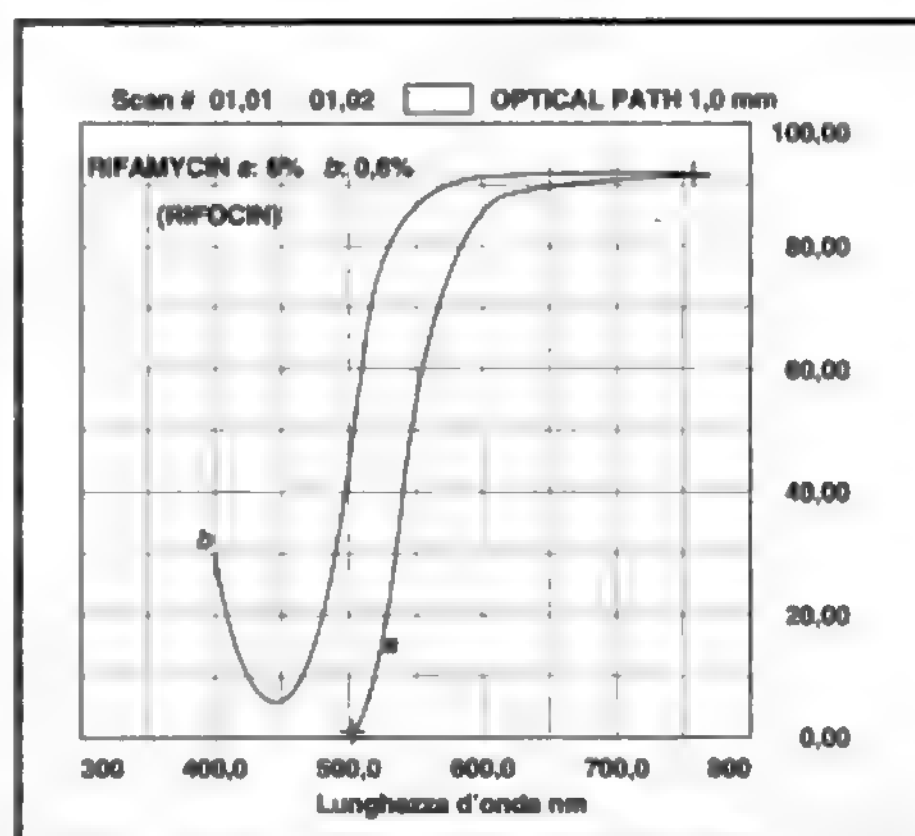


Fig. 11. Spettro di assorbimento della rifamicina, all'analisi spettrofotometrica.

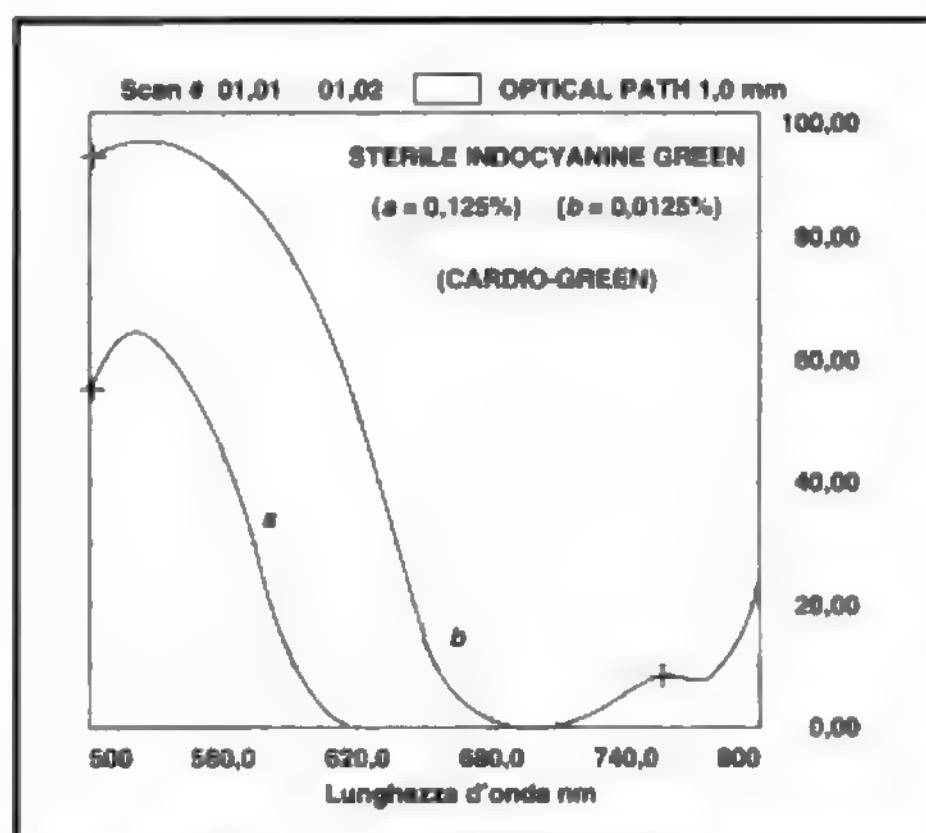


Fig. 12. Spettro di assorbimento del cardio-Green, all'analisi spettrofotometrica.

(Cecchetti *et al.*, 1992). Infatti, il trattamento con laser a coloranti di alcuni calcoli di cistina, immersi in una soluzione di rifamicina, ha comportato la loro frantumazione grazie all'intenso assorbimento della radiazione sulla superficie del calcolo, indotto da tale sostanza. Inoltre, i fenomeni più evidenti nel corso della sperimentazione sono stati l'abbassamento della soglia di formazione del plasma, che aveva luogo a livelli di energia intorno ai 40 mJ, e la notevole riduzione dei tempi di trattamento. Risultati analoghi sono stati ottenuti trattando con laser ad alessandrite alcuni calcoli di cistina immersi in una soluzione di verde di indocianina (Cecchetti *et al.*, 1993).

La preliminare applicazione clinica della metodica ha consentito la frantumazione di quattro calcoli ureterali di cistina utilizzando un laser a coloranti (due casi) e ad alessandrite (due casi) in corso di ureterorenoscopia (Tasca *et al.*, 1993; Cecchetti *et al.*, 1993). Il successo terapeutico è stato conseguito una volta sostituito il tradizionale liquido di irrigazione utilizzato per l'endoscopia con una soluzione al 2% di rifamicina (dye laser) e allo 0,15% di verde di indocianina (laser ad alessandrite).

La fotosensibilizzazione secondo le modalità indicate è stata successivamente applicata nel corso del trattamento dei calcoli ureterali di diversa composizione che risultavano resistenti alla litotrixxia laser in quanto duri o scarsamente assorbenti la radiazione, con considerevole riduzione dei tempi di trattamento, e con percentuali di successo intorno al 100%. Tale metodica si è rivelata un'efficace procedura utilizzata nei centri attrezzati con i litotrittori laser a coloranti ed ad alessandrite (Watson, 1996).

L'esperienza condotta suggerisce che l'identificazione di mediatori in grado di potenziare l'efficacia delle sorgenti laser disponibili è stata altrettanto importante e, verosimilmente, più economica rispetto alla ricerca di nuove più efficaci sorgenti laser.

Rispetto ad altri sistemi di litotrixxia intracorporea, il litotrittore laser usa fibre ottiche molto sottili e flessibili, permettendo di utilizzare ureterorenoscopi di calibro minimo, garantendo una frantumazione precisa e controllata. Inoltre, l'uso del laser riduce la probabilità minore che il calcolo si sposti durante il trattamento; utilizzando i

litotrittori a coloranti o ad alessandrite non sono rilevabili apprezzabili rischi di danno sulle pareti circostanti ai calcoli durante il trattamento.

Bibliografia

- Benaïm G., Mattioli S., Cremona M. *et al.*, *In Vitro tests of Excimer Laser Lithotripsy in Urinary Stones*, in Katzir A., Anderson R. R. eds., *Laser Surgery Advanced Characterization, Therapeutic and Systems IV*, Proc. SPIE, 1992, vol. 1643, pp. 73-77.
- Cecchetti W., Tasca A., Guazzieri S. *et al.*, *J. Endourology*, 1992, 5, 229.
- Cecchetti W., Tasca A., «Mechanism of Laser Fragmentation of stones», *International workshop on Laser Deposition and Advances Materials; Invited Lectures*, Allegrini A., Giardini G., Morone A. eds., 1993, ETS, Pisa, pp. 221-225.
- Cecchetti W., Tasca A., Guazzieri S., Zattoni F., Pagano F., «Photosensitization method to improve lithotripsy with the Dye and Alexandrite Lasers», *Lasers in Urology*, Proc. SPIE, 1993, vol. 1879, pp. 160-164.
- Engelhardt R., Brinkmann R., Meyer W., *Laser und Optoelektronik*, 1989, 21, 56-61.
- Ihler B. C., Hirth A., «Experimental Investigation of Acoustic and Cavitation Process Generated by the Laser Lithotripsy», *J. de Physique IV*, Colloque C7, Supplément au *J. de Physique III*, Vol. 1, pp. 203-206, decembre 1991.
- Mattioli S., Cremona M., Benaïm G., *Eur. Urology*, 1991, 19, 233-235.
- Mulvaney W. P., Beck C. W., *J. Urology*, 1968, 99, 112.
- Pensel J., Frank F., Rothenberger K., *Destruction of Urinary Calculi by Neodymium YAG Laser Irradiation*, in Kaplan ed., *Laser Surgery IV, Proceedings of Fourth Int. Symposium on Laser Surgery*, 1981, Jerusalem Academic Press, 10:4.
- Tasca A., Cecchetti W., Zattoni F., Pagano F., *J. Urology*, 1993, 149, 709-712.
- Watson G. M., *Laser Lithotripsy*, in Lingeman E., Preminger G. M. eds., *New Developments in the Management of Urolithiasis*, 1996, Igaku-Shoin, pp. 118-125.
- Watson G. M., Murray S., Dretler S. P., Parrish J. A., *J. Urology*, 1987, 138, 195.
- Watson G. M., Smith N., *A Comparison of the Pulsed Dye and Holmium Lasers for Stone Fragmentation: in Vitro and Clinical Experience*, in Katzir A., Anderson R. R. eds., *Laser Surgery Advanced Characterization, Therapeutic and Systems, IV*, Proc. SPIE, 1993, vol. 1879, pp. 139-142.
- Watson G. M., Wickham J. E. A., *W. J. Urology*, 1989, 7, pp. 147-150.

ANDREA TASCA E WALTER CECCHETTI

LASER IN ODONTOIATRIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3108). - Campi di impiego (col. 3109).

Introduzione

L'introduzione del laser in odontostomatologia (Stern e Sognnaes, 1964) ha offerto la possibilità di affiancare al trapano uno strumento silenzioso e privo di vibrazione, di utilizzare le tecniche laser negli interventi sui tessuti molli, di sfruttarne infine le possibili proprietà analgesiche (Pick e Pecaro, 1987; White, Goodis, Rose, 1991; Smith, Thompson, Lee, 1993). La complessità dell'organo della masticazione e la propagazione lineare della luce coerente monocromatica non rendono sempre agevole l'accesso ai diversi obiettivi dell'intervento odontostomatologico: a queste difficoltà si è ovviato con la costruzione di manipoli di tipo dentale muniti di specchi con idonee angolazioni (Gaspar, Kasler, Orosz, 1991); con l'impiego di fibre ottiche; con l'accoppiamento laser-microscopio operatorio-micromanipolatore. Quest'ultima soluzione permette di raggiungere l'obiettivo dell'intervento con precisione micrometrica (fig. 13); di illuminare adeguatamente il campo operatorio; di allineare in posizione coassiale il fuoco del laser e il campo visivo; di eliminare l'ingombro del manipolo a differenza del quale il fascio di luce laser ha una sezione di poche centinaia di micron.



Fig. 13. Oltre al campo perfettamente illuminato, il microscopio operatorio offre l'opportunità anche in odontoiatria di pilotare un laser a CO_2 verso il bersaglio con precisione micrometrica.



Fig. 14. Dopo l'apertura di due impianti bifasici si posizionano i pilastri per la protesi.

Campi di impiego

Interventi di prevenzione. – Qualora si vogliano sigillare i solchi occlusali di denti soggetti a carie di I e II classe, la fusione dei prismi dello smalto di idrossiapatite carbonato, diminuisce drasticamente la solubilizzazione acida di queste strutture (Nelson *et al.*, 1987; Bahar e Tagomori, 1994).

Interventi conservativi. – Nei casi più frequenti di restauro della classe IV e V il tessuto interdentale sollecitato dalla patologia cariogena può invadere le strutture dure, impedendo il giusto posizionamento del manufatto; in questi casi il reperimento del clivaggio è imperativo per un buon adattamento (Frame, 1985). È inoltre possibile sigillare i tubuli dentinali contro la sensibilizzazione. Nel restauro conservativo si può d'altra parte realizzare la mordenzatura (*etching*) sia dello smalto che della dentina mediante composti dell'ultima generazione (Roberts-Harry, 1992; Moritz *et al.*, 1996). L'indurimento (*curing*) può ottenersi con luce laser che determina una più rapida fotopolimerizzazione e un più forte legame dentinale (Powell *et al.*, 1989; Blankenau, 1991).

Endodonzia. – Nella chirurgia endodontica (Pecora *et al.*, 1993) l'uso del laser è indicato nei lembi d'accesso che guariscono con una minima cicatrizzazione (Luomanen e Virtanen, 1991), nella dissoluzione del tessuto granulomatoso e nella sterilizzazione della cavità (Bahcall *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 1992; Miserendino, 1988), previa rimozione dell'apice dentario con i mezzi tradizionali; nella sterilizzazione dei canali radicolari infetti con laser Nd:YAG su fibra ottica (Dederich *et al.*, 1984); nella sterilizzazione di polpa esposta in carie penetrante in fase essudativa (Melcer *et al.*, 1987). È importante sottolineare come la luce laser, in qualunque campo di applicazione abbia, una spiccata attività battericida (Melcer *et al.*, 1986).

Implantologia. – Nell'applicazione di impianti bifasici si procede, dopo 5 o 6 mesi di osseointegrazione, alla riapertura dei tessuti molli, per avere accesso alla riabilitazione protesica con l'applicazione del pilastro moncone. Il rientro può avvenire (Wigdor *et al.*, 1995) senza anestesia creando rapidamente una soluzione di continuo che evidenzia la sede dell'impianto (fig. 14).

Chirurgia dell'angolo della mandibola. – L'approccio tradizionale alla chirurgia dell'ottavo inferiore incluso, per la morfologia anatomica della sede, per l'oggettiva difficoltà di reperire lo spazio per l'esatto posizionamento della stru-

mentazione e soprattutto per il sanguinamento notevole che spesso richiede l'utilizzo di abbondanti dosi di vasocostrittore, consiglia l'alternativa chirurgica offerta dalla metodologia laser (fig. 15).

Parodontologia. – Nelle gengivectomie di varia natura (Luomanen, 1990), il laser permette la rimozione del tessuto esuberante. Il postoperatorio è più confortevole con minima dolorabilità ed edema. Nella chirurgia (vedi lembi) si ha un'ottima risposta alla rimozione del tessuto di granulazione che, dopo l'esposizione al laser defocalizzato, perde la tenace adesività che lo contraddistingue.

Rigenerazione guidata dei tessuti. – Secondo recenti studi (Rossman, 1993; Israel, 1993), il laser diminuisce la velocità di crescita del tessuto epiteliale a favore di quello connettivale. Con la chirurgia tradizionale si forma infatti un epitelio giunzionale lungo privo di riattacco connettivale o con riattacco limitato. La metodica laser sembra offrire la possibilità di ottenere un nuovo attacco connettivale. Infatti il laser è l'unica strumentazione che permetta di rimuovere selettivamente, con un perfetto piano di clivaggio, l'epitelio dal

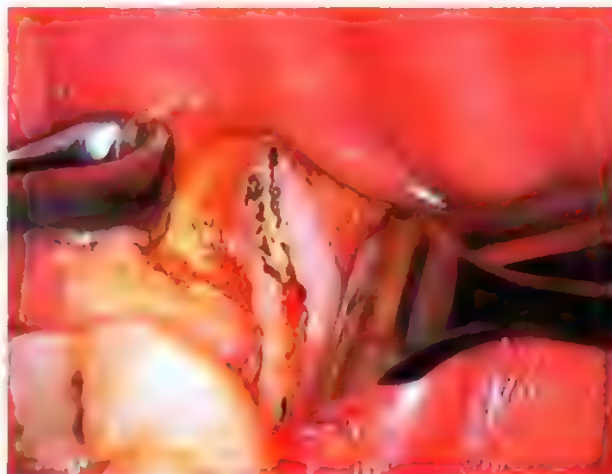


Fig. 15. Nella chirurgia dell'8° inferiore il laser a CO_2 ha aperto una netta incisione lungo la linea obliqua.



Fig. 16. Rimozione di un grosso polipo gengivale situato nell'arcata superiore (settefrontale).

sottostante connettivo, promuovendo la fase di guarigione a favore del connettivo stesso (Crespi *et al.*, 1994a, 1994b).

Chirurgia stomatologica. - L'indicazione di punta della laser terapia chirurgica, rimane la rimozione di tessuti iperplastici, polipi (fig. 16), cisti, epulidi (Silla *et al.*, 1989); anche le frenectomie del labbro superiore, inferiore e della lingua, sono atti chirurgici, realizzabili con metodo laser in forma rapida, con minimo sanguinamento e senza alcuna sutura.

Ai fini della rimozione dei tessuti duri è stato dimostrato che il laser pulsato Erbio:Yag ($\lambda = 2,94 \mu\text{m}$) agisce sullo smalto provocando un assorbimento di energia tale da rimuoverlo (Hibst e Keller, 1989). Infatti la radiazione infrarossa dell'Er:Yag è assorbita grandemente dall'acqua e dalla idrossiapatite carbonato, costituenti principali del dente; ne consegue un'azione esplosiva che allontana la materia dalla zona di impatto. Comunque la sostituzione del trapano con il laser è ancora una meta da raggiungere.

Nella malattia paradontale esistono batteri, contenenti pigmenti porfirinici. In una prospettiva futura, il laser potrebbe essere usato per distruggere selettivamente questo tipo di batteri altamente patogeni; esistono d'altra parte sistemi di rilevazione della placca, che potrebbero rendere bersaglio selettivo di questa metodica anche i batteri patogeni privi di pigmenti.

Bibliografia

- Bahcall J. H. *et al.*, *J. Endodontics*, 1992, **8** (2), 47-51.
 Bahar A., Tagomori S., *Caries Res.*, 1994, **28** (6), 460-467.
 Blankenau R. J. *et al.*, *Laser Surg. Med.*, 1991, **11**, 471-474.
 Crespi R. *et al.*, *J. Periodontology*, 1994a, **64** (11), Abst. 1103.
 Crespi R. *et al.*, *J. Periodontology*, 1994b, **65** (10).
 Dederich D. N., Zakariasen K. L., Tulip J., *J. Endodontics*, 1984, **10** (9), 428-431.
 Frame J. W., *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 1985, **43**, 850-855.
 Friedman S., Rotstein I., Itai Bab, *Laser Surg. Med.*, 1992, **12**, 104-111.
 Gaspar L., Kasler M., Orosz M., *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 1991, **6**, 219-223.
 Hibst R., Keller U., *Laser Surg. Med.*, 1989, **9**, 338-344; 345-351.
 Israel M., *Proceedings Second Annual Advances Application Seminar, Luxar Corp.*, 1993.
 Luomanen M., *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 1990, **19**, 205-207.
 Luomanen M., Virtanen I., *J. Oral. Pathol. Med.*, 1991, **20**, 133-138.
 Melcer J. *et al.*, *Innov. Tech. Biol. Med.*, 1986, **7**, 347-352.
 Melcer J., Chaumette M. T., Melcer F., *Laser Surg. Med.*, 1987, **7**, 353-357.
 Mervin J. L., *J. Oral Surg.*, 1988, **66**, 617-619.
 Mervin J. L., *Laser Surg. Med.*, 1996, **14** (3), 133-136.
 P. *et al.*, *Caries Res.*, 1987, **21**, 411-426.
 P. *et al.*, *Caries Res.*, 1993, **27**, 411-426.
 Pick R. M., Pecaro B. C., *Laser Surg. Med.*, 1987, **7**, 207-213.

- Powell G. L. *et al.*, *Esthetic Dentistry*, 1989, **9**, 623-627.
 Roberts-Harry D. P., *Laser Surg. Med.*, 1992, **12**, 467-470.
 Rossmann J. A., *Proceedings Second Annual Advances Application Seminar, Luxar Corp.*, 1993.
 Silla M., De Stefano Dorigo E., *Riv. Odontostomat. & Implantopro.*, 1989, suppl. 4.
 Smith T. A., Thompson J. A., Lee W. E., *J. Am. Dent. Assoc.*, 1993, **124**, 90-95.
 Stern R. H., Sognnaes R. F., *J. Dent. Res.*, 1964, **43** (suppl.), 873 (Abs. 307).
 White J. M., Goodis H. E., Rose C. L., *Laser Surg. Med.*, 1991, **11**, 455-461.
 Wigdor H. A. *et al.*, *Laser Surg. Med.*, 1995, **16**, 107-108.

ALESSANDRO CORTOPASSI

β -LATTAMICI ANTIBIOTICI: v. CEFALOSPORINE (III, 1300-1304); CEFALOSPORINE* (*1423-1435); CEFALOSPORINE** (**998-1007); CEFAMICINE* (*1435-1436); CLAVULANICO ACIDO* (*1697); β -LATTAMICI ANTIBIOTICI (VIII, 1132-1145); MEROPENEM** (**3648-3649); PENICILLINE (IX, 1456-1488); IMIPENEM-CILASTATIN* (*3600-3607); SULBACTAM* (*6685-6686); TAZOBACTAM**.

LAURENCE-MOON-BARDET-BIEDL, SINDROME DI: v. BARDET-BIEDL, SINDROME DI** (coll. **711-712).

LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE [v. Agg. I, coll. *4465-4481]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3112). - **LBA nei pazienti immunodepressi** (col. 3113): *Considerazioni preliminari sulla indicazione del LBA.* - **LBA in patologia infettiva.** - **LBA in patologia non infettiva.** - **LBA e diagnosi di polmonite** (col. 3119). - **LBA in pediatria** (col. 3120).

Introduzione

La tecnica del lavaggio broncoalveolare [LBA] continua ad essere un mezzo incruento di ricerca *in vivo* in quasi tutte le patologie polmonari. Per mezzo del LBA si sono notevolmente ampliati gli studi sui complicati meccanismi di «danno» e di conseguente risposta dei vari componenti la parete bronchiolo-alveolare.

Sono recenti le ricerche sulle molecole di adesione delle cellule del «polmone profondo», sulle sostanze tossiche prodotte da eosinofili e neutrofili, sul network citochinico, sul surfattante alveolare (Drowning *et al.*, 1995).

Numerosi studi riguardano i macrofagi alveolari (MA), i loro markers di superficie come il CD14 (Wright *et al.*,

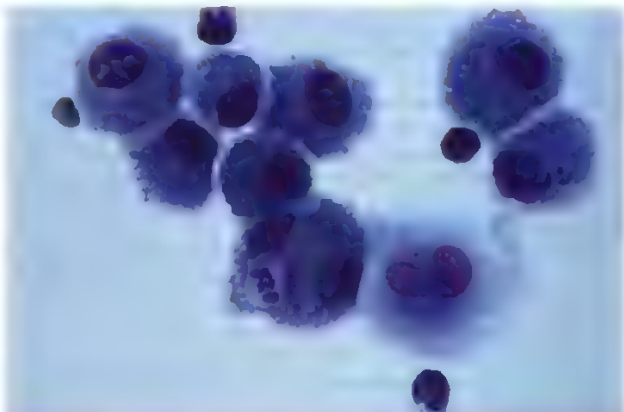


Fig. 1. Citocentrifugato di LBA. Macrofago che ha fagocitato un polimorfonucleato neutrofilo in apoptosi. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 750 x).

1990), il loro ruolo nelle infezioni virali, batteriche, fungine e nella regolazione del «traffico» cellulare nel polmone con la produzione di citochine (MCP-1, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, LTB4, G-CSF, etc.).

Si tenta di correlare le variazioni delle concentrazioni di queste sostanze (IL-2, IL-6, IL-8, etc.) all'evoluzione delle pneumopatie. Tra le più studiate attualmente è l'IL-8, il più potente chemiotattico per i neutrofili, che, prodotta dai MA in risposta a vari stimoli, risulta aumentata nel liquido di LBA di talune alveoliti fibrosanti, come la fibrosi polmonare idiopatica, la sclerosi sistemica, l'ARDS. Nell'ARDS l'incremento di IL-8 nel liquido di LBA assume un significato prognostico infausto per la liberazione, da parte dei neutrofili richiamati negli alveoli, di enzimi proteolitici e di radicali liberi (Donnelly *et al.*, 1993).

Con il LBA si è studiata *in vivo* l'attività di «scavenger» dei MA non solo nei confronti dei detriti cellulari, ma anche di cellule intere come i neutrofili apoptotici (Savill *et al.*, 1992): con la fagocitosi di tali granulociti (fig. 1) si risolverebbero le polmoniti batteriche evitando così con la loro lisi la liberazione nell'ambiente polmonare di sostanze tossiche (enzimi, radicali liberi e DNA) ed il formarsi di esiti e sequele.

Modificazioni dell'apoptosi dei neutrofili e/o delle funzioni dei MA potrebbero spiegare la diversa evoluzione di alveoliti neutrofiliche come l'ARDS e le polmoniti batteriche.

Il LBA è servito ad identificare le due sottopopolazioni di linfociti T helper, Th1 e Th2, e a definirne i ruoli nell'asma allergico (Robinson *et al.*, 1992).

Tuttavia negli asmatici l'esecuzione del LBA è ancora confinato ai campi della ricerca, in quanto l'indagine può determinare una broncocostrizione acuta dovuta allo scatenarsi di riflessi nervosi, all'insorgenza di edema della parete bronchiale e alla diluizione del surfattante alveolare. È pertanto controindicato negli asmatici gravi e nei pazienti con notevole iperreattività bronchiale. Durante l'indagine si verificano una riduzione della Pa_{O_2} , ed un'alterazione del rapporto ventilazione/perfusione con peggioramento della Pa_{CO_2} . Occorre perciò monitorare l'ECG e la saturimetria arteriosa e controllare il paziente finché i parametri respiratori si sono normalizzati (Blucker *et al.*, 1991).

Nella pratica clinica, oltre che nelle varie interstiziopatie polmonari, per la relativa scarsità di effetti collaterali, la tecnica del LBA viene ampiamente utilizzata nei pazienti immunodepressi nella diagnosi differenziale degli infiltrati polmonari infettivi e non, nella diagnosi etiologica delle polmoniti gravi ospedaliere e di comunità. Recentemente viene eseguito anche in campo pediatrico.

LBA nei pazienti immunodepressi

Complicanze polmonari sopraggiungono nel 40%-60% dei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo e nell'80% degli HIV-positivi. Il LBA, anche se esplora solo l'1-3% di tutto il polmone profondo, in tali soggetti si impone spesso come indagine di prima scelta per un corretto e mirato indirizzo terapeutico.

Considerazioni preliminari sulla indicazione del LBA

Prima di porre l'indicazione occorre considerare i seguenti aspetti.

1. *Le possibili complicazioni.* – a) Complicanze minori: febbre, desaturazione arteriosa transitoria, diminuzione della capacità vitale; raramente emoftoe. b) Complicanze maggiori per le quali si deve ricorrere alla ventilazione meccanica (5% dei casi) (Martin *et al.*, 1987).

Non esistono controindicazioni assolute (eccezzuata l'ipossiemia severa sotto ventilazione meccanica con FiO_2 elevata) ma solo relative, rappresentate da:

a) FEV_1 inferiore ad un l.

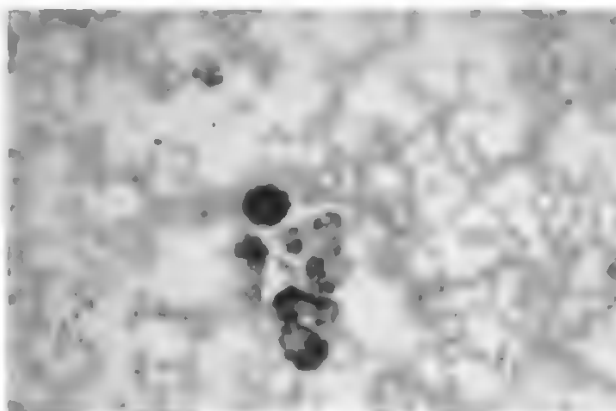


Fig. 2. Citocentrifugato di LBA di una bambina con emosiderosi polmonare idiopatica. Si osserva un tappeto di emazie; la Pearls-positività dei macrofagi carichi di emosiderina conferma che i globuli rossi non sono dovuti a emorragia estemporanea ma alla cronica presenza di una grave alterazione della barriera ematoalveolare. (Colorazione con il metodo di Pearls; 200 ×).

- b) Pa_{O_2} inferiore a 60 mmHg durante il respiro in O_2 .
 - c) Pa_{CO_2} superiore a 50 mmHg.
 - d) Infarto miocardico recente (meno di sei mesi); angina instabile; insufficienza cardiaca.
 - e) Crisi di broncospasmo.
- I rischi dipendono anche dalla perizia dell'endoscopista.

2. Il segmento od il territorio subsegmentario da esplorare.

– Viene individuato in base al reperto radiologico; alcuni (Meduri *et al.*, 1991) per avere maggiori risultati in caso di patologia polmonare diffusa consigliano di eseguire un LBA bilaterale, se le condizioni del paziente lo consentono.

3. Le analisi da eseguire.

- a) Analisi di routine.
- b) Analisi microbiologiche le più complete possibili (micoparasitologiche, virologiche, batteriologiche), applicando tecniche moderne come la PCR.
- c) Studio dei fenotipi delle sottopopolazioni linfocitarie utilizzati comunemente nella pratica clinica: CD19 (linfociti B), CD3 (linfociti T), CD4, CD8.
- d) Analisi «speciali»: colorazione di Pearls per le emorragie intralveolari (fig. 2), colorazione di Papanicolaou per il rilievo di cellule neoplastiche, spesso visibili anche col May-Grünwald-

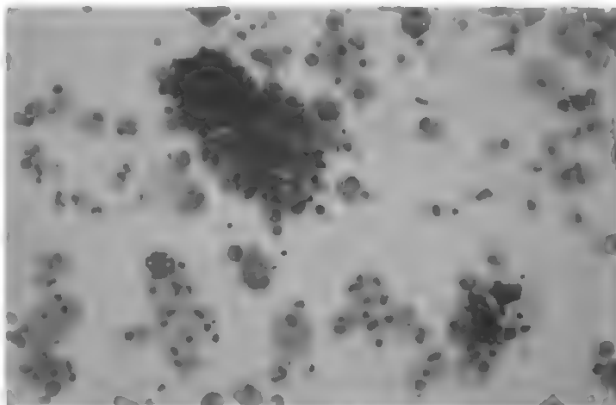


Fig. 3. Citocentrifugato di LBA in un caso di linfangite carcinoma-tosa da adenocarcinoma mammario: un ammasso di cellule neoplastiche circondate da macrofagi alveolari, rari linfociti e rare emazie. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 200 ×).

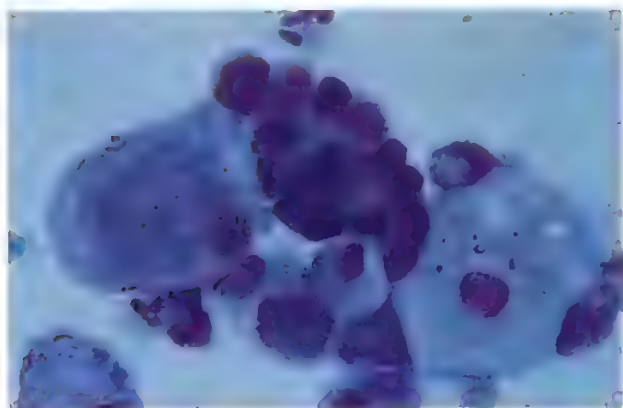


Fig. 4. Citocentrifugato di LBA in un caso di linfangite carcinomatosa in paziente mastectomizzato per adenocarcinoma: alcune cellule neoplastiche sono circondate da macrofagi alveolari. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 1000 $\times$).

Giemsa (figg. 3-4) o con il PAS (fig. 5); immunoelettroforesi per la ricerca di picchi monoclonali ed utilizzo della biologia molecolare per lo studio del riarrangiamento dei geni nei linfomi (Betsuyaku et al., 1994).

e) Studio di componenti biochimiche (IL-2, IL-8, IL-6, IFN- γ , TNF, etc.).

Tutte le indagini sopradette vengono condotte anche nei pazienti immunocompetenti, qualora se ne presenti la necessità.

4. *L'apporto diagnostico che può fornire il LBA in ciascun caso clinico.*

5. *Il rendimento diagnostico.* - I risultati variano, a seconda delle casistiche, dal 30% all'87% a causa dell'eterogeneità dei pazienti e dei quadri clinici considerati, dei criteri diagnostici utilizzati; indurrebbero alla modificazione del trattamento in un quarto degli immunodepressi sottoposti a LBA.

LBA in patologia infettiva

1. *Pneumocistosi.* - Sensibilità del 100% se il paziente HIV non è in trattamento (fig. 6); del 62-65% se è in chemioprolifassi (Yung et al., 1993). Viene ripristinata una sensibilità superiore al 95% se si fa un lavaggio mirato e si utilizzano anticorpi monoclonali per l'identificazione della *Pneumocystis carinii*. Nei pazienti non-HIV la sensibilità è dell'82-90% (Masur, 1991).

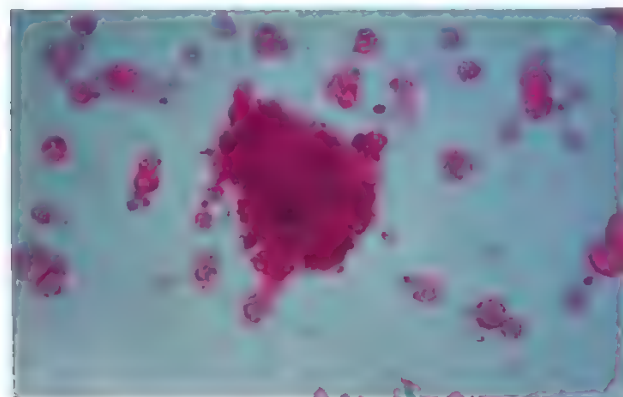


Fig. 5. Citocentrifugato di LBA: stesso caso della fig. 4, colorazione PAS per i polisaccandi. L'ammasso di cellule neoplastiche risulta intensamente PAS positivo. (1000 $\times$).

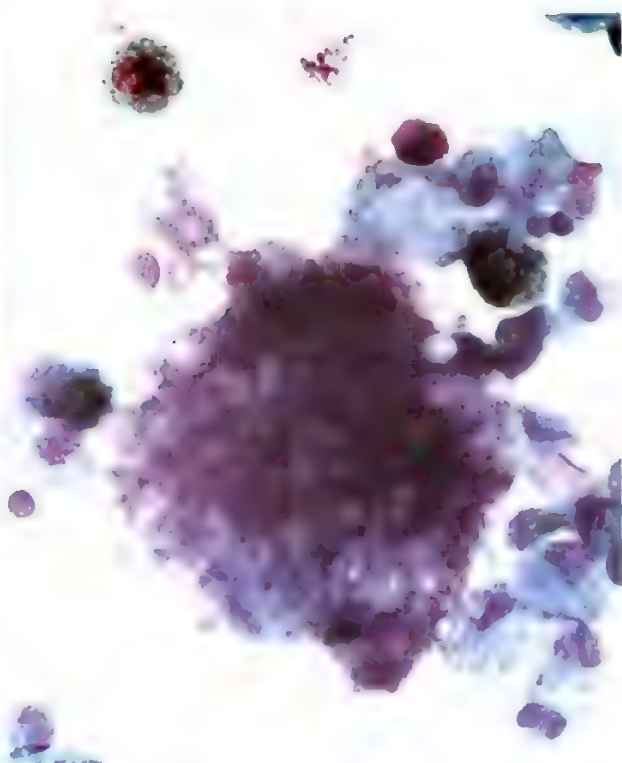


Fig. 6. Citocentrifugato di LBA di soggetto con AIDS e pneumopatia da *Pneumocystis carinii*: è bene evidente un cast di *Pneumocystis* anche se la colorazione non è specifica. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 1000 $\times$).

2. *Toxoplasmosi.* - La diagnosi, difficile, si fa sul riscontro del parassita esaminando un gran numero di strisci colorati col May-Grünwald-Giemsa.

3. *Strongyloides stercoralis.* - Si può osservare mediante esame microscopico diretto, dopo colorazione col Gram o col metodo di Papanicolaou.

4. *Citomegalovirus (CMV).* - Nel LBA dei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, possono essere presenti oltre al virus i segni della replicazione virale intracellulare (citomegalia, inclusi nucleari e citoplasmatici) (fig. 7)

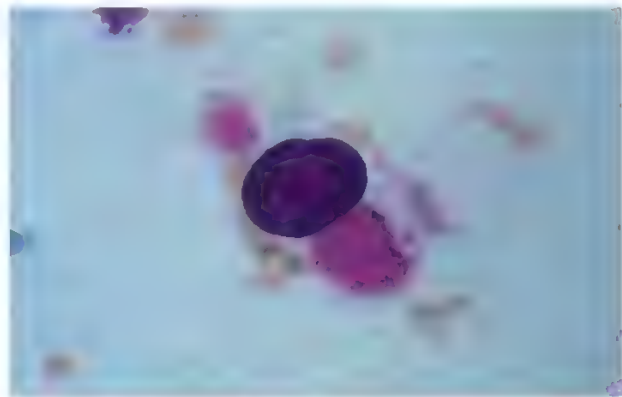


Fig. 7. Citocentrifugato di LBA di soggetto con AIDS: macrofago alveolare con inclusi nucleari e citoplasmatici da citomegalovirus. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa, 1000 $\times$).

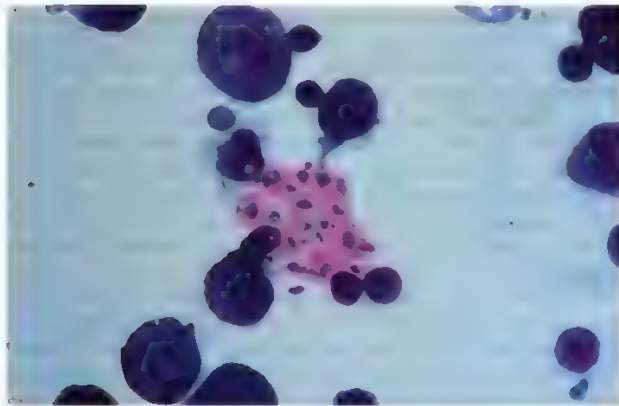


Fig. 8. Citocentrifugato di LBA di paziente con AIDS e pneumopatia da criptococco: è ben evidente un gruppo di criptococchi circondato da macrofagi alveolari e da linfociti. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 400 ×).

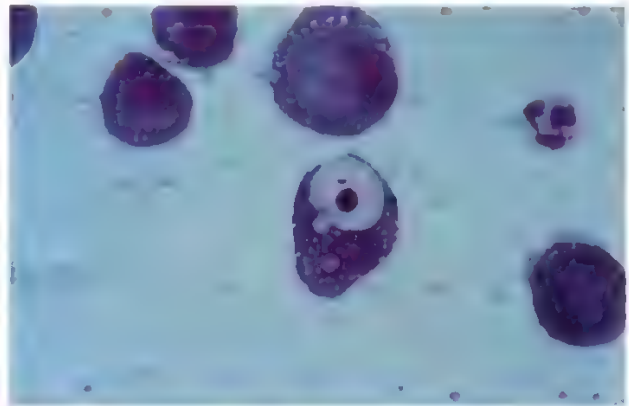


Fig. 10. Citocentrifugato di LBA di soggetto con AIDS e pneumopatia da criptococco: il macrofago al centro contiene nel citoplasma un criptococco circondato da una voluminosa capsula. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 1000 ×).

e della risposta dell'ospite (grandi linfociti granulosi) (Escudier *et al.*, 1986). Nel liquido di LBA degli HIV-positivi, a seconda della metodica di identificazione, il CMV si ritrova con una frequenza del 17-52%; mentre le cellule con corpi inclusi solo nel 5% dei casi (Millar *et al.*, 1990; Miles *et al.*, 1990).

5. Altri virus possono essere: il virus influenzale, il virus respiratorio-sinciziale, gli adenovirus; per l'*Herpesvirus* occorre tener presente una possibile contaminazione delle secrezioni orali.

6. Micosi.

a) *Aspergillus* spp.: il LBA è l'esame di scelta: la diagnosi si fonda sulla messa in evidenza di filamenti miceliali settati, talora con siderofagi associati. Meno importante è la coltura. La sensibilità dell'esame diretto sarebbe del 53% e la specificità del 95% (Kahn *et al.*, 1986).

b) *Cryptococcus* spp.: raramente lo si riscontra nel liquido di LBA (figg. 8-10); l'esame diretto ha una sensibilità del 33% e l'indagine culturale dell'87% (Baughman *et al.*, 1991).

7. Pneumopatie batteriche (Sternberg *et al.*, 1993).

a) *Rhodococcus* spp. evidenziato nel LBA con la colora-

zione di Ziehl-Neelsen (fig. 11) e successivamente identificato con la coltura.

b) Tubercolosi: il LBA è l'esame di prima scelta in caso di miliare polmonare, ma non nelle altre forme polmonari (fig. 12).

c) Micobatteri atipici: occorre porsi il problema della patogenicità del germe: il *Micobacterium avium-intracellulare* può non essere patogeno; il *M. kansasii* lo è.

È possibile inoltre la contaminazione dei broncoscopi da parte dei micobatteri atipici come il *M. chelonae*, contenuti nell'acqua di lavaggio dello strumento (Wang *et al.*, 1995; Kiely *et al.*, 1995).

LBA in patologia non infettiva

1. Ricerca di cellule tumorali: la sensibilità oscilla dal 35% al 69% (Israel-Biet *et al.*, 1992) a seconda del tipo istologico, della presentazione radiologica e della tendenza della neoplasia ad esfoliare (v. sopra, figg. 3-5).

2. Proteinosi alveolare associata ad un disordine mielo-proliferativo o ad una infezione come in corso di polmonite da *Pneumocystis carinii* (Tran van Nhieu *et al.*, 1990), a tossicità da farmaci, etc. (Cordonnier *et al.*, 1994).

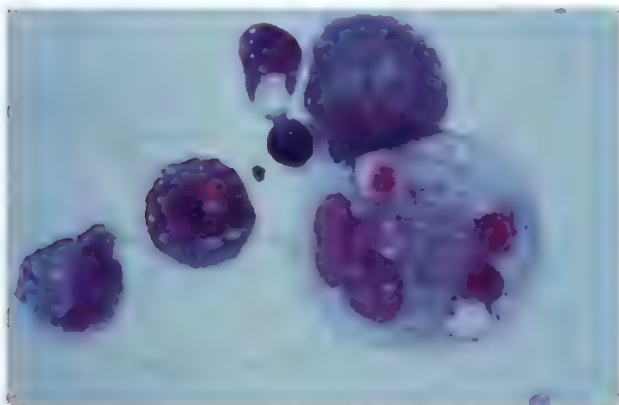


Fig. 9. Citocentrifugato di LBA di soggetto con AIDS e pneumopatia da criptococco: al centro, all'interno di 2 macrofagi, si osservano diversi criptococchi, dei quali uno dotato di capsula. (Colorazione May-Grünwald-Giemsa; 1000 ×).

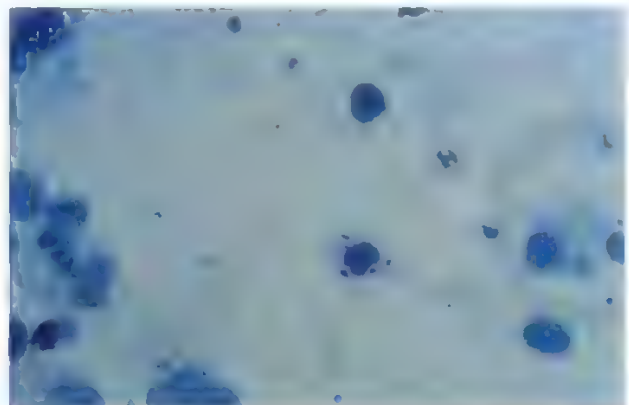


Fig. 11. Citocentrifugato di LBA di soggetto con AIDS: nel citoplasma del macrofago al centro sono visibili alcune piccole formazioni ovalari alcol-acido resistenti successivamente identificate come *Rhodococcus* sp. (Colorazione Ziehl-Neelsen; 1000 ×).



Fig. 12. Neutrofilo contenente due bacilli acido-resistenti osservato nel LBA di un paziente con miare tubercolare polmonare. (Colorazione Ziehl-Neelsen; 1000 $\times$).

3. Emorragia intralveolare da varie cause.

4. Alveolite eosinofila (percentuale di eosinofili, nel liquido di LBA superiore al 5%) in caso di polmonite da *Pneumocystis carinii* e di tossicità da farmaci.

5. Alveolite linfocitaria (fig. 13): da farmaci, da radiazioni, da bronchiolite obliterante con o senza polmonite organizzativa, nelle infezioni polmonari da virus e da batteri.

Con la tipizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie si può approfondire l'indirizzo diagnostico.

È d'altra parte evidente che il lavaggio è una metodica utile nella diagnosi di tubercolosi, micobatteriosi, nella ricerca di cellule tumorali, nella proteinosi, nelle alveoliti eosinofile e linfocitarie, non solo nei soggetti immunodepressi ma anche negli immunocompetenti.

LBA e diagnosi di polmonite

Altro vasto campo in cui viene proposto il LBA è nella diagnosi etiologica delle polmoniti gravi comunitarie ed in quelle ospedaliere.

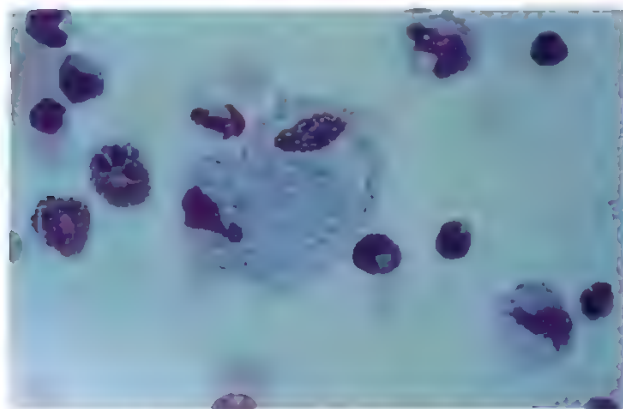


Fig. 13. LBA di un paziente affetto da artrite reumatoide in trattamento con corticosteroidi. Nell'angiografia del torace ed all'esame di LBA si evidenzia un'area di consolidazione. (Colorazione May-Grunwald; 1000 $\times$).

La tecnica permette di ottenere un campione di secrezioni e cellule di una zona mirata del polmone. Il passaggio del broncoscopio attraverso le cavità nasali e l'orofaringe determina però la contaminazione del canale di suzione da parte della flora microbica di tali regioni. Per ovviare al problema, oltre che consigliare di evitare di aspirare le secrezioni prima di raggiungere il bronco da incannulare o addirittura di eseguire il LBA in posizione di Trendelenburg vengono applicate sui liquidi recuperati tecniche colturali quantitative: la maggior parte degli Autori (Kirkpatrick *et al.*, 1989; Guerra e Baughman, 1990; Chastre *et al.*, 1995) considera significativa per la diagnosi etiologica la presenza di 10^4 - 10^5 CFU (*Colony Forming Unit*; unità formanti colonie) di almeno un microrganismo/ml di liquido recuperato. In soggetti non intubati la presenza nel liquido di LBA di cellule epiteliali squamose in percentuale maggiore dell'1% è da considerarsi indice di inquinamento orofaringeo. In tali casi si possono riscontrare nei liquidi di recupero quantità di germi superiori a 10^5 CFU/ml. Il numero di microrganismi che si recupera è notevolmente influenzato dalla diluizione del campione.

Nei pazienti intubati e sottoposti a ventilazione meccanica i criteri clinici e radiologici hanno un'importanza relativa nel far diagnosi di polmonite; il LBA si pone come utile mezzo sia per escludere altre patologie (ARDS, infarti, atelettasie, etc.) sia per l'identificazione per mezzo di colture quantitative del germe in causa. Nei campioni di liquido recuperati la presenza di oltre il 15% di neutrofili contenenti germi alla colorazione di Gram sarebbe indice di polmonite (Chastre *et al.*, 1988). La diagnosi verrebbe così posta prima che i risultati delle colture siano disponibili anche quando la polmonite si verifica come superinfezione in un soggetto già in trattamento antibiotico. Si ottengono in tal modo importanti indicazioni per iniziare una precoce terapia antimicrobica empirica.

La predominanza dei neutrofili nei liquidi di LBA di soggetti intubati non serve a distinguere i processi infettivi in atto, da quelli in via di risoluzione e i processi infettivi dall'ARDS cui spesso sono associati.

Nei soggetti ventilati in caso di polmonite, il LBA darebbe risultati microbiologici paragonabili a quelli ottenuti mediante fibrobroncoscopia con *brushing* protetto (Torres *et al.*, 1989).

Per ovviare alla possibilità di inquinamento da parte della flora batterica oro-faringea alcuni hanno introdotto una nuova tecnica: il LBA «protetto» (Meduri *et al.*, 1991). Esso consta di un catetere transbroncoscopico che porta all'estremità distale un palloncino che evita la contaminazione da parte delle sostanze presenti nel canale di suzione dei liquidi che vengono inoculati e poi riaspirati. Il canale di aspirazione del sistema è protetto da un sottile diaframma di polietilene che viene espulso con l'inoculo di 2 ml di soluzione fisiologica sterile. Si deve utilizzare un broncoscopio di diametro largo che però limita l'utilizzo della metodica in alcuni pazienti. Considerando come *cut-off* la crescita di almeno 10^4 CFU di un determinato germe/ml di liquido recuperato, il LBA protetto sembra avere una specificità del 97% ed una sensibilità del 92%.

LBA in pediatria

L'introduzione di fibrobroncoscopi di diametro sempre più piccolo ha reso possibile l'applicazione della tecnica dell'LBA anche alla popolazione pediatrica. Mentre negli adulti la metodica è abbastanza standardizzata ed i dati nei sani sono sufficientemente confrontabili, quelli nei bambini sono ancora iniziali, spesso variabili e frammentari. Negli ultimi anni sono stati fatti molti progressi per fornire i valori normali della componente cellulare.

In genere si usa un fibrobroncoscopio pediatrico di diametro fra 2.8-3.6 mm nei bimbi di età inferiore a 8 anni; in quelli più grandi si può utilizzare uno strumento di diametro maggiore (4.8 mm). Alcuni eseguono l'indagine in anestesia generale inalatoria (alotano 1-5% con ossigeno somministrato mediante maschera facciale), senza preanestesia. L'atropina, alla dose di 0.02 mg/kg viene infusa e.v. durante la fase di induzione dell'anestesia. Lidocaina al 2-4% (dose massima 4 mg/kg) viene spruzzata sulla mucosa laringea e tracheale mentre si introduce e si fa procedere lo strumento.

Alcuni AA. hanno eseguito il LBA in bambini senza pneumopatie mentre questi erano intubati per interventi chirurgici che non riguardavano il polmone.

La soluzione fisiologica sterile, riscaldata a 37 °C viene inoculata in volumi proporzionali al peso corporeo: 3 boli di 1 ml/kg. I liquidi vengono riaspirati mediante una suzione di 100-150 mmHg, dato il piccolo diametro del canale di aspirazione dei broncoscopi pediatrici; nell'adulto si utilizzano pressioni tra i 25-100 mmHg oppure di 80 cm di acqua o, secondo la nostra esperienza, anche per mezzo della stessa siringa dell'inoculo. Il primo recupero è in genere ricco di neutrofili, di immunoglobuline e di cellule epiteliali che, se in percentuale superiore al 5%, rendono male interpretabili i dati. Nei primi due anni in generale è minore la quantità totale di cellule recuperate; il numero di linfociti è direttamente proporzionale all'età. Fino a circa 8 anni la percentuale di neutrofili è un po' più elevata di quella degli adulti (Ratjen *et al.*, 1994), mentre quella dei macrofagi, degli eosinofili, dei linfociti è simile. Il rapporto linfociti T CD4/CD8 (Riedler *et al.*, 1995; Ratjen *et al.*, 1995) risulta invece inferiore a quello dell'adulto, oscillando intorno a 0.6. I linfociti T helper (CD4) sono in numero assoluto ed in percentuale la metà dei cytotoxic-suppressor (CD8). Col passare degli anni, nel sangue periferico e nel liquido di LBA, mentre rimane stabile il numero dei CD8, quello dei CD4 tende lentamente ad aumentare innalzando così il rapporto CD4/CD8 (Denny *et al.*, 1992). Il basso rapporto CD4/CD8 nel liquido di LBA nei bambini apparentemente normali viene interpretato come il risultato delle frequenti virosi respiratorie, potenti stimoli per i CD8, che si verificano in questa età.

I B linfociti, le cellule pan-T, le cellule NK (*Natural Killer*) CD57 sono presenti come nell'adulto. Nessuna alterazione si è trovata tra conta cellulare differenziale ed esposizione passiva al fumo. Non sono ancora disponibili dati sufficienti sul comportamento delle varie sottopopolazioni cellulari nel liquido di LBA dei bambini affetti da pneumopatie interstiziali. Nei bambini AIDS l'inversione del rapporto T CD4/CD8 risulta ancor più accentuato, senza alcuna correlazione con la presenza di un'iperplasia linfoide delle alte vie respiratorie e con il rapporto CD4/CD8 nel sangue periferico, più elevato di quello dell'LBA (Nowakowski *et al.*, 1992).

Bibliografia

- Baughman R. P., Dohn M., Loudon R., Frame P. T., *Chest*, 1991, **99**, 92-97.
 Betsuyaku T., Munakata M., Yamaguchi E. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, **149**, 526-529.
 Blucker E. R., McFadden E. R., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991, **88**, 808-814.
 Chastre J., Fagon J. Y., Soler P. *et al.*, *Am. J. Med.*, 1988, **85**, 499-506.
 Chastre J., Fagon J. Y., Bornet Lecso M., Calvat S. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **152**, 231-240.
 Cordonnier C., Fleury-Feith J., Escudier E. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, **149**, 788-794.
 Denny T., Yogev R., Gelman R. *et al.*, *JAMA*, 1992, **267**, 1484-1488.
 Donnelly S. C., Strieter R. M., Kunkel S. L. *et al.*, *Lancet*, 1993, **341**, 643-647.

- Drowning J. F., Pascual R., Wright J. R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 4848-4852.
 Escudier E., Fleury J., Cordonnier C., *Am. J. Clin. Path.*, 1986, **86**, 641-645.
 Guerra L. F., Baughman R. P., *Crit. Care Med.*, 1990, **18**, 169-173.
 Israel-Biet D., Gillet Juvin K., Cadranet J., Daniel C., *Encycl. Med. Chir., Pneumologie*, 6000 M, 1992, **10**.
 Kahn F. W., Jones J. M., England D. M., *Am. J. Clin. Path.*, 1986, **86**, 518-521.
 Kiely J. L., Sheehan S., Cryan B. *et al.*, *Tubercle and Lung disease*, 1995, **76**, 163-167.
 Kirkpatrick M. B., Bass J. B., *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1989, **139**, 546-548.
 Martin W. J. II, Smith T. F., Sanderson D. R. *et al.*, *Mayo Clin. Proc.*, 1987, **62**, 549-557.
 Masur H., in Shelamer J., Pizzo P. A., Parillo J. E., Masur H., *Respiratory disease in immunosuppressed host*, 1991, Lippincott, Philadelphia, pp. 409-427.
 Meduri G. U., Beals D. M., Majab A. G. *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, **143**, 855-864.
 Miles P. R., Baughman R. P., Linneman J. R., *Chest*, 1990, **97**, 1072-1076.
 Millar A. B., Paton G., Miller R. F. *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1990, **141**, 1474-1477.
 Nowakowski M., Chan S. P., Steiner P. *et al.*, *Am. Clin. Lab. Sci.*, 1992, **22**, 377-384.
 Ratjen F., Bredendiek M., Brendel M. *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 1994, **7**, 1865-1870.
 Ratjen F., Bredendiek M., Brendel M. *et al.*, *Am. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **152**, 174-178.
 Riedler J., Grigg J., Stone C., Tauro G., *Am. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **152**, 163-168.
 Robinson D., Hamid Q., Ying S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 298-304.
 Savill J. S., Hogg Y., Ren Y., Haslett C., *J. Clin. Invest.*, 1992, **90**, 1513-1522.
 Sternberg R. L., Baughman R. P., Dohn M. N., Roy-First M., *Am. J. Med.*, 1993, **95**, 358-364.
 Torres A., De La Bellacasa J. P., Xaubet A. *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, **140**, 306-310.
 Tran van Nhieu J., Votjek A. M., Bernardin J. F., Fleury-Feith J., *Chest*, 1990, **98**, 801-805.
 Wang H. C., Liaw Y. S., Yang P. C. *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 1995, **8**, 1259-1262.
 Wright S. D., Ramos R. A., Tobias B. S. *et al.*, *Science*, 1990, **249**, 1431-1433.
 Yung R. C., Weinaker A. B., Steiger D. J. *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993, **148**, 1563-1566.

MARISA COVI, FABRIZIO LUPPI, GIORGIO VELLUTI

LEBER, MALATTIA DI [v. vol. VIII, coll. 1282-1284; Agg. I, coll. *4495-4496]

Genetica

La neuropatia ottica di Leber (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*; LHON) è una affezione ereditaria a trasmissione materna conosciuta da oltre 100 anni (Leber, 1871). L'ipotesi di una associazione della malattia con una alterazione del DNA mitocondriale (*mtDNA*) è stata confermata da Wallace nel 1988 (v. MITOCONDRI*: MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**). La prima mutazione puntiforme (*missense mutation*) del *mtDNA* veniva localizzata in posizione nucleotidica (*np*) 11778 nel gene che codifica per la subunità 4 del Complesso I (*ND4/11778*). Essa comporta la sostituzione dell'arginina con l'istidina in posizione 340 lungo la catena aminoacidica della subunità 4. È la più frequente mutazione associata alla malattia (40-90% dei casi nei diversi gruppi etnici). Una seconda più rara mutazione puntiforme è stata individuata in *np* 3460 sul gene della subunità 1 del Complesso I (*ND1/3460*); comporta la sostituzione dell'alanina con la treonina nel corrispondente sito della catena polipeptidica. Questa seconda mutazione è responsabile dell'8-25% dei casi di LHON. Una terza mutazione, in posizione 4160 nel gene per la subunità 1 del Complesso I (*ND1/4160*) è stata riscontrata in una unica famiglia australiana ed è caratterizzata da un fenotipo clinico complesso. Una quarta sostituzione nucleotidica, in posizione 14484 nel gene per la subunità 6 del

Complesso I (ND6/14484), determina la conversione di metionina in valina nel corrispondente sito della catena polipeptidica. Costituisce la seconda più frequente mutazione associata alla malattia. Infine, la mutazione in np 14459, recentemente descritta, coinvolge la subunità 6 del Complesso I (ND6/14459) ed appare strettamente associata ad uno specifico quadro clinico.

Due ulteriori mutazioni, in np 9438 e 9804, sono state proposte quali mutazioni primarie; coinvolgono il gene che codifica per la subunità III dell'enzima citocromo c ossidasi (COXIII/9438, COXIII/9804).

Accanto a queste mutazioni considerate primarie, in grado di determinare la malattia singolarmente, sono state descritte numerose altre mutazioni definite «secondarie»: il termine allude all'ipotesi che queste, prive individualmente di uno specifico valore patogenetico, agiscano sinergicamente con le primarie rendendo più probabile l'emergenza della malattia. Tale ipotesi appare al momento difficilmente dimostrabile sia per l'elevata frequenza di polimorfismi del mtDNA privi di valore patogeno, sia per la difficoltà di valutare l'effetto specifico da attribuire ad una mutazione, dal momento che questa coesiste con un'altra di dimostrato valore patogenetico.

Rapporto genotipo/fenotipo

La mutazione ND4/11778 è associata in modo prevalente al fenotipo classico della malattia, caratterizzato da un'importante, ingravescente perdita del visus, irreversibile in oltre il 70% dei pazienti. Per quanto rara, è da segnalare l'associazione fra LHON e sclerosi multipla in soggetti in prevalenza di sesso femminile portatori di questa mutazione.

La mutazione ND1/3460 è stata inizialmente associata ad una migliore prognosi visiva rispetto alla ND4/11778, nonostante la maggiore probabilità di ammalare per i portatori di questa mutazione. Alcuni lavori più recenti non hanno tuttavia confermato questo dato. Anche per la ND1/3460 è stata segnalata la possibile associazione ad un quadro clinico simile alla sclerosi multipla.

La mutazione ND6/14484, la più frequente dopo la ND4/11778, è associata ad una migliore prognosi visiva rispetto alle altre mutazioni primarie sino a questo momento individuate: solo il 29% dei soggetti affetti presentano una persistente, grave riduzione dell'acuità visiva; la prognosi nei soggetti sintomatici è tanto migliore quanto più precoce è l'età di esordio.

Due mutazioni appaiono associate a fenotipi clinici specifici: la mutazione ND1/4160, riportata solo in un'ampia famiglia australiana inizialmente descritta da Wallace, si caratterizza per una alta frequenza di espressione clinica e per l'associazione con altri importanti deficit neurologici (grave encefalopatia progressiva ad esordio infantile, disartria, atassia, tremore, segni di interessamento delle colonne dorsali, deformità scheletriche). La mutazione ND6/14459 è stata invece associata ad un particolare fenotipo caratterizzato da LHON, distonia progressiva e necrosi selettiva dello striato.

Patogenesi

La patogenesi della LHON non è nota. Alcune sue caratteristiche fenotipiche ne rendono problematica la comprensione. La malattia colpisce preferibilmente soggetti di sesso maschile (il rapporto fra maschi e femminile è di 2,5:1 nella mutazione ND4/11778, di 2:1 nella ND1/3460, di 5:1 nella ND6/14484). Inoltre, nell'ambito della stessa famiglia solo alcuni soggetti portatori della mutazione ammalano, mentre altri, parte dei componenti, a prescindere

dalle loro condizioni di vita ed abitudini voluttuarie, non svilupperanno mai la malattia. Infine, il tessuto nervoso bersaglio della malattia è il nervo ottico, struttura difficilmente analizzabile *in vivo* sia per quanto riguarda il grado di eteroplasmia della mutazione (rapporto fra mtDNA mutato e normale), che per le conseguenze metaboliche da questa derivanti.

In generale, poco è noto circa le alterazioni del metabolismo energetico nella LHON. Una ridotta ossidazione dei substrati NADH-dipendenti è stata rilevata nei mitocondri estratti dal muscolo in soggetti LHON portatori della mutazione ND4/11778. Tuttavia non è stata trovata alcuna correlazione fra l'espressione fenotipica della malattia e l'entità di tale compromissione, rilevata anche in soggetti asintomatici. Un'alterazione dei meccanismi mitocondriali di produzione di energia del tessuto nervoso e muscolare è stato rilevata con la ³¹P-MRS. Un deficit dell'attività del Complesso I è stato trovato nei mitocondri estratti dalle piastrine in soggetti portatori della mutazione ND1/3460 e ND1/4160. Anche in questo caso, il deficit enzimatico appare difficilmente correlabile con la patogenesi della malattia (è stato trovato anche nei collaterali asintomatici) a meno che non si ipotizzi l'intervento di fattori extramitocondriali. In tale ottica numerosi fattori ambientali sono stati evocati (etilismo, tabagismo). Nessuno di questi tuttavia sembra in grado di render conto della variabilità di espressione fenotipica della malattia. La netta prevalenza di soggetti affetti di sesso maschile ha fatto ipotizzare la presenza di un locus genico di suscettibilità al deficit visivo *X-linked*. Secondo questo modello, i soggetti di sesso femminile affetti dalla malattia sono omozigoti per l'allele di suscettibilità o eterozigoti con inattivazione dell'*X*. I dati che inizialmente suggerivano un locus prossimo al locus DXS7, non sono stati confermati. Più recentemente, tuttavia, nuovi dati hanno supportato l'ipotesi di un locus genico di suscettibilità legato al cromosoma X.

Bibliografia

- Cortelli P., Montagna P., Avoni P. et al., *Neurology*, 1991, **41**, 1211.
 Harding A. E., Sweeney M. G., Govan G. G. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, **57**, 77.
 Howell N., Kubacka I., Xu M., McCullough D. A., *Am. J. Hum. Gen.*, 1991, **48**, 935.
 Huoponen K., Vilkkii J., Aula P. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, **48**, 1147.
 Johns D. R., Smith K. H., Miller N. R., *Arch. Ophthalmol.*, 1992, **110**, 1577.
 Johns D. R., Heher K. L., Miller N. R., *Arch. Ophthalmol.*, 1993, **111**, 495.
 Keller-Wood H., Robertson N., Govan C. G. et al., *Ann. Neurol.*, 1994, **36**, 109.
 Larson N.-G., Andersen O., Holme E. et al., *Ann. Neurol.*, 1991, **30**, 701.
 Leber T., *Graefes Arch. Ophthalmol.*, 1871, **17**, 249.
 Leuzzi V., Carducci G., Laura T. et al., *Acta Neurol. Scand.*, 1997, (in corso di stampa).
 Newman N. J., *Arch. Neurol.*, 1993, **50**, 540.
 Nikoskelainen E., Savontaus M. L., Wanne O. P. et al., *Arch. Ophthalmol.*, 1987, **105**, 665.
 Riordan-Eva P., Sanders M. D., Gonan C. G. et al., *Brain*, 1995, **118**, 319.
 Shoffner J. M., Brown M. D., Sturgard C. et al., *Ann. Neurol.*, 1995, **38**, 163.
 Singh G., Lott M. T., Wallace D. C., *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 1300.
 Torroni A., Petrozzi M., D'Urbano L. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, **60**, 1107-1121.
 Vilkkii J., Ott J., Savontaus M.-L. et al., *Am. J. Hum. Gen.*, 1991, **48**, 486.
 Wallace D. C., Singh G., Lott M. T. et al., *Science*, 1988, **242**, 1427.

ANNA MARIA DE NEGRI E VINCENZO LEUZZI

LENTI E OCCHIALI [v. vol. VIII, coll. 1403-1416; Agg. I coll. *4503-4507]

LENTI E OCCHIALI IN ETÀ PEDIATRICA

SOMMARIO

Metodiche di misurazione dell'acuità visiva (col. 3125): *Date della visita oculistica nel bambino.* - **Prescrizione in età pediatrica** (col. 3126): *Premessa.* - *Miopia.* - *Ipermetropia.* - *Uso di lenti a contatto in pediatria* (col. 3129).

Metodiche di misurazione dell'acuità visiva

Il metodo più comune per valutare la funzione visiva di un occhio consiste nel misurarne l'acuità visiva (v. **VISIONE**); essa viene determinata in base al potere risolutivo, che si concreta nel riconoscimento del più piccolo intervallo angolare (angolo minimo separabile) fra due oggetti, che permetta di scorgerli separati l'uno dall'altro, e viene denominata acuità visiva di risoluzione. Vi possono inoltre essere una *acuità visiva di ricognizione*, che è la capacità di riconoscere e percepire un simbolo (tavole ottotipiche), una *acuità visiva di detezione*, che è la capacità di identificare una linea verticale in un campo vuoto, una *acuità visiva di localizzazione*, che è la capacità di determinare la posizione relativa di due linee verticali separate tra loro in senso orizzontale.

L'acuità visiva viene anche valutata in base al potere di discriminazione nei confronti di un reticolo strutturato, costituito da bande alternativamente chiare e scure di determinata frequenza spaziale; in tal modo l'acuità visiva non viene più espressa in frazione decimale, bensì in cicli/grado, cioè in base al numero di cicli visibili per grado angolare di grado visivo oggetto, dove per ciclo si intende lo spazio occupato da una banda chiara e da una banda scura. Generalmente le metodiche di misurazione della acuità visiva sono di tipo soggettivo (tavole ottotipiche, zebre di Maione, anelli di Landolt, «E» di Albini) e richiedono una partecipazione attiva da parte del soggetto, che deve fornire una risposta all'operatore.

L'acuità visiva nei bambini di età preverale è invece di difficile determinazione per l'impossibilità di applicare i metodi usati nella normale routine oftalmologica su soggetti adulti. Negli ultimi trenta anni sono state sviluppate a questo scopo tecniche diverse quali il nistagmo optocinetico, i potenziali evocati visivi (PEV; v. **POTENZIALI EVOCATI**) e la visione preferenziale (fig. 1).

La prima tecnica (*nistagmo optocinetico*) determina il potere di risoluzione dell'occhio in base allo stimolo di valore angolare più basso in grado di indurre il nistagmo.

Lo studio dei PEV nel bambino misura una risposta elettrica delle aree occipitali cerebrali.

La *fissazione o visione preferenziale di sguardo* (fig. 2) è basata sulla osservazione che i bambini preferiscono orientare lo sguardo verso uno stimolo strutturato, costituito da strisce bianche e nere di frequenza spaziale determinata, rispetto ad uno neutro di uguale forma, grandezza e luminosità presentato contemporaneamente. Questo metodo si è rivelato particolarmente utile nello studio della fascia di età compresa tra 1 e 6 mesi: nella fascia di età tra 1 e 3 anni si associa come condizionamento un carillon o una serie di pupazzi animati per stimolare e mantenere un comportamento discriminativo del bambino nei confronti dello stimolo visivo presentato.

Date della visita oculistica nel bambino

I visita: visita a tutti i neonati con particolare riguardo nei nati pretermine di basso peso, nei traumatismi da parto, nei

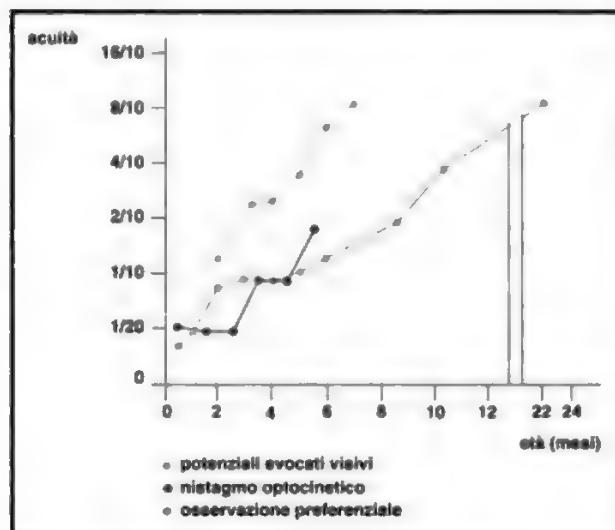


Fig. 1. Lo sviluppo dell'acuità visiva con l'età dipende in qualche misura dalla tecnica utilizzata, dato che i potenziali evocati visivi, i riflessi optocinetici e l'osservazione preferenziale danno risultati diversi. Con l'osservazione preferenziale si rileva che i bambini non raggiungono i livelli di acuità dell'adulto fino all'età di 2-3 anni. (Cortesia Editore, *Survey of Ophthalmology*, 1981, 25, 325-332, da Spalton et al., 1995).

neonati ad alto rischio generico (valutazione dei fattori ereditari).

II visita: tra i 6 e i 9 mesi di vita, soprattutto nei casi risultati sospetti alla prima visita.

III visita: all'età di 3 anni, soprattutto per poter escludere vizi di refrazione, alterazioni della motilità oculare e ambliopia.

IV visita: all'età di 5 anni, prima dell'ingresso nella scuola dell'obbligo, con eventuale ripetizione dopo circa due anni di attività scolastica.

Prescrizione in età pediatrica

Premessa

Lo sviluppo della visione distinta comprende varie tappe che devono essere ben conosciute per poter definire o so-



Fig. 2. Con la tecnica dell'osservazione preferenziale vengono mostrati al bambino due cartoncini: su di uno è presente una serie di barre mentre l'altro presenta una luminosità uniforme. Se il bambino può distinguere le barre, allora preferisce guardare queste presumibilmente perché più interessanti (Cortesia Prof. A. Fielder; da Spalton et al., 1995).

spettare un'alterazione della funzione visiva. La possibilità di valutare l'acuità visiva del bambino sin dal periodo neonatale mediante metodiche particolari (nistagmo optocinetico, scelta dello sguardo forzato preferenziale, potenziali visivi evocati [v. sopra]) ha permesso di quantificare l'entità del *visus* in rapporto all'età. L'acutezza visiva passa da 1/50 circa all'età di 1 mese a 1/10 all'età di 4 mesi, si stabilizza a circa 2/10 tra i 6-8 mesi e arriva ai 4/10 all'età di 1 anno; i valori dell'adulto sono generalmente raggiunti all'età di 3-4 anni.

In molti casi di alterazione del *visus*, già dai rilievi anamnestici o alla semplice ispezione, si può osservare un disorientamento spaziale: il bambino, dopo l'anno di età, urta contro le pareti, contro i mobili, contro gli oggetti, non mostra interesse per i colori, avvicina molto gli oggetti agli occhi, osserva la televisione soltanto da vicino; se in età scolare ha difficoltà di scrittura, di lettura ad una certa distanza o alla lavagna.

I difetti di refrazione che possono causare alterazioni del *visus* sono tre: miopia, ipermetropia, astigmatismo (v.; quest'ultimo viene trattato come negli adulti).

Miopia

La miopia (v.; nella quale un punto posto all'infinito si forma davanti la retina) determina un'alterazione del *visus* nella visione per lontano, si manifesta solitamente dopo i 4-5 anni di vita e progredisce in modo costante fino alla pubertà e oltre. Il bambino affetto da miopia cerca di aiutarsi nella visione per lontano socchiudendo le palpebre e mettendo così in atto un sistema di compenso (fessura stenopeica) che può provocare uno spasmo doloroso del muscolo orbicolare palpebrale e quindi cefalea, o altri sintomi astenopeici qualora siano presenti altre condizioni associate (astigmatismo, squilibri muscolari, anisometropia).

La correzione della miopia in un bambino non sempre è necessaria. Un soggetto miope con un *visus* di 6-7/10 non ha bisogno necessariamente di essere corretto. Possiamo invece seguirlo nel tempo. In via del tutto indicativa, se il *visus* scende a 5/10 o meno ed il soggetto ha più di 2,5 anni, la correzione sarà da prescrivere.

Contrariamente alla ipermetropia, la presenza di sintomi correlati al disturbo miopico non vanno troppo considerati nella decisione di prescrivere o meno delle lenti correttive: un bambino miope di 2,5 diottrie, asintomatico, andrà comunque corretto per migliorare le sue prestazioni visive. Un soggetto che presenta cefalea, affetto da miopia monolaterale di 1 diottria andrà meglio studiato per indagare le cause della cefalea.

Possano spesso associarsi squilibri muscolari, per i quali è opportuno attenersi a quanto segue:

— nelle esotropie costanti bisogna correggere completamente il difetto perché l'effetto del rimpicciolimento dell'immagine diminuisce la deviazione apparente; inoltre l'aumento della richiesta accomodativa stimola la convergenza e può ridurre la deviazione;

— nelle esotropie intermittenti, se la deviazione si manifesta per vicino, si prescrive la correzione totale a permanenza; se la deviazione è per lontano la correzione totale di solito non influenza la situazione se non nella misura in cui una visione più nitida aiuta la convergenza fusionale; in questi casi è stata proposta anche la sovracorrezione della miopia (maggiore è il rapporto *convergenza accomodativa/accomodazione*, maggiore sarà l'effetto di una sovra o sottocorrezione);

— dato che il soggetto con miopia scolare proviene spesso da una precedente condizione di ipermetropia, sovente troveremo delle esoforie per vicino;

nel caso di forti anisometropie con ambliopia dovremo in primo luogo lottare energeticamente contro l'ambliopia, che sarà sempre prioritario difetto da trattare. L'occlusione dell'occhio miotico, mediante cerotto adesivo alla cute periorbitaria, andrà prose-

guita a lungo perché frequenti sono le recidive dopo il recupero visivo, che spesso sarà soltanto parziale; nella anisometropia elevata senza ambliopia è possibile procedere a correzione totale del difetto refrattivo; se l'alternanza è l'unico meccanismo antidiplotico che il soggetto è in grado di mettere in pratica, allora sarà conveniente sottocorreggere l'occhio peggiore, salvaguardando la dominanza per vicino dell'occhio più miope; nei casi di anisometropia lieve o moderata, tipici della miopia scolare, dato che il difetto refrattivo non era verosimilmente presente in precedenza, riscontreremo spesso una visione binoculare normale dopo correzione totale bilaterale, che quindi rappresenta la soluzione ottimale.

Una forma particolare è la miopia degenerativa, o *degenerazione miopica progressiva*, che determina nel tempo danni retinici che limiteranno comunque la capacità visiva e non sempre in maniera proporzionale all'entità del difetto: si possono osservare miopie di tal genere anche con 4-5 diottrie. In questi casi è bene sottocorreggere il difetto refrattivo per ottenere un aiuto nella visione per vicino; consentendo di avere un punto prossimo più ravvicinato si ottiene un ingrandimento maggiore delle immagini retiniche di un oggetto.

Ipermetropia

Sappiamo che nell'ipermetropia (v.) l'immagine di un punto posto all'infinito si forma dietro la retina. Sino ai 2,5 anni il bambino non ha necessità di una perfetta acuità visiva e il carico di lavoro per gli occhi è relativamente modesto. Inoltre gli occhiali possono rappresentare un certo pericolo quando inizia la deambulazione e comunque comportare qualche problema nella applicazione. Conseguentemente dobbiamo riservare la prescrizione a quei casi in cui lo sfuocamento delle immagini determina un ritardato sviluppo delle capacità visive.

Dopo i 2,5 anni le situazioni più frequenti sono:

— ipermetropia media (3-4,5 diottrie), bilaterale: non vi è nessuna necessità di correggere questo tipo di situazione in quanto non comporta solitamente alterazioni della acuità visiva o disturbi collaterali: saranno da effettuare controlli periodici;

— ipermetropia elevata (> 4,5 diottrie), senza disturbi: molti di questi soggetti non necessitano di correzione poiché essi sono capaci di utilizzare una notevole parte del loro potere accomodativo per periodi prolungati senza accusare nessun disturbo; quando la correzione è ritenuta opportuna, questi soggetti la sopportano in maniera ottimale; la accettabilità può dipendere dalla capacità di rilasciare con facilità l'accomodazione, ma anche dalla possibile tollerabilità di una visione per lontano un po' sfocata o che non sia perfettamente in grado di esprimere gli eventuali disturbi;

— ipermetropia elevata (> 4,5 diottrie) con acuità visiva ridotta: è importante che il difetto refrattivo venga corretto per accelerare il raggiungimento di una normale acuità visiva; la correzione va effettuata totalmente (determinando sempre il valore refrattivo mediante schiascopia, in cicloplegia, previa l'instillazione per 3 giorni, 2 volte al giorno, di atropina 1% collirio) o parzialmente (ponendo molta attenzione alla situazione ortottica ed al rapporto *convergenza accomodativa/accomodazione*: rapporto CA/A);

— ipermetropie associate a turbe dell'equilibrio muscolare: nelle esotropie dobbiamo cercare di ristabilire la binocularità e quindi l'occhiale è il primo indispensabile passo terapeutico; nelle esoforie la binocularità è presente e quindi non sempre gli occhiali sono necessari.

Distinguiamo, in quest'ultimo ambito:

— esotropia accomodativa refrattiva (caratterizzata da ipermetropia elevata, normale rapporto *convergenza accomodativa/accomodazione*, angolo di strabismo moderato): correzione totale della refrazione cicloplegica;

— esotropia accomodativa non refrattiva (ipermetropia modesta, alto rapporto *convergenza accomodativa/accomodazione*);

dazione, deviazione per lontano modesta ma grande per vicino): minore deviazione per vicino se si aggiunge una lente positiva; lenti bifocali:

— forma mista (ipermetropia elevata, angolo modesto per lontano e più grande per vicino, alto rapporto CA/A): lenti bifocali.

Sovente l'ipermetropia è associata ad opacità corneali, microftalmo, opacità della lente o affezioni del nervo ottico: si tratta spesso di soggetti con *visus* molto basso, talora con nistagmo; la correzione totale, in questi casi, è indicata per fare in modo che tutto il potere accomodativo possa venire usato per avvicinare il punto prossimo, con conseguente aumento del potere di ingrandimento.

Infezioni degli annessi oculari (calazi, orzaioli, blefariti, congiuntiviti) sono spesso correlati con ametropie non corrette o comunque molti considerano l'ipermetropia come fattore favorente la cronicizzazione di tali patologie, corroborati dal fatto che dopo la prescrizione di lenti tali affezioni spesso scompaiono.

Riassumendo, diremo che l'ipermetropia di per sé non è l'indicazione per la prescrizione di occhiali in età pediatrica; fanno eccezione i casi specifici suddetti: ipermetropia elevata, esodeviezioni, visione ridotta, anisometropia e talvolta le infezioni oculari esterne (da valutare caso per caso).

Uso di lenti a contatto in pediatria

La più importante applicazione delle lenti a contatto in oftalmologia pediatrica è la riabilitazione ottica dell'afachia, preferibile rispetto all'impianto di lentine intraoculari (prima dei 3 anni di età) e all'epikeratofachia.

Le lenti a contatto vengono utilizzate nella riabilitazione visiva dei pazienti pediatrici con astigmatismo irregolare dalla nascita (traumatico), nella correzione della miopia elevata o dell'anisometropia; possono essere di aiuto nel nistagmo congenito, in caso di aniridia e di albinismo. Una lente a contatto occlusiva può essere tollerata da alcuni bambini affetti da strabismo.

I vantaggi della correzione di una ametropia con lenti a contatto, al posto degli occhiali a tempiale, sono numerosi:

— assenza di effetto prismatico con i movimenti oculari (nei casi di anisometropia corretti con occhiali, ad ogni posizione di sguardo diversa dalla primaria, ogni occhio subirà un effetto prismatico diverso con ripercussioni sulla funzionalità visiva binoculare; se la versione è orizzontale ed il bambino ha una buona ampiezza fusionale, l'effetto prismatico può essere facilmente compensato in convergenza, un po' meno in divergenza, ma se lo sguardo è spostato verticalmente tale compensazione è difficile e potrà insorgere diplopia; l'impiego di lenti a contatto è in grado di limitare e spesso di eliminare l'effetto prismatico e di influire così anche sulla convergenza);

— eliminazione del fenomeno di aniseiconia (condizione ottica caratterizzata dalla formazione nei due occhi di immagini retiniche di grandezza e forma diversa) nelle anisometropie (la grandezza dell'immagine retinica è inversamente proporzionale al potere diottrico complessiva del sistema occhio-lente correttiva e sua distanza dall'apice corneale; l'uso di lenti a contatto, rispetto a quello degli occhiali, limita le modificazioni di grandezza dell'immagine retinica, cioè il miope vedrà meno piccolo e l'ipermetrope meno grande: il miope corretto con lenti a contatto ha un potere diottrico complessivo minore e l'ipermetrope un potere complessivo maggiore che con la correzione con occhiali. Tale prerogativa delle lenti corneali torna vantaggiosa nei casi di anisometropia, dal momento che esse riescono a contenere le variazioni dell'immagine retinica entro

il 5%, limite oltre il quale si determinerebbe una impossibilità di fusione);

— annullamento dell'astigmatismo corneale (una lente corneale rigida sferica e torica elimina le conseguenze di un astigmatismo corneale molto elevato, e permette quindi un'alta risoluzione, anche con i movimenti del capo);

— aumento del campo visivo periferico (la correzione a contatto aumenta il campo visivo periferico ed elimina il fenomeno del «joker in box», che si verifica nei forti ametropi portatori di occhiali quando la linea di sguardo oltrepassa i bordi della montatura);

— influenza sull'accomodazione (un miope corretto con lenti a contatto accomoda di più che con gli occhiali, un ipermetrope di meno: la riduzione dello sforzo accomodativo nell'ipermetrope con la correzione a contatto migliora il trattamento dell'esotropia accomodativa, soprattutto nelle forme intermittenti).

Il tipo di lente a contatto (rigida, morbida, silicone) indicata dipende dal comfort, dalla tolleranza nei confronti della lente e dalla capacità dei genitori di un corretto utilizzo per l'integrità della lente e degli occhi del bambino.

Nonostante l'ampia indicazione all'applicazione delle lenti corneali nell'infanzia, il loro uso nella pratica è abbastanza limitato. Ciò dipende dal fatto che le lenti corneali di tipo morbido, le più adatte nei bambini, dopo qualche anno d'uso determinano reazioni congiuntivali su base immunoallergica, scatenate dalla denaturazione delle proteine lacrimali. La recente introduzione sul mercato delle lenti a contatto a ricambio frequente sta modificando il precedente orientamento negativo, poiché queste lenti, venendo ricambiate ogni 7-8 giorni e potendo essere portate anche a permanenza (da valutare caso per caso), eliminano il problema della applicazione giornaliera, della manutenzione data la loro sostituzione settimanale, e soprattutto il pericolo dell'insorgenza di congiuntiviti immunoallergiche. Peraltro è invece aumentato il rischio di infezioni corneo-congiuntivali.

Bibliografia

- Amaya L. G., Speedwell L., Taylor D., *Br. J. Ophthalmol.*, 1989, **74**, 150.
 Atkinson J., Braddick O., *Br. J. Ophthalmol.*, 1982, **66**, 264.
 Brant J. C., Nowotny M., *Dev. Med. Child Neurol.*, 1976, **18**, 568.
 Campos E., Chiesi C., *Oftalmologia pediatrica*, 1986, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
 Cassady J. R., *Am. J. Ophthalmol.*, 1963, **56**, 305.
 Dobson V., Mayer D. L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1980, **19**, 1498.
 Dobson V., Teller D. Y., *Vis. Res.*, 1978, **18**, 1468.
 Dobson V., *Behav. Brain Res.*, 1983, **10**, 25.
 Gorman S. S., Cogan D. G., *The Sight-saving Review*, 1959, **25**, 85.
 Kay H., *Br. J. Ophthalmol.*, 1983, **67**, 131.
 Mannucci L. L., *Impiego di lenti corneali nell'infanzia, Ortottica e pediatria*, 1995, CLEUP.
 Mayer D. L., Dobson V., *Vis. Res.*, 1982, **82**, 1141.
 Milder B., Rubin M. L., *The fine art of prescribing glasses*, 1978, Triad Scientific Publisher.
 Motolese E., Addabbo G., *Semeiotica oculare*, 1998, UTET, Torino.
 Spalton D. J., Hitchings R. A., Hunter P. A., *Atlante di Oftalmologia Clinica*, 1995, UTET, Torino.

RAFFAELE NUZZI E LUISILLA CAMERINO

LEUCEMIE [v. vol. VIII, coll. 1468-1635; Agg. I, coll. *4517-4610]

SOMMARIO GENERALE

LEUCEMIE ACUTE	col. 3131
LEUCEMIE MIELOIDI CRONICHE	col. 3155
LEUCEMIE INFANTILI	col. 3161

LEUCEMIE ACUTE

SOMMARIO

INTRODUZIONE	col. 3131
LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE	col. 3132
Citogenetica e biologia molecolare (col. 3132). - Terapia (col. 3135).	
LEUCEMIA PROMIELOCITICA ACUTA	col. 3136
Quadro clinico-ematologico (col. 3136). - Citogenetica e biologia molecolare (col. 3137). - Terapia (col. 3139).	
LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA	col. 3142
Epidemiologia (col. 3142). - Clonalità (col. 3142). - Immunofenotipo (col. 3142). - Citogenetica e biologia molecolare (col. 3144). - Patogenesi della soppressione della normomielopoiesi nella leucemia linfoblastica acuta (LLA) (col. 3145). - Terapia (col. 3145): Chemioterapia. - Trapianto midollare.	
LEUCEMIE ACUTE SECONDARIE	col. 3148
Generalità (col. 3148). - Leucemie secondarie ad alchilanti (col. 3149). - Leucemie secondarie ad inibitori della topoisomerasi II (col. 3150).	
REFRATTARIETÀ DI LEUCEMIE ACUTE ALLA CHEMIOTERAPIA	col. 3151
LA MALATTIA MINIMA RESIDUA	col. 3153

INTRODUZIONE

Negli anni successivi all'ultimo aggiornamento della voce LEUCEMIE (v.*; 1992), numerosi sono stati i contributi scientifici attinenti alla patogenesi, alla citogenetica, alla fenotipizzazione immunologica e molecolare, alla terapia delle leucemie [l.] acute (LA). Particolarmente importanti appaiono alcune acquisizioni riguardanti la l. promielocitica, le l. secondarie a terapia antitumorale, la valutazione della «malattia minima residua» e la patogenesi della farmacoresistenza di taluni casi di LA.

Trova larga conferma che il processo di leucemogenesi, come quello di tutte le neoplasie, è di tipo *multistep*: vi si possono riscontrare lesioni multiple del genoma coinvolgenti oncogeni e geni oncosoppressori, talora a comparsa chiaramente sequenziale. Le neoplasie ematologiche sono contraddistinte da diversi tipi e combinazioni di tali lesioni, sicché la malattia leucemica deve essere considerata quale evento biologicamente eterogeneo.

Gli studi di biologia molecolare che riguardano la cinetica del compartimento staminale e di quello differenziativo/maturativo, dimostrano che la malattia leucemica è fondamentalmente caratterizzata da tre eventi: a) alterazione della trasduzione del segnale mitogenico, che comporta una incontrollata proliferazione cellulare; b) alterazione della trasduzione dei segnali differenziativi, responsabile di un blocco della maturazione cellulare a livelli più o meno precoci; c) alterazione dei processi inerenti alla morte cellulare programmata (apoptosi [v.**]), da cui deriva il prolungamento della vita cellulare.

Queste alterazioni possono essere indotte da eventi molecolari diversi, che comportano — attraverso traslocazioni o altre anomalie cromosomiche — l'attivazione di proto-oncogeni o l'inattivazione di geni oncosoppressori.

Le anomalie cariotipiche che si osservano nelle LA possono essere di ordine quantitativo e/o qualitativo-strutturale. Seguendo una recente disamina di Grignani *et al.* (1995), tali anomalie possono essere distinte in quattro gruppi, in base al tipo di modificazione del materiale genico cellulare

1) *Riarrangimenti bilanciati*, senza guadagno né perdita di materiale cromosomico (traslocazioni, inserzioni, inversioni) — ne derivano alterazioni strutturali e/o funzionali di sequenze geniche con potenzialità trasformanti (proto-onco-

geni) attraverso meccanismi diversi nelle l. mieloidi e nelle linfoide. Nelle LMA si può osservare una unione di sequenze geniche normalmente distanti, con formazione di un gene di fusione codificante per una proteina chimerica (oncoproteina assente nelle cellule normali). Nelle LLA, invece, si nota di solito la giustapposizione di una sequenza genica con carattere di forte promotore ad un proto-oncogene, con conseguente deregolazione della sua trascrizione, che diventa indipendente dallo stadio del ciclo cellulare.

2) *Alterazioni sbilanciate*, per traslocazioni sbilanciate, cromosomi ad anello, delezioni, monosomie: comportano perdita di materiale genetico, spesso di geni oncosoppressori e l'evento diviene palese quando la funzione biologica che è loro propria viene persa in entrambi gli alleli per alterazioni strutturali (delezioni) o funzionali (mutazioni puntiformi). Come esempio si citano il 5q- in LMA e specialmente in LA «secondarie» (quando vengono persi oncogeni come *fms*, il gene per la IL-3 o per il recettore del PDGF), e il 6q- in M6.

3) *Anomalie sbilanciate*, con guadagno di materiale genetico (duplicazioni, trisomie, etc.) e in genere con bassi livelli di amplificazione.

4) *Isocromosomi*, con contemporanea perdita e guadagno di materiale genetico, associato a scomparsa di geni soppressori recessivi o ad aumento di dose di oncogeni dominanti. Tale ad esempio l'i(17q), che conferisce alle cellule un generico vantaggio proliferativo.

Si ammette che le anomalie cariotipiche e molecolari proprie delle LA interessino in primo luogo cellule del compartimento staminale.

Numerose evidenze (Russell, 1997) provano che nelle l. mieloidi acute (LMA) sono comunemente coinvolte cellule staminali primitive multipotenti CD34+ /CD38- (che per effetto del processo leucemico perdono spesso la capacità di differenziarsi in senso eritroide e megacariocitico), e altre volte cellule staminali più mature (CD34+ /CD38+) già linea-ristrette in senso esclusivamente granulocitico: è questo il caso della l. acuta promielocitica (FAB M3). La maggior parte delle l. linfoide acute (LLA) di linea B e le LLA di linea T dell'età infantile insorgono da progenitori orientati in senso linfoide piuttosto che tra cellule staminali multipotenti: quest'ultimo evento figura nelle LLA Ph⁺ positive (v. oltre).

Indubbiamente la varia natura delle cellule originarie della l. conferisce caratteristiche biologiche diverse alle cellule leucemiche (sia in termini della loro durata di vita, che di capacità proliferativa e differenziativo-maturativa) e rappresenta il fattore principale della loro varietà fenotipica. Non solo, ma ne dipendono pure le caratteristiche cliniche dei singoli tipi e sottotipi della malattia leucemica, la loro varia sensibilità alla terapia farmacologica e in definitiva la prognosi.

LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

Citogenetica e biologia molecolare

Sistematiche ricerche citogenetiche e molecolari hanno consentito di individuare numerose forme di traslocazioni cromosomiche associate alle l. mieloidi acute (LMA) dell'uomo. Di particolare rilievo è la constatazione che mentre nelle malattie mieloproliferative croniche (in cui prevale un'enorme espansione del compartimento proliferativo del clone leucemico mieloidico con relativamente modesta compromissione della sua capacità differenziativo-maturativa) dal punto di vista citogenetico e molecolare emerge principalmente un'alterazione dei geni deputati alla trasduzione del segnale mitogenico, nelle LMA (in cui dal punto di vista citomorfologico prevale la turba del processo differenziativo-maturativo del clone leucemico) le indagini citogenetiche e molecolari evidenziano essenzialmente un'alterazione

dei geni che regolano le diverse tappe della differenziazione cellulare.

Le ricerche citogenetiche e molecolari hanno dato l'avvio ad una migliore comprensione biologica dei sottogruppi nell'ambito delle classiche forme clinico-morfologiche della LMA, nonché alla individuazione di caratteristiche molecolari (come nel caso della l. promielocitica acuta; v. sotto) suscettibili di nuovi efficaci approcci terapeutici.

Delle tante lesioni genetiche osservabili nelle LMA, quelle coinvolgenti gli oncogeni *ras*, *fms* e *p53*, sono state rinvenute in tutti i sottotipi della classificazione FAB (French-American-British Cooperative Group), ma con bassa frequenza. Mutazioni interessanti il gene *ras* si possono reperire anche in sindromi mielodisplastiche e in leucemie secondarie. Altre lesioni sono invece notevolmente specifiche di ben definiti sottotipi di LMA, dove possono essere reperite nella quasi totalità dei casi. Ne segnaliamo le più importanti.

Le cosiddette *leucemie acute «indifferenziate»* sono pressoché nella loro totalità interpretabili quali LMA con minima differenziazione mieloide (FAB M0). Ne sono colpiti pazienti in un ampio range di età (15-79 anni, mediana 60). La concentrazione ematica dei leucociti e delle piastrine è in genere bassa, mentre l'infiltrazione dei blasti nel midollo osseo è massiva. I blasti sono di media grandezza, con nucleo rotondo, nucleolato e con cromatina finemente dispersa, rima citoplasmatica sottile modicamente basofila. Le reazioni citochimiche tipiche della linea mieloide (MPO, Sudan nero B) risultano positive solo in pochissimi blasti, che talora possono fornire debole positività diffusa con le reazioni per le esterasi e con il PAS. Tra i marker immunofenotipici mieloidi (*myeloid associated antigen*) è quasi sempre positivo il CD34, e vi si possono associare altri marcatori (CD33 o CD13 soprattutto). L'indagine citogenetica rivela cloni con alterazioni cromosomiche sbilanciate, come -5/5q- e/o -7/7q- e/o +13, con eventuali anomalie aggiuntive (ad es. riarrangiamento 2p12-15 e 12p12-13), ma non mancano casi con reperti citogenetici normali. La LMA M0 deve essere differenziata dalla M1, dalle LLA pre-B e dalle pre-T, e ciò richiede uno studio citologico, immunofenotipico e molecolare molto accurato. Malgrado le notevoli difficoltà di identificazione, si ritiene attualmente che la M0 rappresenti una entità clinica a sé stante, con prognosi particolarmente severa (sopravvivenza mediana 8 mesi se non è possibile praticare l'allograft midollare) (Cuneo *et al.*, 1995).

La traslocazione t(8;21)(q22;q22) è presente nel 15% dei casi di LMA e in più del 40% delle l. con morfologia FAB-M2, spesso fenotipicamente caratterizzate dalla coespressione di marcatori mieloidi e linfoidei, per cui si può ipotizzare l'interessamento di una cellula staminale totipotente. Alla t(8;21) in Fab-M2 è spesso associata la perdita di un cromosoma X (nella femmina) e dell'Y nel maschio. La t(8;21) coinvolge nel punto di rottura il gene *AML-1* (*Acute Myeloid Leukemia 1*) sul cromosoma 21 e quello *ETO* (*Eight-Twenty-One*) sull'8. La traslocazione dà luogo sul cromosoma der (8) ad un gene di fusione *AML-1/ETO* che mantiene una «sequence-specific DNA-protein» propria del gene *AML-1*, caratterizzata da un domain notevolmente omologo al gene *runt* di *Drosophila* preposto alla regolazione della segmentazione corporea (Erickson *et al.*, 1992); il prodotto chimérico *AML-1/ETO* appartiene alla categoria dei fattori trascrizionali e sembra che possa indurre la trasformazione leucemica mediante alterata interazione con geni normalmente regolati da *AML-1*. La t(8;21) è frequentemente associata a presenza di numerosi bastoncelli di Auer, ad eosinofilia midollare e a formazione di masse extramidollari di cellule leucemiche. La t(8;21) comporta in genere prognosi relativamente favorevole, con buona risposta alla chemioterapia e prolungata remissione completa (Nucifora e Rowley, 1995).

Recenti osservazioni (Claxton *et al.*, 1994) dimostrano che l'anormalità cariotipica inv(16)(p13;q22), presente in circa il 15% di LMA (e in particolare caratterizzante la LMA M4Eo), dà luogo ad un riarrangiamento delle subunità del gene del fattore trascrizionale «core binding factor» (*CBFβ*) con il gene delle catene pesanti di miosina *MYH11*. Ai punti di giunzione dell'inversione si forma un gene chimérico di fusione *CBFβ/MYH11* (Liu *et al.*, 1993); ne verrebbe modificata la fisiologica interazione di stimolo di *CBFβ* con la subunità DNA-legante del gene *AML-1* riarrangiato nella t(8;21), e quindi alterata l'attività di questo complesso trascrizio-

nale con esito in trasformazione leucemica. Si può ipotizzare che le affinità cliniche tra LMA M2 e LMA M4Eo siano legate a consimili alterazioni funzionali di processi molecolari.

La t(6;9)(p23;q34), inconsueta nella maggior parte delle LMA (ove è presente soprattutto in giovani adulti), ma rinvenibile con discreta frequenza in M2 e M4, comporta una fusione testa-coda tra il gene *DEK* localizzato su 6p23 ed il gene *CAN* situato su 9p34, dando luogo ad un gene su 6p, che codifica per un trascritto di fusione. In una variante t(9;9) rinvenibile soprattutto in M0, il gene *CAN* si fonderebbe con una proteina nucleare SET, pure localizzata su 9q34. Se ne deduce l'importanza del gene *CAN* nel processo leucemogenetico, essendo noto che la proteina codificata da *CAN* è una componente integrale del «nuclear pore complex», la cui esatta funzione è ancora *sub judice*, ma è probabilmente di natura trascrizionale. Non sono note neppure le funzioni normali delle proteine codificate da *DEK* e *SET*. La prognosi è sfavorevole. Casi consimili sono talora caratterizzati da presenza di note mielodisplastiche, iperplasia di blasti basofili nel midollo osseo, immunofenotipo CD13 e CD33+, CD34 negativo (Alsabeh *et al.*, 1997).

Con una certa frequenza in M2 si rinvencono t(2;4)(q23;q25), t(7;11)(p15;p15) nonché t(3;5)(q21;q31), che può essere reperita anche in M4 e M6 e si accompagna spesso ad alterazioni quantitative e morfologiche dei megacariociti e delle piastrine (sindrome 3q21;q26) (Bellomo *et al.*, 1992).

Recenti indagini ultrastrutturali hanno dimostrato in alcune LMA FAB-M2 granulazioni di tipo basofilo. Aspetti di differenziazione basofila sono individuabili talora anche in microscopia ottica in pazienti con LMA M2 associata a t(6;9)(p23;q34). LMA «con maturazione» (M2) a differenziazione basofila sono individuabili anche con l'AcMo Bsp-1 (Castoldi *et al.*, 1996).

Eccezionale è l'osservazione (Santiago-Schwarz *et al.*, 1994) di una LMA a morfologia M2, con anemia refrattaria e infiltrati testicolari del tipo «sarcoma granulocitico», in cui i test clonogenici rivelarono una modalità di crescita *in vitro* paragonabile alla «monocytic-dendritic cell colony-forming unit» di recente scoperta, per cui si presume che tale LA derivi da una cellula staminale capace di differenziarsi lungo la linea monocitico-dendritica: è stato proposto di indicarla come «leucemia mielodendritica».

Laurence *et al.* (1993) hanno descritto un raro quadro leucemico di tipo acuto ed a prognosi severa, in cui i blasti presentano aspetto simil-macrofagico più o meno maturo. L'immunofenotipo (CD68+) è indicativo di una derivazione monocito-macrofagica; è presente trisomia 8. È stato proposto di inserirlo nella classificazione FAB come M5c. Probabilmente affine a questa forma di LMA è un quadro citologico di tipo mielomonocitico (M4) o monocito-monoblastico (M5) caratterizzato da rilevante eritrofagocitosi, da t(8;16)(p11;p13) e clinicamente da spiccata diatesi emorragica non di tipo CID e da interessamento del SNC (Castoldi e Cuneo, 1996).

Per quanto concerne la *leucemia acuta promielocitica* (LPA), il cui fenotipo è strettamente associato alla t(15;17), e le cosiddette *leucemie secondarie*, anch'esse contrassegnate da particolari traslocazioni o delezioni, si rinvia agli appositi paragrafi (v. sotto). Segnaliamo tuttavia qui la recente osservazione di Scott *et al.* (1994) di un quadro leucemico i cui blasti ricordano l'aspetto citologico della LPA ma non presentano la t(15;17) né il trascritto chimérico PML/RARα, e hanno immunofenotipo particolare (CD33+, CD56+, CD16-). È stato denominato *leucemia acuta a cellule mieloidi/NK*. Non risponde ai retinoidi.

Le più frequenti caratteristiche cariotipiche della M5 (presenti nel 75% dei casi) sono le anomalie del cromosoma 11, dove è costantemente interessata la banda 11q23; ad es. la t(9;11)(q22;q23). In M5 si possono rinvenire però anche la t(8;16)(p11;p13), la del(2)(p23), la tetrasomia 8 e l'isocromosoma 1q. La t(6;11) si associa spesso a complicanze infettive e ad una cattiva risposta alla terapia antileucemica.

L'eritroleucemia (M6) è eterogenea dal punto di vista delle anomalie cromosomiche: vi sono casi con cariotipo normale, altri con anomalie semplici, quali +8, -Y, t(10;11), o la rara del(6)(6q-), oppure con riarrangiamenti complessi.

La LA megacarioblastica (M7) è rara, ma spesso in rapporto con la sindrome di Down. Tra le anomalie citogenetiche di più frequente riscontro segnaliamo la +21 e la t(1;22)(p13;q13). Si noti che la regione 22q12-13 contiene l'oncogene *c-sis* e il gene per la catena β del PDGF. Non raramente sono reperibili pure la t(3;3)(q21;q26-27), l'inv(3)(q21;q26) ed il 5q-/-5.

Terapia

Per quanto attiene alla terapia delle LMA, le ricerche prospettiche su ampie casistiche sono scarse. L'impiego di citostatici a dosi più elevate di quanto previsto dalle terapie convenzionali (v. l'Agg. I, 1992) ha consentito risultati interessanti ma non radicali (Appelbaum *et al.*, 1995).

La somministrazione di *citarabina ad alte dosi* (HDAC; *High Dose Ara-C*) (2-3 g/m² ogni 12 ore per 8-12 dosi) associata a *daunomicina* e ad *etoposide* non ha migliorato (in LMA dell'adulto) la frequenza di remissione completa (RC), ma nei soggetti responsivi la durata di DFS (*Disease Free Survival*) è apparsa alquanto prolungata.

Varie ricerche dimostrano che elevati dosaggi di *daunomicina* (60 mg/m² per 3 giorni) danno risultati più favorevoli, in soggetti di età inferiore ai 60 anni, rispetto a dosaggi inferiori (30-45 mg/m²).

L'*idarubicina* (che è un derivato antraciclino della *doxorubicina*) (12 mg/m² per 3 giorni) consente una maggiore frequenza di CR che non la *daunomicina* alla dose di 45 mg/m². L'associazione di *etoposide* (75 mg/m² per 6 giorni) o di *tioguanina* o di *vincristina* ai protocolli di *daunomicina* più *citarabina* non sembra dare risultati migliori degli schemi tradizionali. In LMA a prognosi sfavorevole l'associazione di Ara-C e di *fludarabina* (v.***) sembra dare risultati più favorevoli di quelli ottenibili con sola Ara-C (Estey *et al.*, 1993).

L'aggiunta di *fattori di crescita emopoietica* (G-CSF, GM-CSF) ai protocolli chemioterapici convenzionali presenta indubbiamente un modesto vantaggio per quanto attiene alla durata del periodo di mielodepressione e alla frequenza di infezioni, e forse aumenta la frequenza di RC, ma non modifica la durata della sopravvivenza. Per la profilassi delle emorragie (in leucemici sottoposti a CT) mediante *trasfusioni di piastrine* sembra già sufficiente raggiungere valori piastrinici di 10 × 10⁹/L (Rebulla *et al.*, 1997).

Si sono avute ampie conferme circa l'importanza dei cicli di *chemioterapia antitumorale in fase post-remissione completa* per ottenere il prolungamento della RC e della sopravvivenza: i risultati migliori si raggiungono associando *daunomicina* e *citarabina* in dosi analoghe a quelle impiegate nella terapia d'induzione, ripetute più volte per 8 mesi (ulteriori prolungamenti della *terapia di mantenimento* non sembrano migliorare i risultati). Un singolo ciclo di HDAC come *terapia di consolidamento* è più vantaggioso di una protratta terapia di mantenimento a basso dosaggio e risultati ancora migliori si ottengono con ripetuti cicli di HDAC. È da rilevare tuttavia che l'impatto curativo delle terapie di consolidamento e mantenimento con HDAC è in rapporto con le caratteristiche citogenetiche della malattia: i risultati più brillanti si ottengono in pazienti con t(8;21) e inv(16), nei quali tale programma terapeutico è preferibile al trapianto (tuttavia sarà sempre opportuno procedere alla crioconservazione di cellule staminali raccolte in fase di prima remissione) (Bloomfield *et al.*, 1994).

La prassi del *trapianto di midollo allogenico* nella strategia terapeutica della LMA presenta numerose ombre e soprattutto non vi è accordo generale se il trapianto sistematico in prima RC (35% di risultati favorevoli) risulti effettivamente superiore ad una robusta chemioterapia di induzione e consolidamento, assegnando eventualmente al trapianto il ruolo di presidio di salvataggio (il trapianto ha esito favorevole nel 30% di soggetti in seconda remissione). Il trapianto è limitato ai soggetti di età inferiore ai 55 anni. In complesso si ritiene che la strategia allotrapiantologica (attuata ricorrendo a parenti HLA compatibili) comporti una frequenza di guarigioni che varia a seconda delle casistiche tra il 40 e il 60%, mentre la sola chemioterapia non consentirebbe di superare il 19-21% (Appelbaum *et al.*, 1995).

Notevoli successi (25-30% di «guarigioni») sembrano ottenibili anche con terapia sopramassimale seguita da *trapianto autologo di midollo osseo* o di *cellule staminali* (crio-

preservate in corso di prima RC) e attuato sia in prima recidiva non trattata che in seconda remissione. In una recente vasta sperimentazione pluricentrica (Zittoun *et al.*, 1995) la frequenza di DFS a 4 anni toccherebbe il 48% nel gruppo di trapianto autologo, il 55% nel gruppo di allotrapianto, contro il 30% riscontrabile nel gruppo di LMA trattato con sola chemioterapia (v. anche MIDOLLO OSSEO**, *trapianto*).

Bibliografia

- Alsabeh R., Brynes R. K., Slovak M. L., Arber D. A., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1997, **107**, 430.
 Appelbaum F. R., Downing J., Willman C., *Education Program of the American Society of Haematology*, Seattle (WA) dec. 1995, 23.
 Bellomo M. J., Parlier V., Muhlematter D. *et al.*, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1992, **59**, 138.
 Bloomfield C. D., Lawrence D., Arthur D. C. *et al.*, *Blood*, 1994, **84** (suppl. 1), 111.
 Burnett A. K., Eden O. B., *Lancet*, 1997, **349**, 270.
 Castoldi G. L., Cuneo A., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9**, 19.
 Claxton D. F., Liu P., Hsu M. B. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 1750.
 Cuneo A., Ferrant A., Michaux J. L. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 3688.
 Erikson P., Gao J., Chang K. S., Look T. *et al.*, *Blood*, 1992, **81**, 1832.
 Estey E., Plunkett W., Gandhi V. *et al.*, *Leuk. Lymph.*, 1993, **9**, 343.
 Gaidano G. L., Dalla-Favera R., in Knowles D. H. ed., *Neoplastic Haemopathology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1992, 245.
 Grignani F., Aversa F., Donti E. *et al.*, *Atti 96° Congr. Soc. It. Med. Int.*, 1995, Pozzi ed., Roma, **1**, 249.
 Guerrasio A., Rosso C., Martinelli G. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1995, **90**, 364.
 Liu P., Tarle S. A., Hagara A. *et al.*, *Science*, 1993, **261**, 1041.
 Nucifora G., Rowley J. D., *Blood*, 1995, **86**, 1.
 Rebulla P., Finazzi G., Marangoni F. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 1870.
 Russell N. H., *Lancet*, 1997, **349**, 118.
 Santiago-Schwarz F., Coppock D. L., Hindenburg A. A., Kern J., *Blood*, 1994, **84**, 3054.
 Scott A. A., Head D. R., Kopecki K. J. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 244.
 Zittoun R. A., Mandelli F., Wollenze R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 217.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LEUCEMIA PROMIELOCITICA ACUTA

Quadro clinico-ematologico

La l. promielocitica acuta (LPA), indicata come M3 nella classificazione FAB (French-American-British Co-operative Group), viene osservata in ogni età e rappresenta nell'adulto circa il 10% di tutte le l. acute non linfoidi (LANL). In alcune aree (in specie tra le popolazioni sudamericane ma anche in Europa) l'incidenza generale della LPA tocca il 30-40% di tutte le LANL. Il quadro clinico è caratterizzato da manifestazioni emorragiche dovute ad un complesso disordine dell'emostasi di cui la coagulopatia intravascolare disseminata (CID) costituisce l'evento più noto ma non sempre il più importante. All'esordio si nota in genere pancitopenia periferica, con presenza in circolo di una quantità variabile di promielociti neoplastici. Il parenchima midollare è infiltrato per il 30-90% da cellule leucemiche. Si distinguono (Castoldi *et al.*, 1994) quattro *forme citomorfologiche*.

a) *LPA classica (M3)*, caratterizzata dalla presenza nel citoplasma dei promielociti di grandi granuli primari atipici azurofili che talora ricoprono completamente il nucleo reniforme; sono spesso presenti corpi di Auer. L'ipergranulosità citoplasmatica dei promielociti è più evidente nel midollo osseo che nel sangue periferico.

b) *LPA variante microgranulare (M3v)* (che rappresenta il 20% di tutte le LPA), in cui il citoplasma dei promielociti presenta piccolissimi granuli specifici, al limite di visualizzazione in microscopia ottica; il nucleo è caratteristicamente bilobato o reniforme; si possono osservare corpi di Auer.

In ambedue le forme citologiche i promielociti leucemici presentano intensa positività delle colorazioni e reazioni citochimiche tipiche della linea granuloblastica: Sudan nero B, mieloperossidasi, cloroacetato esterasi. L'immunofenotipo è caratterizzato da positività di CD13 e CD33 e da negatività per HLA-DR.

c) *LPA variante iperbasofila*. Questa rara variante è caratterizzata da blasti con elevato rapporto N/C, citoplasma fortemente basofilo con o senza granuli sparsi, a contorni gemmanti, simili a quelli rinvenibili in taluni micromegacariociti.

d) Di ancor dubbio significato è un'ulteriore variante, la *LPA con preminente differenziazione basofila* (Tallman *et al.*, 1993), caratterizzata da presenza nel midollo osseo di promielociti in differenziazione basofila e/o da basociti maturi nel sangue periferico, con non ben chiarite anomalie citogenetiche, per cui non è sicuro se si tratti di una leucemia di tipo ibrido oppure di una manifestazione basocitica reattiva. Possono manifestarsi fenomeni clinici di natura iperistaminemica (Castoldi e Cuneo, 1996).

Citogenetica e biologia molecolare

Nel 70-90% dei casi di LPA (Rowley *et al.*, 1977) è presente una traslocazione bilanciata e reciproca, *non random*, tra le braccia lunghe dei cromosomi 15 e 17: t(15;17)(q22;q11-12). Il *breakpoint* sul cromosoma 15q può coinvolgere il gene *PML* (*promyelocytic leukemia gene*) in tre diversi punti, a livello dell'introne 6 (*bcr 1*), dell'introne 3 (*bcr 3*), dell'esone 6 (*bcr 2*); il *breakpoint* sul cromosoma 17q è costantemente situato a livello del gene che codifica per il recettore alfa dell'acido retinoico (*RARα*).

A causa del carattere reciproco della predetta traslocazione si ottengono pertanto due geni di fusione, *PML/RARα* sul 15q+ e *RARα/PML* sul 17q-. La t(15;17) è peculiare della LPA e non è mai stata riportata in altre neoplasie eccetto la l. mieloide cronica in trasformazione blastica promielocitica. Segnalazioni occasionali di t(15;17) con trascritti di fusione *PML/RARα* in casi di LMA morfologicamente non assimilabili a LPA, ma piuttosto a M1, sono verosimilmente casi di LPA M3v non correttamente valutati. Anche nei casi di LPA con cariotipo apparentemente normale è talora possibile dimostrare la presenza di riarrangiamenti di *PML* e *RARα* e di traslocazioni submicroscopiche individuabili con la tecnica di ibridazione *in situ* (FISH). Si ritiene pertanto che la predetta lesione molecolare riguardi pressoché il 100% dei casi di M3 e che questo evento costituisca il migliore esempio di una stretta correlazione tra un'alterazione genetica ed un tipo specifico di LMA.

Del tutto recentemente sono stati dimostrati nella LPA anche altri tipi di traslocazione cromosomica: a) t(11;17), in cui il *breakpoint* sul cromosoma 17 è sempre a livello del gene che codifica per *RARα*, mentre il gene coinvolto sul cromosoma 11, denominato *PLZF* (*promyelocytic leukemia zinc finger*), ha una certa somiglianza con il gene *PML*; b) più raramente si osserva la t(5;17) 'variante': in questo caso il gene *RARα* è fuso ad un gene, *NPM*, che codifica per una fosoproteina nucleolare coinvolta nel processamento dell'RNA; c) rare sono -8 e t(1;16).

Poiché in ognuna di tali varianti citogenetiche è presente il riarrangiamento del gene *RARα*, si può ipotizzare che sia questo l'evento determinante che porta al fenotipo LPA, ma è possibile che nella patogenesi della malattia un ruolo non secondario spetti anche alle alterazioni dei geni *PML*, *PLZF*, *NPM* (Grignani *et al.*, 1994). Entrambi i geni di fusione originati dalla t(15;17) formano mRNA ibridi. Sembra che la proteina sintetizzata dal messaggero chimerico *PML/RARα* si comporti come proteina multifunzionale atta ad interferire con le vie di attivazione endogena di



Fig. 1. Regioni del gene *RARα* sul cromosoma 17. (Secondo Warrell *et al.*, 1993).

PML, di *RARα* e di altri membri della famiglia dei recettori nucleari, come quelli per l'ormone tiroideo e per la vitamina D. Per meglio comprendere il ruolo fisiopatologico della proteina codificata da *PML/RARα* è opportuno accennare a quanto è noto circa la funzione fisiologica esplicata singolarmente da *RARα* e da *PML*.

Attività funzionali di *RARα* e *PML* e del gene ibrido *PML/RARα*.

1) I recettori degli ormoni steroidei e in particolare dell'acido retinoico (AR) comprendono numerose famiglie di molecole *RARα*, *RARβ* e a *RARγ*. Esiste poi una famiglia separata di recettori dell'acido retinoico (*recettori X*), comprendente *RXRα*, *RXRβ* e *RXRγ*. Il gene *RARα* sul cromosoma 17 appare organizzato funzionalmente in 6 regioni (*domains A-F*) (fig. 1).

Il dominio di legame con il DNA è costituito da due *zinc fingers* che corrispondono alla regione C; quello con il ligando corrisponde alla regione E. Le regioni D ed E contengono rispettivamente i domini per la dimerizzazione e la localizzazione nucleare, mentre le regioni A e B hanno funzioni di attivazione trascrizionale.

I ruoli specifici dei vari recettori dell'acido retinoico *in vivo* non sono stati ancora del tutto chiariti. I recettori *RAR* (α , β e γ) mostrano differente affinità per i vari retinoidi. L'acido all-trans retinoico (*ATRA*: *All-Trans-Retinoic Acid*), metabolita della vitamina A, si lega con elevatissima affinità a questi recettori e del pari elevata affinità possiedono l'acido 3,4-dideidro trans retinoico e il 9cis retinoico, mentre gli altri retinoidi hanno bassa affinità. I vari recettori X per i retinoidi (*RXR*) legano i differenti derivati dell'acido retinoico (AR) con la stessa affinità dei *RAR*, eccetto l'*ATRA*, la cui affinità per i recettori X è bassa.

Una volta instaurato il legame tra ligando e recettore (sia esso *RAR* o *RXR*) si ha l'interazione con elementi in cis (responsivi all'acido retinoico, *ERAR*) situati a livello della regione *promoter* dei diversi geni *target* di AR. Tale alta affinità di legame tra i vari *RAR* e gli *ERAR* si palesa solo in presenza di *RXR*. In condizioni fisiologiche, *in vivo*, il legame preferenziale con *ERAR* è proprio dell'eterodimero *RAR/RXR*.

Quanto alle funzioni fisiologiche esplicate dall'acido retinoico con la mediazione del legame con *RARα*, sembra che sia fondamentale quella di presiedere all'ordinata differenziazione embrionale e mieloide attraverso regolazione di geni specifici.

2) Le informazioni su *PML* sono limitate al *pattern* di espressione, alla sua sequenza primaria e alle omologie con altre proteine simili a funzione nota. Il locus genico di *PML* comprende 9 esoni la cui espressione è caratterizzata da un'estrema complessità (si sono finora isolate 13 isoforme). Il trascritto primario può essere alternativamente assemblato in 13 trascritti separati, che codificano per un uguale numero di isoforme di *PML*. Il processo di maturazione del trascritto primario include l'assemblaggio variabile dei vari esoni o di parte degli stessi.

L'organizzazione di *PML* è stata ricostruita sulla base delle analogie con altre proteine omologhe (fig. 2).

La regione N terminale di *PML* contiene 3 *clusters* ricchi di residui di istidina e cisteina presenti in tutte le isoforme di



Fig. 2. Schema della organizzazione del gene *PML*.

LEUCEMIE

PML/RAR α . Il primo *cluster* (RING) corrisponde a nuova *zinc finger*, che definisce una famiglia di proteine riconosciuta recentemente, la cui funzione è costituita principalmente dal legame con il DNA. Queste proteine *zinc finger* hanno molteplici funzioni, in particolare nel regolare lo sviluppo, l'espressione genica, la riparazione del DNA danneggiato da ultravioletti ed infine i riarrangiamenti genici. I geni RING oltre che nella LPA sono implicati nell'oncogenesi di altre neoplasie umane (ad esempio di taluni linfomi maligni). Un gruppo di geni RING contiene regioni ricche di residui di cisteina ed istidina, denominate B (*box*), che corrispondono a domini aggiuntivi di *zinc finger* putative.

La regione C terminale di PML può dare origine a multiple α -eliche: una parte di queste eliche potenzialmente può assumere una configurazione ad elica superavvolta con 4 *clusters* di gruppi di sette sequenze ripetute con aminoacidi idrofobici in I, IV e VIII posizione. Analoghe sequenze ripetute sono state trovate nei domini leganti i ligandi degli ormoni tiroidei, di RAR e del recettore della vitamina D. La porzione C terminale dell' α -elica è una regione ricca di serina e prolina; contiene sequenze ripetute X-S-P-X identificate come le minime sequenze riconoscibili della serina/treonina chinasi e di una caseina chinasi II (CKII).

3) La proteina chimera PML/RAR α è parte di un complesso multinucleare di 600-1200 kd. *In vitro* la proteina chimera dimezzizza con sé stessa, con PML e RXR.

La localizzazione nucleare della proteina ibrida codificata dal gene di fusione PML/RAR α differisce da quella delle singole proteine codificate da PML e da RAR α . La proteina ibrida ha una distribuzione micromaculare a livello nucleare, quella di PML ha una distribuzione a chiazze, RAR α è invece finemente dispersa. Il trattamento con AR ad alte dosi nella LPA trasforma la distribuzione micromaculare di PML/RAR α in una a chiazze (Daniel *et al.*, 1993). In presenza di dosi fisiologiche di acido retinoico, PML/RAR α si comporterebbe come un oncogene ad azione dominante negativa, reprimendo la trascrizione di alcuni geni bersaglio dell'acido retinoico indotta dalla proteina RAR α normale; inibirebbe pertanto il differenziamento mieloidi. Tale blocco può essere superato da dosi elevate di AR.

Terapia

La LPA, lasciata a sé, presenta elevata mortalità già fin dall'esordio, per l'alta frequenza di precoci accidenti emorragici soprattutto cerebrali e per le frequenti complicanze infettive.

L'ATRA (*All-Trans-Retinoic Acid*) è un farmaco di sicura efficacia, capace di indurre la maturazione dei promielociti leucemici della LPA e di esplicare pure altri interessanti effetti sul quadro leucemico (Warrell *et al.*, 1991).

La dose generalmente impiegata è di 45 mg/m²/die per os, refratta in due volte e somministrata fino al raggiungimento di RC o per un periodo massimo di 90 giorni (Tallman *et al.*, 1997).

L'ATRA è gravato da alcuni *effetti indesiderati*: cefalea; secchezza della cute, glossite e cheilite angolare (corrette dalla contemporanea somministrazione di vitamina F); lieve epatomegalia, ipertransaminasemia. È da segnalare pure il notevole e precoce (dopo 3-7 giorni di terapia) incremento nel sangue periferico dei leucociti neoplastici, in initialissimo differenziamento (Avvisati *et al.*, 1992). Il fenomeno viene osservato nel 50-60% dei pazienti dei paesi occidentali e solo raramente in estremo oriente. La sua patogenesi non è nota: è verosimile che si abbia una massiva mobilitazione delle cellule leucemiche dal midollo alla periferia. Si ipotizza che l'ATRA promuova l'espressione di molecole di adesione (soprattutto CD11 e CD18), che consentirebbero il legame dei promielociti all'endotelio fenestrato del midollo con massiccia immissione in circolo di cellule in iniziale via di differenziamento (Hynes, 1992). Nella maggior parte dei pazienti trattati con ATRA in recidiva, si ottiene invece la remissione con completa differenziazione terminale senza provocare leucocitosi.

I promielociti indotti alla differenziazione dall'ATRA sono cellule notevolmente attivate, capaci di elevato potere battericida, di chemiotassi e di esaltazione di tutte le funzioni enzimatiche. Se da un lato questo rappresenta un tutto positivo per quanto attiene alla citotossicità antitumorale, d'altro lato l'elevato numero di cellule circolanti con sovraespressione di molecole di adesione e con potente attivazione enzimatica e aumentata produzione di citochine in-

fiammatorie (IL-1, TNF, IL-6) possono provocare danni vasali. Quando questi fenomeni assumono rilevanza clinica (26% dei casi), ha luogo la cosiddetta *sindrome da ATRA*, responsabile di elevata mortalità per l'insorgenza di insufficienza respiratoria con le caratteristiche dell'ARDS (*Adult Respiratory Distress Syndrome*) nonché di edema diffuso, ipotensione e collasso cardiocircolatorio. Il trattamento della sindrome da ATRA con desametasone alla dose di 20 mg ogni 12 h per 4 giorni risulta spesso efficace. Talvolta si osserva un fenomeno più lieve caratterizzato da «*leak capillary syndrome*» localizzata (Frankel *et al.*, 1992; Vosburgh *et al.*, 1992).

Numerosissimi sono poi altri effetti dell'ATRA, per lo più del tutto positivi.

1) L'ATRA è anzitutto in grado di determinare *iperproduzione di GM-CSF e G-CSF*: ciò potrebbe spiegare la breve durata del periodo di aplasia nei pazienti trattati con l'associazione chemioterapia ATRA.

2) In secondo luogo, importantissimo è l'effetto dell'ATRA sui *disordini della coagulazione*: in 48-72 ore scompaiono i segni clinici e laboratoristici della CID. A questo proposito si può ricordare che l'ATRA regola il gene dell'annexina VIII che è situato sul cromosoma 10 e codifica per una sostanza ad azione anticoagulante. Tale gene è superespresso nella LPA, mentre lo è poco nelle altre leucemie. Il trattamento con ATRA determina una significativa riduzione dell'espressione di questo gene già dopo 8 ore dalla sua somministrazione (Kung-Sang *et al.*, 1992).

3) Un ulteriore fenomeno rilevante dell'ATRA è il *potenziamento della chemiosensibilità*. Associando ATRA e chemioterapia citostatica si ottiene la remissione completa in una percentuale di casi prossima al 90-95%, mentre è noto che la frequenza di RC raggiungibili nella LANL con la chemioterapia convenzionale è del 65-80%. Poiché la LPA non presenta in genere resistenza primaria ai chemioterapici, si può pensare che già il ridurre le complicanze letali precoci consente di aumentare la percentuale di remissioni durante la fase d'induzione. Tuttavia si può pure ipotizzare che l'ATRA faciliti il raggiungimento della RC riducendo l'espressione della proteina bcl-2. Invero la persistenza di elevati livelli di bcl-2 ha in genere significato prognostico negativo (Park *et al.*, 1994).

Non completamente spiegabile permane il fenomeno della *resistenza all'ATRA* (Warrell, 1993): vi è una *resistenza geneticamente determinata*, come nei casi di t(5;17) qualora la rottura di PML avvenga a livello dell'esone 6 (*bcr 2*), nonché nei casi di LPA con t(11;17); ed è pure nota una *resistenza acquisita*, dovuta ad aumento dell'espressione del recettore per l'ATRA che vanificherebbe il ruolo dell'ATRA somministrato in quanto ne verrebbe ridotta la concentrazione plasmatica (riduzione del 50% circa dopo 2-6 settimane e dell'80-90% dopo 9 mesi di terapia). Tale evento potrebbe essere attribuito ad una eccessiva metabolizzazione dell'ATRA operata dal citocromo P450 oppure a riduzione del suo assorbimento a livello intestinale. A tale proposito potrebbero dimostrarsi utili gli inibitori del citocromo P450 (cimetidina).

In conclusione possiamo affermare che l'ATRA ha un ruolo rilevante nell'indurre la RC nella LPA, con bassa incidenza di rischi letali. Tuttavia l'*eradicazione totale e permanente del clone neoplastico non viene raggiunta con la sola terapia a base di ATRA*, che nella maggior parte dei casi dev'essere abbinata a CT.

La strategia terapeutica prospettabile nella LPA prevede l'impiego dell'ATRA da solo qualora i leucociti all'esordio siano inferiori a $5 \times 10^9/L$, ma se questi superano valori di $10 \times 10^9/L$ è opportuno somministrare *idroxiurea* prima di iniziare la terapia con ATRA. Comunque l'associazione di ATRA con una chemioterapia convenzionale è necessaria se i leucociti in quinta giornata superano i $5 \times 10^9/L$ o se in decima giornata sono più di $10 \times 10^9/L$ o infine se dopo 15 giorni di terapia con ATRA i leucociti fossero superiori a $15 \times 10^9/L$. La chemioterapia convenzionale nella LPA può essere costituita da sola *daunomicina* (45 mg/m²/die in bolo e.v., per tre giorni) o da sola *idarubicina* (14 mg/m² e.v. per 3 giorni) o da *idarubicina associata a citosina arabinoside* a

dosi convenzionali o intermedie (idarubicina 12 mg/m²/die per 3-4 giorni; ARA-C 120 mg/m² infusione di 1 ora ogni 12 h per 7 giorni, oppure ARA-C 100-200 mg/m²/die in infusione continua per 7 giorni).

Una volta ottenuta la remissione completa con terapia d'induzione combinata ATRA + CT (> 80% dei casi) si dovrà proseguire con un programma terapeutico d'intensificazione, che sarà diverso a seconda dell'età del paziente e della possibilità di avere un donatore consanguineo istocompatibile.

I pazienti con età inferiore ai 45 anni e con un donatore compatibile, una volta raggiunta la remissione completa, possono essere avviati ad una terapia sopramassimale seguita da trapianto midollare allogenico, con una probabilità di DFS anche del 50% a 5 anni.

I pazienti di età inferiore ai 55-60 anni, senza donatore compatibile, potranno essere sottoposti dopo il raggiungimento di CR, a due o più cicli di consolidamento con chemioterapici, impiegando eventualmente HDAC (v. oltre) da sola o associata a daunomicina. I risultati sono buoni: 67% di sopravvivenza totale (OS) a 3 anni (Tallmann *et al.*, 1997). È stato attuato pure il trapianto midollare autologo dopo uno o più cicli di consolidamento con ATRA e CT (Meloni *et al.*, 1997). L'autotrapianto o la reinfusione di cellule staminali, PCR negative, da sangue periferico in prima remissione completa, consentono una sopravvivenza a 5 anni nel 50-60% dei casi.

Al trattamento con HDAC (Ara-C 3 g/m² ogni 12 h per 3 giorni ogni mese, per 4 cicli) consegue una percentuale di remissioni nell'ordine di quelle ottenibili con l'autotrapianto di midollo osseo o di cellule staminali periferiche. Promettenti risultati vengono segnalati da Asou *et al.* (1998) con l'impiego di ATRA, daunomicina e behenoylcitarabina (BHAC) sia in fase di induzione che di mantenimento.

Comunque si proceda, circa il 30% dei pazienti affetti da LPA muore a seguito della l., per mancato ottenimento della RC o per recidiva o per complicanze emorragiche o infettive. Interessanti favorevoli risultati preliminari sono stati tuttavia di recente ottenuti con l'impiego di triossido di arsenico (As₂O₃), che induce apoptosi nei blasti leucemici (Shen *et al.*, 1997).

Bibliografia

- Asou N., Adachi N. A., Tamura J. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1998, **16**, 78.
 Avisati G., Tencate J. W., Mandelli F., *Br. J. Haematol.*, 1992, **81**, 315.
 Biondi A., Rambaldi A., Pandolfi P. P. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 492.
 Castoldi G. L., Cuneo A., *Bull. Haematol.*, 1996, **9**, 19.
 Castoldi G. L., Liso V., Specchia G., Tomasi P., *Leukemia*, 1994, **8**, 1441.
 Daniel M. T., Koken M., Romagne O. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 1858.
 Frankel S. R., Eardley A., Lauwers G. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1992, **117**, 292.
 Grignani F., Aversa F., Donti E. *et al.*, *Atti 96° Congr. Soc. It. Med. Int.*, 1995, **1**, 249.
 Grignani F., Fagioli M., Alcalay M. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 10.
 Hynes R. O., *Cell*, 1992, **69**, 11.
 Kun-Sang C., Gang W., Freireich E. J. *et al.*, *Blood*, 1992, **79**, 1802.
 Mandelli F., Diverio D., Avisati G. *et al.*, *Blood*, 1997, **90**, 1014.
 Meloni G., Diverio D., Vignetti M. *et al.*, *Blood*, 1997, **90**, 1321.
 Park J. R., Robertson K., Hickstein D. D. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 440.
 Rowley J. B., Golomb H. M., Dougherty C., *Lancet*, 1977, **1**, 549.
 Shen Z. X., Chen G. Q., Ni J. H. *et al.*, *Blood*, 1997, **89**, 3354.
 Tallman M. S., Andersen J. W., Schiffer Ch. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 1021.
 Tallman M. S., Hakimian D., Snower D. *et al.*, *Leukemia*, 1993, **7**, 521.
 Vosburgh E., *Leukemia*, 1992, **6**, 608.
 Warrell R. P., *Blood*, 1993, **82**, 1949.
 Warrell R. P., de Thè H. D., Wang Z. Y., Degos L., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 177.
 Warrel R. P., Frankel S. R., Miller W. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 1385.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

Epidemiologia

Indagini condotte nell'ultimo quinquennio hanno ulteriormente precisato la frequenza della leucemia linfoblastica acuta (LLA) (negli U.S.A. circa 5000 casi/anno), con il noto andamento bimodale in rapporto all'età (picco iniziale a 3-5 anni, secondo picco dopo i 50 anni), la maggiore incidenza (2/3 dell'intera casistica) in età infantile (4,4/100.000 bambini), la modesta prevalenza nei maschi rispetto alle femmine in tutte le età (Taylor *et al.*, 1992). Studi recenti confermano la diversa frequenza di sottogruppi immunofenotipici di LLA nell'adulto rispetto all'età infantile: LLA pre-B nell'adulto 68% vs. 85% nell'infanzia, LLA-T 24% vs. 12%, maggiore frequenza nell'adulto di pre-pre-B LLA, di pre-T LLA e di LLA con marcatori addizionali mieloidi (Hoelzer, 1994).

Si tende attualmente ad azzerare, almeno negli U.S.A., il peso del fattore razziale, giacché la prevalenza di LLA tra la popolazione bianca in confronto alla negra, un tempo significativa, attualmente appare quasi nulla (Lukens, 1992). È stata del pari ribadita l'importanza etiologica di fattori genetici, con il rilievo di famiglie con numerosi casi di LLA, di alto rischio di malattia in gemelli identici, di elevata incidenza di leucemie acute in portatori di sindrome di Down.

Tra i fattori etiologici e di rischio (età superiore ai 35 anni della madre specie se con precedenti ripetuti aborti, appartenenza a classi di livello socioeconomico elevato, esposizione al benzene o alle radiazioni ionizzanti di ogni natura e provenienza) si è ritenuto recentemente di poter inserire anche l'esposizione prolungata a campi elettromagnetici (Feychting e Ahlborn, 1993). Non appare convincente il tentativo di interpretare il non frequente evento del clustering della l. con un ipotetico fattore infettivo (Greaves e Alexander, 1993).

Clonalità

La natura clonale del processo leucemico in LLA ha trovato conferme recenti nel reperto nei linfoblasti di un identico tipo di riarrangiamento dei geni codificanti per le immunoglobuline (presenti nella linea B) o per il T cell receptor (TCR) (presenti nella linea T). L'assegnazione dei linfoblasti alla linea linfoide B o alla T in base alla presenza dell'uno o dell'altro di questi riarrangiamenti deve essere tuttavia sempre prospettata con cautela (e verificata in base ad altri criteri) non essendo assoluta la specificità dell'evento: nel 10-20% dei casi di LLA-B si può infatti osservare riarrangiamento del gene TCR β e ancora più spesso quello dei TCR γ o δ ; altrettante LLA-T possono presentare riarrangiamento dei geni Ig. Vi sono inoltre casi di LMA immature con riarrangiamento di geni Ig o TCR (cross-lineage rearrangements). Ad ogni modo il riarrangiamento dei geni codificanti per le catene immunoglobuliniche leggere sembra più specifico della linea B che non il riarrangiamento dei geni per le catene pesanti (Hanson *et al.*, 1990).

Immunofenotipo

Per la determinazione dell'immunofenotipo ai fini della diagnosi routinaria di LLA, è in genere sufficiente disporre di un pannel ristretto di marcatori: CD3, CD7, CD19, CD10, CD22, c μ , TdT. La positività nucleare per il TdT viene considerata indice di immaturità cellulare e non di appartenenza alla linea linfoide, essendo il TdT espresso, oltre che in tutti i sottogruppi di LLA (tranne che in L3), anche nel 10-20% di LMA. Pure la diagnosi differenziale citologica tra LLA e talune LMA, ove non superabili su base morfologica, con le reazioni citochimiche e con i predetti marca-

tori (la cui positività è probante per LLA), si avvale del sussidio di un numero limitato di AcMo: anti-MPO, CD13, CD33, CD14, Cdw65, CD117 (che danno risposta positiva nei sottogruppi M0-M5) e CD61 (espresso nella forma megacarioblastica M7).

In sintesi, le *LLA-T* vengono definite dalla costante espressione di CD3 (quasi sempre solo in sede citoplasmatica, cCD3) e dalla positività di CD7 di membrana (tenendo presente che sia pur raramente un reperto positivo può essere rinvenuto anche in LMA immature M0-M1 TdT+). Importanti sono pure i reperti ottenibili con anti-TCR $\alpha\beta$ e anti-TCR $\gamma\delta$. Meno costanti ma non senza valore sono i reperti in LLA-T di altri antigeni T-associati (CD5, CD2, CD1a, mCD3) e della coespressione di CD4 e CD8 (osservabile in meno del 20% dei casi). Reperti diagnostici accessori sono considerati la positività nucleare per TdT e l'assenza di CD19 e di altri antigeni B-associati. Evento insolito nelle LLA-T è la positività di CD10, rinvenibile talora in forme T immature (pre-T-LLA) assieme a positività per CD2.

Più articolati sono i reperti nell'ambito delle *LLA-B*. Specifica per questo gruppo è la positività per CD19.

Le LLA *pre-pre-B* (LLA «null», *early pre-B-ALL*) sono caratterizzate da costante positività del TdT (95%) e da negatività degli altri marcatori linfoidi (tranne rare positività di CD10 e talora di CD19). La mancata espressione di CD10 è associata a pseudodiploidia, elevata leucocitosi, cattiva prognosi. Nel 15-20% dei casi si osserva mutazione di *N-ras*, nel 10% coinvolgimento di *p53*.

La positività di CD10 (*common ALL antigen, cALLA*) identifica, con qualche eccezione, le LLA *common (pre-B)*, in una parte delle quali (circa 20%) si osserva anche presenza intracitoplasmatica di catene Ig pesanti μ (cp). L'esame citologico e citogenetico mostra spesso pseudodiploidia, raramente iperdiploidia, e frequentemente associazione con t(1;19)(q23;p13) che comporta coinvolgimento dei geni *E2A* (sul cromosoma 19) e *PBX1* (sul cromosoma 1), con un trascritto di fusione e relativa proteina chimerica: tali eventi non sono presenti nella LLA «null» (Pui *et al.*, 1994).

Le LLA-B a cellule mature (L3) mostrano CD19+, CD10-, TdT negativo, presenza di catene leggere κ o λ citoplasmatiche o di superficie. Frequente è il reperto di riarrangiamento del gene *c-myc* e di inattivazione di *p53*, come nel linfoma di Burkitt.

È ulteriormente comprovato che il 5-10% di LLA dell'infanzia e il 30% dei casi nell'adulto coesprimono antigeni linfoidi e mieloidi (*forme bifenotipiche*). In tali casi oltre ai marcatori specifici delle LLA vengono espressi anche quelli mieloidi CD13, CD14, CD33, Cdw65 (Drexler *et al.*, 1991). Per le LLA Ph⁺ positive, v. sotto. È interessante che mentre con le usuali tecniche citochimiche i linfoblasti leucemici forniscono sempre reperti negativi per la mieloperossidasi (che danno esito tipicamente positivo nelle forme mieloidi, assieme al Sudan nero B e alla cloracetato esterasi), in un ristretto numero di casi di LLA i linfoblasti esprimono positività per la mieloperossidasi evidenziabile solo in microscopia elettronica (Prete *et al.*, 1994a). Non è chiaro se sia in giuoco la trasformazione leucemica di una cellula staminale pluripotente oppure un progenitore non ancora identificato che coesprime marcatori e aspetti metabolici di linee cellulari diverse (Cortes e Kantarjian, 1995).

Esistono pure casi con commistione di blasti di derivazione linfoide e di blasti di derivazione mieloidi (*leucemie acute miste*). Per una corretta diagnosi di leucemia di linea mista è necessario riscontrare positività di almeno due marcatori probanti per ciascuna linea (Pui *et al.*, 1991).

Le L. bifenotipiche e miste hanno tutte prognosi particolarmente sfavorevole, sia nell'età infantile che nell'adulto.

Nella diagnostica immunofenotipica della LA bisogna infine ben valutare il significato biologico di alcuni marcatori non linea-dipendenti, assai spesso impiegati. Tali il CD34, marcatore di cellule staminali pluripotenti assai precoci ed espresso per lo più in LLA «null». È rinvenibile però anche nel 75% di LLA pre-B dell'età infantile. L'espressione di CD34 e CD38 vien reperita nel 20% di cellule mieloidi normali, in plasmacellule attivate e in cellule linfoidi. L'espressione di CD34 è abituale di LLA sia di linea T che B. Un altro marcatore di attivazione, CD71 è più frequentemente reperito in LLA B-cellulari che nelle B-cellulari. Per l'espres-

sione della glicoproteina P170 associata alla resistenza plurifarmacologica (MDR: *Mult Drug Resistance*), v. sotto.

In definitiva, non sono stati reperiti corredi immunofenotipici del tutto leucemia-specifici né esistono marcatori assolutamente linea-specifici. I corredi antigenici presentati dai linfoblasti leucemici non differiscono sostanzialmente da quelli delle cellule normali da cui traggono origine, ma appaiono espressi spesso in modo asincrono e in eccesso o in difetto, mentre nelle cellule normali essi figurano ordinatamente espressi nelle diverse fasi differenziative-maturative. I casi di *lineage promiscuity* e di *lineage infidelity* in LA sono pertanto ascrivibili soprattutto ad un disordine nell'espressione antigenica insito nel processo leucemico.

Citogenetica e biologia molecolare

In confronto a quanto si osserva nelle LLA dell'età infantile, le alterazioni quantitative dei cromosomi (iper- o ipoploidie) sono nell'adulto meno frequenti (figurano probabilmente in meno del 20% dei casi) e sembrano avere minore peso prognostico. Nell'adulto le forme pseudo-diploidi offrono una prognosi relativamente peggiore delle forme diploidi.

Particolarmente importanti sono alcune anomalie qualitative dei cromosomi.

È noto (Thangavelu *et al.*, 1990) che traslocazioni t(8;14)(q24;q32) o t(8;22)(q24;q11) o t(8;2)(q24;p12) sono presenti nella maggior parte dei casi di LLA-B a cellule mature *Burkitt-like* (L3), analogamente a quanto si riscontra nel linfoma di Burkitt. In rari casi la t(8;14) è stata reperita anche in LLA-B non di tipo L3: eccezionalmente è associata a monosomia 7 e a marcatori mieloidi (Pedrazzini *et al.*, 1995). In tutte le predette traslocazioni il proto-oncogene *c-myc* (presente nella banda 24 del braccio lungo del cromosoma 8) viene giustapposto ad un locus immunoglobulinico, più spesso in sede 14q32 (che interessa le catene pesanti), ma talora in 2p12 (locus delle catene leggere κ) o in 22q11 (locus λ) (Cortes e Kantarjian, 1995). Ne consegue in ogni caso una eccessiva espressione di *c-myc* che interagisce con altre proteine (MAX, MAZ) e si lega a DNA (Blackwood *et al.*, 1991): si suppone che questo evento induca in qualche modo la leucemogenesi. Il carattere predittivo sfavorevole della t(8;14) ha perso il suo peso prognostico dopo i successi che possono essere attualmente conseguiti con la chemioterapia sia nella LLA-B di tipo L3 che nel linfoma di Burkitt.

Nelle altre forme di LLA si possono osservare traslocazioni di tipo diverso.

La t(4;11)(q21;q23) è presente nell'adulto in meno del 5% di LLA *de novo* mentre è più frequente in LLA dell'età infantile: la traslocazione coinvolge il gene denominato *MLL* o *AML-1*. Questa traslocazione è frequente nelle leucemie acute secondarie che per altro sono per lo più di tipo mieloidi (v. sotto).

La t(1;19)(q23;p13) è presente in una bassa percentuale di LLA dell'adulto. L'evento provoca la fusione del proto-oncogene *E2A* (sito in 19p13, il cui prodotto è una proteina stimolante la sintesi di Ig) con il gene *PBX1*, sito in 1q23, il cui prodotto è una proteina che si lega al DNA ed è probabilmente un fattore di trascrizione (Pui *et al.*, 1994): ne risulta l'espressione in cellule pre-B del gene *PBX1* normalmente non espresso da queste cellule. Clinicamente questi casi sono caratterizzati da elevata leucocitosi, spiccata concentrazione di LDH e spesso da prognosi sfavorevole.

La t(14;18)(q32;p21) è spesso associata a linfomi follicolari a cellule B, ma può essere presente anche in LLA *de novo*, seppur con frequenza minore (Kramer *et al.*, 1991). Questa traslocazione porta alla giustapposizione del gene *bcl-2* in vicinanza degli *enhancer* delle IgH e alla formazione di un gene chimerico *bcl-2 IgH*: ne derivano sovraespressione di *bcl-2* e sopravvivenza cellulare prolungata. Le attività di *bcl-2* e della proteina traslata possono essere indirettamente valutate dalla concentrazione del mRNA mediante RT-PCR. La quantità di tale mRNA è spiccatamente più elevata in cellule di linea LLA sopravvissute in colture presentanti la t(14;18) che non in quelle prive della traslocazione ed è più elevata in cellule di LLA primaria di tipo pre-B prive di traslocazioni che non

nel tipo a cellule meno mature e dei pari senza traslocazioni (Quattrone *et al.*, 1995). Tale evento potrebbe contribuire alla prognosi più sfavorevole che si osserva tra le LLA derivate da cellule più mature rispetto alle LLA a cellule «null» («early B cell ALL»).

Un ultimo gruppo di traslocazioni, quali t(11;14)(p13;q11) e t(11;14)(p15;q11), riguarda LLA a cellule T e coinvolge geni *TCR- α/δ* e β . Tali traslocazioni concernono un numero limitato di casi, per lo più LLA-T dell'età infantile, e portano alla fusione del gene *TCR α/δ* con il gene *Tig-2* (*rhombotin-2*) nel caso di t(11;14)(p13;q11) ed invece quella del gene *TCR β* con il gene *Tig-1* (*rhombotin 1*) nel caso di t(11;14)(p15;q11). *Tig-1* e *Tig-2* sono geni codificanti per proteine ricche di cisteina: per effetto della traslocazione verrebbero turbati fenomeni trascrizionali che ad essi sono devoluti (Ribeiro *et al.*, 1991). Non se ne conosce compiutamente l'importanza ai fini della fenomenologia clinica e della prognosi.

La traslocazione t(9;22)(q34;q11) che caratterizza il cromosoma Philadelphia (*Ph*¹) costantemente presente nella leucemia mieloide cronica di tipo classico (LMC), viene reperita pure nel 15-30% dei casi di LLA dell'adulto (e la frequenza supera il 44% se si considerano solo i pazienti di età superiore ai 50 anni) mentre figura in meno del 5% di LLA dell'età infantile. L'analisi molecolare ha però accertato che le anomalie correlate al *Ph*¹ (riarrangiamento dei geni *bcr-abl*) si rinvengono con frequenza anche maggiore: più del 30% tra le LLA non T dell'adulto, 55% tra le LLA di tipo «common». Le LLA *Ph*¹ positive dell'adulto sono in genere associate ad età avanzata, elevata leucocitosi, morfologia L2, fenotipo «null» o «common», maggior frequenza di espressione di CD10 e di CD34.

I pazienti con LLA *Ph*¹ positiva (LLA^{My}) più difficilmente vanno incontro a RC (remissione completa) dopo chemioterapia (60% dei casi) e la RC risulta altresì di breve durata (5-10 mesi); la sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 3-5 anni varia a seconda delle casistiche, tra lo 0-15% dei casi. Non infrequente, almeno nell'età infantile, è l'associazione al *Ph*¹ di altre anomalie cromosomiche e in specie della trisomia 7 (Preti *et al.*, 1994b).

È stato ampiamente confermato che le LLA *Ph*¹ positive sono eterogenee sotto il profilo molecolare e che accanto a casi del tutto sovrapponibili ai reperti propri della LMC ve ne sono altri (che assommano al 50-80% di tutti i casi di LLA *Ph*¹ positivi) in cui il *breakpoint* in 22q11 cade tra gli esoni B1 e B2 della *major breakpoint cluster region* (*M-bcr*) invece che tra B2 e B3 o tra B3 e B4 come nella LMC: ne derivano un mRNA di 7 kb (invece che di 8 kb) ed una proteina chimerica di 190 kd (p190). Si suppone che almeno in una parte del restante 20-50% dei casi di LLA *Ph*¹ positivi che esprimono il classico traslato p210, sia in atto una forma precoce di trasformazione blastica linfocitica in LMC clinicamente asintomatica e non riconosciuta (Kantarjian *et al.*, 1991).

Patogenesi della soppressione della normomielopoiesi nella leucemia linfoblastica acuta (LLA)

Un evento patogenetico non ancora chiarito riguarda la soppressione più o meno grave della normale emocitopoiesi che si riscontra in tutti i casi di LA, sia nelle forme con spiccata leucocitosi periferica e larga infiltrazione midollare che nelle leucemie paucicellulari o con presentazione simil-aplastica. Si invocano (Cortes e Kantarjian, 1995) la riduzione del compartimento staminale normale, la carenza di normali fattori di crescita emocitopoietica e soprattutto la produzione di citochine inibitrici da parte delle cellule leucemiche.

Terapia

Chemioterapia

La risposta alla chemioterapia (CT) d'induzione con protocolli terapeutici comprendenti, in vario dosaggio e in diversa combinazione e sequenza, farmaci antiblastici quali vincristina (VCR), prednisone, antracicline (adriamicina, daunomicina, idarubicina), ciclofosfamide (CTX), metotrexato (MTX), asparaginasi, è in complesso insoddisfacente nelle LLA dell'adulto, forme tutte ad alto rischio: benché la frequenza di RC possa toccare il 90%, la loro durata è in genere breve ed i casi a lunga sopravvivenza sono inconsueti. Per migliorare i risultati della CT, in

questi ultimi anni si sono impiegate alte dosi dei citostatici tradizionali (HDCT) oppure protocolli dianzi in uso solo nelle LMA.

La terapia d'induzione si può avvalere di alte dosi di citosina arabinoside (HDAC) (1-3 g/m² in cicli ripetuti anche 12 volte) ma né la frequenza di RC né la sua durata sembrano avvantaggiarsene. Alte dosi di CTX e VCR o una combinazione di adriamicina, etoposide, tenoposide, Ara-C, si sono rivelate eccessivamente lesive dell'apparato gastrointestinale. Cicli di TAD (tioguanina, Ara-C, doxorubicina) più VCR, prednisone, asparaginasi consentono il 91% di RC, però di durata media di soli 15 mesi, e sopravvivenza a 42 mesi nel 42% dei casi. Ara-C (3 g/m² per 5 dosi) più mitoxantrone (40-80 mg/m²) associati a VCR e prednisone consentono sopravvivenze di 18 mesi nel 41% dei casi. Nel complesso, quindi, risultati non particolarmente soddisfacenti (Hoelzer, 1994).

Migliori esiti si sono avuti con l'oculato impiego, dopo CT d'induzione, di cicli di consolidamento (includendo tenoposide, etoposide, MTX, m-amsacrina, mitoxantrone, idarubicina ed Ara-C in vario modo combinati) e con il ricorso a cicli di reinduzione 3 mesi dopo la RC, somministrando lo stesso protocollo seguito nella terapia d'induzione (ad es. VCR, desametasone, adriamicina, Ara-C, CTX, tioguanina). In alcuni studi la MRD (*median remission duration*) è stata di 24 mesi e la frequenza di lungo-sopravvivenza a 10 anni del 35%; in altri la DFS a 5 anni è stata del 42% in pazienti di età inferiore ai 50 anni. La HDAC associata ad altri citostatici (tra cui mitoxantrone), in casi refrattari o recidivanti dopo terapia convenzionale, non sembra fornire, in genere, buoni risultati. Lo stesso si può dire per le alte dosi di MTX o di etoposide.

Importante e necessaria nelle LLA dell'adulto è la terapia di mantenimento dopo aver ottenuto una buona RC in fase di induzione, ma non è ancora provato che una terapia di mantenimento arrechi vantaggi nei pazienti già sottoposti non solo ad adeguata terapia di induzione ma anche al consolidamento.

Indagini multicentriche in Europa e negli U.S.A. (ECOG, CALGB, SAKK, 1991), tendenti a privilegiare una intensa terapia d'induzione ed un consolidamento prolungato (HDAC per 3-18 mesi associata ad alte dosi di MTX) piuttosto che una chemioterapia di mantenimento lungamente protratta, hanno fatto registrare DFS a 2 anni del 18-35%; la sopravvivenza a 5 anni risultò tuttavia migliore nel braccio sottoposto a prolungata terapia di mantenimento (Schiffer *et al.*, 1991). È probabile che la terapia post-induzione debba essere aggiustata a seconda dei sottogruppi di pazienti a diverso rischio. La terapia di mantenimento con 6MP e MTX dà buoni risultati in bambini con rischio standard (LLA pre-B *Ph*¹*abl* negativi) mentre risultati deludenti si ottengono con qualsiasi presidio terapeutico nel caso di popolazioni leucemiche prive di fattori di vantaggio proliferativo.

La recidiva nel S.N.C. è una delle cause di fallimento della CT antileucemica. Nell'adulto la sua frequenza è nell'ordine del 21-50%. La profilassi meningeale di tipo standard nella LLA dell'età infantile consiste nella radioterapia cranica (24 Gy) e nella somministrazione intratecale di MTX: la frequenza di meningosi leucemiche si riduce al 10-15%. Più recentemente si è fatto ricorso anche ad una tripla combinazione intratecale di MTX, Ara-C, idrocortisone nonché alla somministrazione dei farmaci tramite un *Ommaya reservoir* intraventricolare, od anche, sia nella LLA dell'infanzia che dell'adulto, alla CT sistemica con dosi di MTX o Ara-C sufficientemente elevate per raggiungere nel liquor una ottimale concentrazione del farmaco (Morra *et al.*, 1986); il fine è di evitare la radioterapia (RT) craniale che può interferire nella pianificazione della irradiazione total

body spesso prevista per l'allograpianto midollare. Con tali presidi la frequenza di meningosi leucemica si riduce al 4-10%. Poiché l'esperienza ha insegnato che le sequele neuropsichiche dell'irradiazione cranica (apoplezia, riduzione delle capacità intellettive, demenza) sono nell'adulto minime, spesso subcliniche e svelabili solo con EEG e TC anche in casistiche con *follow-up* superiore ai 25 anni, la prassi più frequentemente seguita per la profilassi meningea nell'adulto è ancora oggi quella classica di RT + MTX (e/o Ara-C) intratecale: con il che la frequenza di recidiva nel S.N.C. entro tre anni si riduce dal 45 al 20% senza peraltro che ciò si traduca in una più lunga sopravvivenza. Studi recenti orientano però sull'opportunità di associare CT intratecale e CT sistemica ad alte dosi, senza ricorrere alla RT craniale. Nel caso di interessamento di nervi cranici è indicata l'irradiazione selettiva della base cranica (Cortes e Kantarjian *et al.*, 1995).

Molti sono i *fattori prognostici sfavorevoli* che influiscono sulla durata della remissione, sullo sviluppo della meningosi e sulla durata della sopravvivenza.

In età adulta particolare peso assumono il protratto raggiungimento della RC, l'immunofenotipo B maturo (incidono meno il T e il «null»), alcune anomalie citogenetiche, l'elevata concentrazione ematica di LDH, l'alto indice di proliferazione, lo spiccato grado d'infiltrazione midollare e l'elevata concentrazione di blasti nel sangue periferico, l'epatosplenomegalia rilevante, la presentazione bulky, la meningosi leucemica. Tali fattori prognostici sono per lo più trattamento-dipendenti, ma età, leucocitosi blastica, cariotipo t(9;22) e t(4;11), immunofenotipo «null» o pre-T o LLA/My incidono sfavorevolmente anche in caso di terapia intensiva. Pazienti presentanti tali parametri hanno un rischio di recidiva ad un anno del 50%, quelli che ne sono privi solo del 5%; i pazienti a rischio vanno pertanto trattati con terapia più aggressiva. Si tenga nota che la presenza nel liquor di soli 5 blasti/ μ L comporta rischio elevato di recidiva meningosica se il paziente non è trattato intensamente (Mahmoud *et al.*, 1993).

Si dovrà tenere presente che nelle LLA-T (20-25% dei pazienti adulti), specie se con massa mediastinica, risultano utili la combinazione di CTX e Ara-C (RC 80-85%, DFS prolungate 45-60%) o l'induzione con VCR, prednisone, daunomicina e asparaginasi (Schiffer *et al.*, 1992), in specie se seguita da irradiazione del mediastino.

Le LLA-B (L3) offrono in genere nell'adulto scarsi successi terapeutici (RC 44%, con durata media di 11 mesi e scarse sopravvivenze a lungo termine). L'applicazione di drastici protocolli derivati da quelli efficaci nell'età infantile (adriamicina, Ara-C, VCR, prednisone, daunorubicina, etoposide aggiunti a CTX e MTX ad alte dosi) sembrano consentire i risultati più soddisfacenti, con DFS superiori al 57% per tempi prolungati (Hoelzer *et al.*, 1992).

Le forme *bifenotipiche con marcatori mieloidi* (LLAMy) hanno nell'adulto prognosi infausta anche se si impiegano drastici protocolli chemioterapici in uso nelle LMA *de novo* e non tanto nei riguardi della frequenza di RC dopo induzione (che può toccare il 75%) quanto del mantenimento della remissione. Qualche successo nel consolidamento viene vantato con l'impiego di HDAC (3 g/m² per 8 dosi) associato a mitoxantrone, e con HDAC (3 g/m² per 6-8 dosi) più VCR, adriamicina e desametasone. Anche l'introduzione di IFN α nei protocolli di mantenimento post-RC non sempre apporta vantaggio.

Quale *terapia accessoria* alla CT risulta utile la somministrazione di G-CSF o di GM-CSF che accorciano il tempo di recupero dei granulociti neutrofili riducendo la frequenza di complicanze infettive e la durata degli intervalli tra i cicli di CT antileucemica dovuti a leucopenia.

Ancora *sub judice* è l'efficacia coadiuvante di IL-2, IL-4 e IL-7.

Trapianto midollare

Un'efficacia alternativa alla CT della LLA è l'allograpianto midollare (V MIDOLLO OSSEO**, trapianto)

Con l'allograpianto in prima o seconda remissione si ottengono (Hoelzer, 1994) sopravvivenze a 3 anni del 42%, il che rappresenta un risultato migliore di quello ottenibile con CT convenzionale (5-10% a 3 anni). Sembra utile stratificare i pazienti con LLA dell'adulto a seconda del grado di rischio: pazienti a basso rischio (in cui la CT può dare il 50% di sopravvivenza a 10 anni) non sembrano giovare del trapianto midollare in prima RC (DFS 22-60% a lungo termine), quelli ad alto rischio invece sì. Con la CT la probabilità di recidiva a 5 anni è del 59% e la probabilità di morte per terapia solo del 4%, mentre con il BMT allogenico i valori sono rispettivamente di 26 e 39%.

Meno felici esiti sembrano arridere al *trapianto autologo* specie per le difficoltà di raggiungere un efficace *purging* delle cellule leucemiche residue. Nel complesso i risultati non sono nell'immediato superiori a quelli raggiungibili con sola CT per quanto attiene alla RC, ma le recidive tardive sono meno frequenti nei casi sottoposti al trapianto midollare, per cui dopo il terzo anno di sopravvivenza si osserva nei pazienti sottoposti a trapianto midollare un plateau di sopravvivenza, che non appare dopo CT (Carella e Marmont, 1994). In pazienti adulti il *trapianto di cellule staminali*, ottenute da sangue periferico in fase di prima RC, sembra promettente (Carella *et al.*, 1992).

Bibliografia

- Blackwood E. M., Eisenman R. N., *Science*, 1991, **251**, 1211.
 Carella A. M., Marmont A. M., *Bailliere's Clin. Haematol.*, 1994, **7**, 403.
 Carella A. M., Pollicardo N., Carlier P. *et al.*, *Leuk. Lymph.*, 1992, **7**, 19.
 Drexler H. G., Thiel E., Ludwig W. D., *Leukemia*, 1991, **5**, 637.
 Cortes J. E., Kantarjian H. M., *Cancer*, 1995, **76**, 2393.
 Feychting M., Ahlborn A., *Am. J. Epidemiol.*, 1993, **138**, 467.
 Greaves M. F., Alexander F. E., *Leukemia*, 1993, **7**, 349.
 Hanson C. A., Thamilarsan M., Ross C. W. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990, **93**, 563.
 Hoelzer D., *Seminars in Hematology*, 1994, **31**, 1.
 Horowitz M. M., Messeter D., Hoelzer D. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1991, **115**, 13.
 Kantarjian H. M., Talpaz M., Dhingra K. *et al.*, *Blood*, 1991, **78**, 2411.
 Kramer M. H., Raghoelir S., Beverstock G. C. *et al.*, *Leukemia*, 1991, **5**, 473.
 Lukens J. N., *Acute lymphocytic leukemia*, in Lee G. R., Bithell T. C., Foerster J., Athens J. W., Lukens J. N. eds., *Wintrrobe's clinical hematology*, 1993, 9th ed., Lea & Febinger, Philadelphia, p. 1892.
 Mahmoud H. H., Rivera G. K., Hancock M. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 314.
 Mandelli F., Annino L., Vegna M. L. *et al.*, *Leukemia*, 1992, **6** (suppl. 2), 182.
 Morra E., Lazzarino M., Inverdadi D. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1986, **4**, 1207.
 Pedrazzini E., Goldstein S., Shilton G., Slavutsky I., *Haematologica*, 1995, **80**, 526.
 Preti H. A., O'Brien S., Giralt S. *et al.*, *Am. J. Med.*, 1994b, **97**, 60.
 Preti A., Kantarjian H. M., Estey E. *et al.*, *Hematol. Pathol.*, 1994a, **8**, 155.
 Pui C. H., Hancock M. L., Head D. R. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 2601.
 Pui C. H., Raimondi S. C., Head D. R. *et al.*, *Blood*, 1991, **78**, 1327.
 Ribeiro R. C., Raimond S. C., Behm F. G. *et al.*, *Blood*, 1991, **78**, 466.
 Quattrone A., Papuzzi L., Santini V. *et al.*, *Haematologica*, 1995, **80**, 495.
 Schiffer C. A., Larson R. A., Bloomfield C. D., for the CALGB, *Leukemia*, 1991, **5**, 196.
 Taylor P. R. A., Reid N. M., Bown N. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 1813.
 Thangavelu M., Olopede O., Beckman E. *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer*, 1990, **2**, 147.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LEUCEMIE ACUTE SECONDARIE

Generalità

Con il termine l. secondarie si indicano le l., in genere acute (LAs), che insorgono in soggetti già affetti da un'altra malattia neoplastica, nel corso di questa o dopo la sua guarigione.

gione e soprattutto se trattata con intensa e prolungata chemioterapia o con chemio- e radioterapia combinate. L'attuale progressivo aumento di frequenza delle LA è verosimilmente in rapporto con il prolungamento della sopravvivenza dei pazienti neoplastici ottenuto con gli odierni indirizzi terapeutici.

Il tempo che intercorre fra la terapia antineoplastica e l'insorgenza di LA, varia a seconda del chemioterapico impiegato. Nelle LA seguenti all'uso di citostatici inibitori della topoisomerasi II la latenza è piuttosto breve (da 1 a 3 anni), mentre nelle LA in rapporto ad antitumorali alchilanti la latenza è più lunga (da 5 a 10 anni).

In un recente studio (Rosso *et al.*, 1994) su 2469 casi di neoplasie infantili trattate con successo con chemioterapia intensiva si sono osservate 27 seconde neoplasie, tra cui 5 l. mieloidi acute (LMA), 1 l. linfatica acuta (LLA) ed 1 l. mieloidi cronica (LMC), con un periodo medio di latenza di 36 mesi (range 4,8-94,5 mesi).

Le casistiche di LA dell'adulto sono piuttosto rare, soprattutto perché sono poche le neoplasie non infantili che presentano lunghe sopravvivenze dopo trattamento chemioterapico e/o radioterapico e mancano dati provenienti da lunghi follow-up. Le statistiche di LA nell'adulto riguardano prevalentemente casistiche di linfomi di Hodgkin e non Hodgkin ed i tumori delle cellule germinali.

Mauch *et al.* (1995), in una indagine su 794 pazienti affetti da linfoma di Hodgkin, trattati con radioterapia da sola, con sola chemioterapia o con radio- e chemioterapia associate, hanno osservato che dopo 20 anni ne erano deceduti 56 per recidiva tardiva della malattia di base e 36 per seconde neoplasie (4,5%) di cui 8 LA (22,2% delle seconde neoplasie). La maggiore incidenza di LA figurava nei pazienti trattati con radio- e chemioterapia combinate.

I farmaci che più comunemente palesano effetti leucemogeni sono gli alchilanti e gli inibitori della topoisomerasi II che danno luogo a LA con caratteristiche clinico-ematologiche, citogenetiche e molecolari diverse (Davies, 1995).

Leucemie secondarie ad alchilanti

Le l. secondarie a trattamenti con alchilanti (mecloretamina, clorambucile, melphalan, ciclofosfamide, etc.) sono certamente le più note, sia perché più frequenti (dato il vasto impiego di questi farmaci) sia perché studiate da più tempo. In genere si tratta di pazienti con malattie neoplastiche del sistema emopoietico (linfomi tipo Hodgkin e non Hodgkin, l. linfatica cronica, mielomi, l. linfatica acuta del bambino), che effettuano terapie periodiche o continuative per diversi anni, talora per decenni. Solitamente la leucemia secondaria non insorge *d'emblée*, ma attraverso una fase di transizione di natura mielodisplastica, che può protrarsi più o meno a lungo. La mielodisplasia insorge 5-10 anni dopo l'inizio dell'assunzione di questi farmaci. Caratteristiche sono la citopenia periferica e le costanti alterazioni cromosomiche, rappresentate spesso dalla delezione del braccio corto dei cromosomi 5 o 7 o dalla traslocazione bilanciata t(3;21)(q26;q22). La 5q- è responsabile della perdita del gene onco-soppressore *IRF-1* che agisce come attivatore trascrizionale di IFN α . La leucemogenesi da alchilanti è di tipo *multistep* e pertanto richiede molti anni per svilupparsi.

Il *primum movens* è costituito dai rapporti che questi farmaci contraggono con la doppia elica del DNA, che nel tempo possono talora portare alla perdita di materiale genomico. Tale perdita si osserva più frequentemente nelle cellule in attiva replicazione, onde il prevalente coinvolgimento delle cellule mielopoietiche. Quando la perdita di frammenti cromosomici interessa geni onco-soppressori, aumenta la suscettibilità alla trasformazione leucemica, in quanto per innescare la leucemogenesi è allora sufficiente una mutazione del gene oncosoppressore sull'allele residuo.

Le l. secondarie a trattamenti prolungati con alchilanti sono generalmente l. acute e in prevalenza mieloidi (quasi mai appartenenti al sottotipo FAB M3) ma possono coinvolgere tutte e tre le filiere differenziative (*leucemie trilineari*).

L'indirizzo terapeutico che si segue in queste l. è in rapporto all'età del paziente, alle sue condizioni cliniche generali, all'eventuale concomitanza di altre malattie. Nei soggetti di età inferiore ai 45 anni, con un donatore familiare compatibile, il trattamento di scelta è costituito da una *chemioterapia d'induzione* con gli stessi protocolli usati nelle LMA *de novo*, seguita, qualora si sia raggiunta la RC, dal *trapianto allogenico di midollo osseo* oppure di *cellule staminali* ottenute dal sangue periferico. Nei pazienti senza donatore compatibile e in quelli situati nella fascia di età tra 55-60 anni, una volta raggiunta la RC con la terapia d'induzione si attuano 1-2 cicli di consolidamento e successivamente si procede all'*espianto del midollo autologo* o alla raccolta di *cellule staminali* dal sangue periferico. Per valutare la malattia minima residua, qualora esista un *marker* molecolare si può ricorrere alla sensibilissima PCR. Il midollo osseo espiantato o le cellule staminali raccolte possono essere sottoposte a *purging ex vivo* e successivamente reinfuse dopo che il paziente è stato sottoposto a megachemioterapia. Nei casi in cui non è praticabile un trapianto autologo di midollo i pazienti in RC dopo induzione possono essere avviati a 4 cicli di intensificazione con *citosina arabinoside* (3 g/m²/12 h il I, III e V giorno, con un intercielo di 4 settimane); i risultati sono analoghi a quelli ottenibili con l'autotrapianto. Nei soggetti di età avanzata si potrà optare per regimi chemioterapici di contenimento con basse dosi di *idarubicina* anche per via orale (20 mg per 2-3 giorni), associandola a basse dosi di *citosina arabinoside sottocute* (20 mg/12 h per 10-15 giorni).

Leucemie secondarie ad inibitori della topoisomerasi II

Le topoisomerasi (v. Agg. I, coll. *5470-5471; *6347-6350) sono un gruppo di enzimi cellulari che convertono, isomerizzando, uno stato del DNA in un altro.

Topotecan e *actinomomicina D* inibiscono la topoisomerasi I e non sono responsabili di insorgenza di leucemie.

Gli inibitori della topoisomerasi II comprendono un gruppo di *farmaci intercalanti* (antracicline) ed un gruppo di *non intercalanti* (epidofilottossine).

La l. secondaria all'impiego terapeutico di inibitori della topoisomerasi II, presenta tipicamente una latenza breve, da meno di 1 anno a 2 anni e mezzo circa, e non passa, in genere, attraverso una fase di transizione mielodisplastica.

Citologicamente le LA sono principalmente rappresentate dai sottotipi FAB M4 e M5 e spesso sono espressi antigeni sia mieloidi che linfoidi associati, indice di differenziazione su linee miste. Dal punto di vista molecolare (Thirrmann *et al.*, 1993) è molto spesso presente un'alterazione a livello del *locus* 11q23, che in genere dà origine a traslocazioni bilanciate: t(9;11)(p22;q23); t(11;19)(q23;p13); t(4;11)(q21;q23) (Cimino *et al.*, 1991). Il punto di rottura sul cromosoma 11 nella regione q23 è stato diversamente denominato dai vari studiosi (MLL-1, ALL-1, HRX e HTRX) e risulta essere omologo nell'uomo del gene *trithorax*, che in *Drosophila* controlla le trascrizioni dei geni attivi nell'embriogenesi (Tkachuk *et al.*, 1993). Nelle proteine codificate dai geni di fusione *HRX/AF9*, *HRX/EN2*, *HRX/AF4* formati per effetto delle traslocazioni predette, le sequenze ricche di serina e prolina dei geni traslocati rispettivamente dai cromosomi 9, 19 e 4 modificherebbero l'attività di regolatore trascrizionale che è propria del gene *HRX*. È interessante che il gene *HRX* si trovi riarrangiato anche in casi di LLA, per cui si deve pensare che il fenotipo

non è determinato dalle proteine di fusione e che a seconda del *partner* con cui si fonde *HRX* venga condizionato il differenziamento delle cellule staminali lungo linee diverse (Grignani *et al.*, 1995).

Anche altre traslocazioni sono state tuttavia descritte, sia pur con minore frequenza: t(8;21); t(15;17); t(12;17). In linea generale, per quanto attiene agli aspetti genotipici si deve rilevare che mentre le l. secondarie a trattamenti con alchilanti sono prevalentemente caratterizzate da alterazioni cromosomiche non bilanciate, le l. attribuite ad inibitori della topoisomerasi II presentano quasi sempre traslocazioni bilanciate.

Il meccanismo con cui gli inibitori della topoisomerasi II determinano traslocazioni bilanciate sarebbe imperniato sulla loro interferenza con le tappe di rilegatura e di formazione di complessi covalenti terziari a carico della doppia elica. Le alterazioni sarebbero responsabili non solo di rotture della doppia catena del DNA ma anche della formazione di *crossing-over* illegittimi responsabili di attivazioni di oncogeni e di traslocazioni di materiale genetico. Tale sarebbe il meccanismo con cui nel 50-70% dei casi di l. secondaria gli inibitori della topoisomerasi II attivano il *MLL-1* sul cromosoma 11. La fusione del gene *MLL-1* con l'altro pezzo del traslocato dà origine ad un gene di fusione responsabile della produzione di una proteina chimerica cui sembra di dover attribuire un ruolo nella leucemogenesi.

Il rischio di seconde l. da inibitori della topoisomerasi II dipende dalla modalità di somministrazione del farmaco, dalla dose totale somministrata e dall'associazione con altri citostatici (antimetaboliti, alchilanti, etc.). Attualmente si ritiene che il maggior rischio di l. secondaria si abbia con la somministrazione di epidofillotossine a ritmo mono- o bisettimanale, soprattutto se precedente la somministrazione di metotrexato, 6-mercaptopurina o L-asparaginasi. I soggetti trattati con epidofillotossine hanno un rischio cumulativo calcolato di sviluppo di una l. secondaria (a 4-6 anni dall'inizio del trattamento), che spazia a seconda delle statistiche dal 5,9 al 12,4%. Il programma chemioterapico prescelto per ogni neoplasia va pertanto pesato globalmente, tenendo conto non solo delle possibilità di risposta favorevole ma anche dei potenziali effetti leucemogeni a distanza, soprattutto se si tratta di neoplasie passibili di una elevata frequenza di curabilità con lunghe sopravvivenze.

Il trattamento delle l. secondarie all'impiego di inibitori della topoisomerasi II si avvale delle stesse strategie terapeutiche delle leucemie *de novo*.

Bibliografia

- Cimino G., Mori D. R., Canaan O. *et al.*, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 6712.
 Davies S. M., *American Society of Clinical Oncology, Educational Book*, Los Angeles, May 1995, 204-220.
 Grignani F., Aversa F., Dotti E. *et al.*, *ATTI 96° Congr. Soc. It. Medicina Interna*, Pozzi Ed., Roma, 1995, **1**, 249.
 Mauch P. M., Kalish L. A., Marcus K. C. *et al.*, *Cancer. J. Sci. Am.*, 1995, **1**, 33.
 Rosso P., Terracini B., Fears T. R. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1994, **59**, 451.
 Thirman M. J., Gill H. J., Burnett R. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 989.
 Tkachuk D. C., Kohler S., Cleary M. L., *Cell*, 1992, **71**, 691.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

REFRATTARIETÀ DI LEUCEMIE ACUTE ALLA CHEMIOTERAPIA

La scarsa risposta di una l. acuta alla CT può essere imputata alla natura della cellula staminale coinvolta nel processo neoplastico, ciò ha particolare evidenza nelle LMA dell'adulto in cui le cellule staminali conservano almeno parte delle proprietà delle corrispondenti cellule normali multipotenti, quali elevata capacità di automantenimento e di proliferazione autonoma (grazie anche alla produzione

di fattori di crescita autocrini), attiva pompa di efflusso di farmaci, cospicuo livello di proteina anti-apoptica. La scarsa responsività ai farmaci antitumorali è dovuta soprattutto al gene *MDR1* (*Multi Drug Resistance*), che codifica per una glicoproteina di membrana di 170 kd cui si attribuisce attività di pompa d'afflusso (Chen *et al.*, 1986).

Le LLA dell'età infantile sono per lo più MDR negative, ma nell'adulto il 10-50% di LLA all'esordio e il 15-60% di quelle recidivanti esprimono la *MDR* (List *et al.*, 1993). Nella LLA l'incidenza di positività di *MDR* aumenta spiccatamente dopo recidiva (10% alla diagnosi, 50% dopo recidiva) (Goasquen *et al.*, 1993). La presenza di *MDR* comporta minore frequenza di RC (56 vs. 93% nei casi MDR-negativi) e più elevata frequenza di recidive (100 vs. 46%). L'inattivazione farmacologica di una P-glicoproteina di 190 kd il cui gene è stato identificato sul cromosoma 16 in p13, nota come *MDR-associated protein*, sarebbe più importante di quella del gene *MDR* (Karp *et al.*, 1994). Sembra che l'impiego di verapamil, tamoxifene, ciclosporina A possa influire favorevolmente su tale evento.

Altri meccanismi che conferiscono multifarmaco-resistenza alle cellule di LA sono quelli implicati in processi di repressione dell'apoptosi, legati ai geni *bcl-2*, *bcr-abl*, *p53* (Russell, 1997).

È noto che il gene *bcl-2* partecipa alla regolazione della apoptosi cellulare; la sua sovraespressione per effetto della t(14;18) inibisce la morte cellulare programmata (Korsmeyer, 1992). L'evento è stato documentato in LLA sia dell'età infantile che dell'adulto (tranne che in L3 con fenotipo Burkitt), ma non appare costantemente associato a peggioramento della prognosi (Gala *et al.*, 1994).

È stato rilevato che prolungata sopravvivenza *in vitro* delle cellule leucemiche di LLAMy (Campana *et al.*, 1993) come pure scarsa risposta alla CT e resistenza ai glicocorticoidi (Smets *et al.*, 1994) possono essere associate ad anomalie delle vie metaboliche dell'apoptosi indotta dal gene di fusione *bcr-abl*.

Mutazioni del gene oncosoppressore *p53* vengono reperite raramente (3% dei casi) in B-LLA dell'età infantile, ma sono presenti nel 30% di T-LLA e ancor più spesso in adulti con LMA in recidiva. Le mutazioni di *p53* conferiscono un vantaggio selettivo alle cellule leucemiche, rendendole resistenti ai processi di apoptosi farmaco-indotti e favorendo così l'incremento della massa cellulare neoplastica.

La terapia delle LA «refrattarie» è per definizione deludente. Tuttavia l'impiego di citostatici ad alte dosi (HDCT), con Ara-C (HDAC) associata a daunomicina, etoposide e mitoxantrone vanta alcuni successi in casi di LMA con espressione del gene *MDR*. Analoghe terapie aggressive in LLA con caratteristiche sfavorevoli e scarsamente responsive alle terapie convenzionali o precocemente recidivanti possono del pari essere seguite da esito relativamente favorevole anche se, soprattutto nell'adulto, non di tipo veramente eradicante.

In tutte le LA «refrattarie» alla terapia convenzionale il trattamento di scelta è quello trapiantologico di midollo osseo (Allo-BMT) o di cellule staminali normali dopo adeguato condizionamento: in LLA dell'adulto si ottengono sopravvivenze a 3 anni nel 15-23% dei casi, il che è più di quanto ci si possa aspettare dalla CT. Promettenti risultati sono stati ottenuti di recente con l'analogo della ciclosporina PSC-833 nel superare la resistenza ai chemioterapici associata ad espressione di *MDR1* (Burnett e Eden, 1997).

Bibliografia

- Burnett A. K., Eden O. B., *Lancet*, 1997, **349**, 270.
 Campana D., Couston-Smith F., Manabe A. *et al.*, *Blood*, 1993, **81**, 1025.
 Chen C. J., Chin J. E., Ueda K. *et al.*, *Cell*, 1986, **315**, 538.

- Gala J. L., Vermylen C., Cornu G. et al., *Ann. Hematol.*, 1994, **69**, 17.
 Goasquen J. E., Dossot J. M., Fardel O. et al., *Blood*, 1993, **81**, 2394.
 Karp J. E., McCaffrey R. P., *Natl. Cancer Inst.*, 1994, **86**, 1196.
 Korsmeyer S. J., *Blood*, 1992, **80**, 879.
 List A., *Oncology*, 1993, **7**, 23.
 Russell N. H., *Lancet*, 1997, **349**, 118.
 Smets L. A., Van den Berg J., Acton D. et al., *Blood*, 1994, **84**, 1613.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LA MALATTIA MINIMA RESIDUA

Ai fini di una razionale formulazione della prognosi e di una corretta terapia successiva al conseguimento della RC in fase di induzione (chemioterapia di consolidamento e/o di mantenimento e/o di reinduzione, trapianto di midollo osseo o di cellule staminali) è molto importante appurare esistenza ed entità di un eventuale residuo di malattia leucemica (*minimal residual disease*, MRD). Lo stretto rapporto tra dimensioni della malattia neoplastica e curabilità della l. acuta è incontrovertibile: infatti spiccata leucocitosi blastica ed elevata concentrazione sierica di LDH, indicative di cospicua massa neoplastica, rappresentano importanti indici prognostici sfavorevoli (Hoelzer, 1994). In teoria le migliori prospettive di eradicazione della l. sono rappresentate dall'impiego di terapie intensive su una massa neoplastica di piccole dimensioni. Ora, la popolazione cellulare presente alla diagnosi vien quantificata in media in valori di circa 10^{12} cellule maligne; in fase di «remissione completa» (così definita quando non più del 5% delle cellule midollari possono essere identificate come blasti leucemici) la popolazione cellulare leucemica si aggira ancora su valori di 10^{10} cellule neoplastiche. La MRD, presente dopo una soddisfacente ma non eradicante terapia d'induzione, consiste quindi in una massa certamente non trascurabile di cellule neoplastiche. È importante conoscerne le dimensioni. Si è constatato infatti che in presenza di 51 cellule maligne su un totale di 10^6 cellule midollari, si osserva recidiva entro un anno nel 100% dei casi, mentre la frequenza scende al 41% con livelli inferiori di MRD (Uckun et al., 1993).

Per identificare le cellule leucemiche frammiste alla eterogenea popolazione di progenitori emopoietici normali ci si può avvalere di criteri morfologici e citochimici, di indagini citogenetiche, dell'esame della ploidia con citometria a flusso, della tipizzazione fenotipica immunologica, della individuazione di marcatori molecolari.

Il giudizio morfologico-citochimico della natura leucemica di una singola cellula è quanto mai infido anche per citologi esperti, tranne casi particolari (ad es. il reperto di corpi di Auer).

Le tecniche citogenetiche convenzionali (determinazione convenzionale del cariotipo, analisi delle metafasi con tecniche di bandeggio) consentono di identificare con sicurezza le cellule leucemiche portatrici di anomalie del cariotipo: un reperto cariotipicamente anomalo in corso di remissione morfologica è predittivo di recidiva a non lungo termine; la mancata identificazione di cloni anormali non garantisce tuttavia la validità della remissione (Freireich et al., 1992).

Molto più sensibile ed affidabile è l'impiego della tecnica di ibridazione *in situ* (FISH) (Anastasi et al., 1991), che può svelare anomalie cromosomiche non solo in cellule in cariocinesi ma anche in interfase (onde la sua particolare utilità in LA a bassa attività proliferativa) e può essere associata ad analisi morfologica o immunocitochimica. La sensibilità del procedimento è aumentata se si applicano particolari tecniche di immunofluorescenza (*fluorescence-activated cell sorter* [FACS] su cellule selezionate, ad esempio CD30+), associando anche marcatura con bromodeossiridina (BrdU) per valutare contemporaneamente l'entità della proliferazione (Nylund et al., 1994; Campana e Pui, 1995). Le informazioni ottenute con FISH appaiono altamente attendibili in LMA in remissione, probabilmente meno in casi di LLA. Le tecniche che

impiegano su cellule in interfase sonde molecolari locus-specifiche (ad es. geni *bcr* e *abl* svelabili con fluorocromi diversi) possono identificare t(9;22), ma possibili artifici ne limitano talora la sensibilità (Arnoldus et al., 1990).

La citometria a flusso (di tipo bivariato o *single laser cytometry*) fornisce reperti accurati quanto il bandeggio, specie se l'esame della ploidia è associato a quello di altri marcatori cellulari (ad es. CD10).

Importanti reperti si possono ottenere con l'immunofenotipizzazione delle cellule leucemiche presenti nel midollo osseo, nel sangue periferico ed eventualmente nel liquor cerebrospinale. L'impiego di singoli anticorpi non è tuttavia in grado di distinguere una cellula normale da una leucemica, tranne in situazioni particolari di cui gli esempi più dimostrativi sono forniti dalle LA che presentano una proteina chimerica originata da determinate traslocazioni e fusioni di geni, quali *bcr-abl* nella t(9;22), *E2A-PBX1* nella t(1;19), *ALL-1-AF4* nella t(4;11). Anticorpi reagenti specificamente con siffatti antigeni tumore-associati non sono però ancora disponibili, tranne l'AcMo 7.1 (che in LA di linea linfocita B o di tipo mieloide riconosce cellule con anomalia 11q23 e presenza di una particolare proteina di membrana) ed il reattivo KORSA 3544, che si lega specificamente alla membrana cellulare di LLA Ph⁺ positiva (Campana e Pui, 1995).

Il riscontro nel liquor anche di una singola cellula con espressione nucleare di TdT viene ritenuto probante per una meningosi leucemica.

Più attendibili sono le determinazioni con fluorocitometria a flusso di combinazioni fenotipiche leucemia-associate, di regola espresse da cellule ematiche normali ed identificabili con doppia e tripla colorazione mediante adatti fluorocromi coniugati ad anticorpi. Invero alcune combinazioni antigeniche reperibili con varia frequenza nei diversi tipi di LA possono talora essere evidenziati anche in cellule normali confinate in determinati tessuti (ad es. cellule TdT-CD3/CD5 o CD1 positive nel timo) e mai rinvenibili in soggetti normali nel sangue periferico, nel midollo osseo o nel liquor, sedi in cui un reperto positivo denota la natura leucemica delle cellule (Hurwitz et al., 1992).

Nella pratica routinaria solo alcune di tali combinazioni fenotipiche possono essere utili per svelare con sufficiente sensibilità l'esistenza e l'entità della eventuale MRD (Campana e Pui, 1995): TdT/CD3 o TdT/CD5 distintive della LLA-T; TdT/cp(34, TdT-CD10 (o CD19-CD34) CD13, TdT-CD10 (o CD19-CD34) CD33, TdT-CD10 (o CD19-CD34)/CDw65, TdT-CD10 (o CD19-CD34)/CD21, TdT-CD10 (o CD19-CD34)/CD56, distintive di LA di linea B; CD34/CD56, CD65/CD34/TdT, distintive di LA di linee mieloidi. Tale approccio rivela cellule leucemiche alla concentrazione di $1/10^4$.

Più sensibili e di più agevole impiego sono alcuni test per l'individuazione di marcatori molecolari: tali il *Southern blotting* (v. *blotting**) e soprattutto la *polymerase chain reaction* (PCR [v.*; v.**]), atta a rilevare minime quantità ($1/10^5$ - $1/10^6$) di cellule clonali residue. La massima specificità è presumibilmente raggiunta quando le sequenze amplificate sono veramente leucemia-specifiche, quali *bcr-abl* in LMC, *PML/RAR α* in LMA con t(15;17), *DEK/CAN* in LMA con t(6;9), *PBX1/E2A* in LLA con t(1;19), delezione *TAL-1* in LLA-T; analoghi livelli di sensibilità possono essere riscontrati usufruendo dei riarrangiamenti dei geni per le catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) e per il *T-cell receptor* (TCR), se si può ottenere una sonda (*probe*) clone-specifica (Potter et al., 1993).

Bibliografia

- Anastasi J., Vardiman J. W., Rudinsky R. et al., *Blood*, 1991, **77**, 2456.
 Arnoldus E. P., Wiegand J., Noordmeer I. A. et al., *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1990, **54**, 108.
 Campana D., Pui C. H., *Blood*, 1995, **85**, 1416.
 Freireich E. J., Cork A., Stass S. A. et al., *Leukemia*, 1992, **6**, 500.
 Hoelzer D., *Seminars in Hematology*, 1994, **31**, 1.
 Hurwitz C. A., Gore S. D., Stone K. D., Livin C. L., *Leukemia*, 1992, **6**, 233.
 Nylund S. J., Ruutu T., Saarinen U. et al., *Leukemia*, 1994, **8**, 587.
 Potter M. N., Cross N. C. P., van Dongen J. J. M. et al., *Leukemia*, 1993, **7**, 1302.
 Uckun F. M., Kersey J. H., Harke R. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 1296.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LEUCEMIE MIELOIDI CRONICHE

SOMMARIO

Citogenetica e biologia molecolare (col. 3155): LMC Ph⁺-positiva. - LMC Ph⁺-negativa. - Disordini mieloproliferativi Ph⁺-negativi. - **Terapia** (col. 3157): Terapia trapiantologica. - Terapia farmacologica.

Le leucemie mieloidi croniche (LMC) fanno parte di un gruppo di malattie mieloproliferative croniche che comprende anche la policitemia vera, la mielofibrosi idiopatica e la trombocitemia essenziale, con cui presentano non di rado espressioni di transizione sequenziale.

Citogenetica e biologia molecolare

Alla luce delle recenti indagini citogenetiche e molecolari il quadro clinico-ematologico che tradizionalmente indiciamo come leucemia mieloide cronica (LMC) si delinea sempre meglio come un processo eterogeneo (Vardiman, 1992). Distinguiamo infatti:

- a) una forma «classica», che costituisce il 95% dei casi dell'adulto ed è caratterizzata dal cromosoma Philadelphia (LMC dell'adulto, Ph⁺-positiva);
- b) una forma di L. mieloide cronica giovanile Philadelphia-negativa (JCML, Ph⁺-negativa);
- c) altre forme, non ancora ben definite, di disordini mieloproliferativi cronici Philadelphia-negativi (DMP, Ph⁺-negativi) nosograficamente affini alla LMC e alla leucemia mielomonocitica cronica (solitamente classificata tra le sindromi mielodisplastiche).

Comune a questi processi è l'esistenza di un'anomalia clonale acquisita che coinvolge il compartimento delle cellule staminali totipotenti o pluripotenti con globale impegno delle linee evolutive mieloidi, raramente anche della linea linfocitica B e solo eccezionalmente della linea linfocitica T. Almeno in una prima fase, anche prolungata, tale processo è caratterizzato essenzialmente da un *disordine proliferativo* del clone cellulare leucemico, in rapporto ad una *alterazione di geni deputati alla trasduzione del segnale mitogenico* oppure ad una *alterazione di geni oncosoppressori implicati nella regolazione del ciclo cellulare*: ne deriva un'enorme espansione del compartimento mieloide, sia della linea granulocitica (neutrofila, basofila ed eosinofila) che della eritroide, della megacariocitica e spesso della monocitica, con modesta compromissione della capacità citomaturativa e citofunzionale e con dismissione nel sangue circolante di elementi mieloidi immaturi in varia fase evolutiva, ma prevalentemente avanzata. Solo in una fase successiva (trasformazione blastica, TB) può manifestarsi una evidente *alterazione del processo maturativo* delle cellule mieloidi: tale evento è pressoché costante nella LMC Ph⁺-positiva mentre non si riscontra frequentemente nei disordini mieloproliferativi cronici Ph⁺-negativi, dove compare solo nel 10-15% dei casi.

LMC Ph⁺-positiva

Le caratteristiche cliniche e cito-istologiche più salienti di questa emopatia sono state già precedentemente descritte e aggiornate. A suo tempo (1992; v. LEUCEMIE*, col. 4538) abbiamo illustrato a proposito della mutazione patognomonica della LMC, la t(9;22)(q34;q11), il meccanismo di formazione del gene di fusione *bcr-abl* che tramite un mRNA di 8,2 kb trascrive una proteina ibrida (210 kd) fosforilata, ad attività tirosinotransferasica. Tale p210 induce la fosforilazione della tirosina presente in proteine citoplasmatiche necessarie per la trasduzione dei segnali mitogenici, probabilmente evocate in parte anche dalla IL-3. A questo evento

di fosforilazione cooperano verosimilmente anche attività tirosinochinasiche proprie di altre proteine in rapporto a protooncogeni diversi (*src*, *c-fes*, *vav*, *c-fos*, *c-jun*, *raf-1*) e soprattutto all'oncogene *ras*, pure implicato nella mutagenesi (Puil *et al.*, 1994) (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**). Nel complesso, attraverso vari meccanismi che convergono in una sovraregolazione dell'attività tirosinochinastica i progenitori mielopoietici clonali acquisirebbero una *capacità di proliferazione indipendente dal controllo omeostatico* spettante ai normali fattori di crescita (Santucci *et al.*, 1996).

L'espressione di p210 modifica inoltre le *proprietà adesive* dei progenitori cellulari mieloidi della LMC (Gordon *et al.*, 1987). Ne conseguono molteplici importanti eventi: ridotta adesione delle cellule mieloidi alle componenti stromali del microambiente emopoietico (fibronectina e suoi frammenti) (Verfaillie *et al.*, 1994), ridotta espressione dell'isoenzima leucocitario fosfatasi alcalina, depressione del controllo immunologico delle dimensioni del clone Ph⁺-positivo da parte dell'antigene 3 associato ai linfociti (LFA3).

Non è compiutamente chiarito sotto il profilo biochimico il difetto di adesione delle cellule mieloidi Ph⁺-positive alle componenti cellulari ed extracellulari del microambiente midollare, che ha struttura complessa e non del tutto nota: è comunque accertato che le cellule di origine mesenchimale (fibroblasti, adipociti) non presentano le alterazioni citogenetiche e molecolari proprie della LMC, mentre queste sono presenti nei macrofagi tessutali, ad ontogenesi mieloide. Non sembra che sia deficiente l'espressione dei recettori di superficie ma forse è compromessa la loro capacità funzionale oppure si può ipotizzare la mancanza di recettori di superficie addizionali necessari per l'attivazione della adesione integrina-mediata.

Quali che siano i meccanismi che sottendono all'alterata adesione delle cellule mieloidi alle strutture del microambiente midollare, è chiaro che tale evento costituisce un ulteriore fattore per l'avvio dei progenitori mieloidi Ph⁺-positivi ad una continua proliferazione, insensibile ai normali processi di regolazione.

Un ulteriore meccanismo che favorisce l'espansione del clone cellulare Ph⁺-positivo risiede nella inibizione, da parte della p210, della *apoptosi*, analogamente e quanto è imputabile al *bcl-2* in altre situazioni patologiche (McGahan *et al.*, 1994).

Infine, altro evento di basilare importanza, alle alterate proprietà di adesione dei progenitori mieloidi Ph⁺-positivi si associa un incremento dell'espressione dei recettori VLA-2 e VLA-6 dell'*integrina*, che sono i ligandi per il collagene di tipo IV e per la laminina (Verfaillie *et al.*, 1992): ciò conferisce alle cellule progenitrici mieloidi la capacità di superare la lamina basale dell'endotelio e di fuoriuscire dal microambiente midollare verso il circolo prima che si sia completata la maturazione cellulare, nonché di colonizzare organi non emopoietici (*in primis* fegato e milza).

Per vari motivi si ritiene che la formazione del gene riarrangiato *bcr-abl* non solo sia di per sé capace di indurre (tramite il polipeptide p210) la formazione del fenotipo leucemico, la sua espansione nel midollo osseo e la sua colonizzazione extramidollare, ma rappresenti anche l'avvio del processo leucemogenetico multifasico che è proprio della LMC Ph⁺-positiva e che sfocia nella trasformazione blastica (TB) terminale della malattia, che è più frequentemente di tipo mieloide, ma può talora essere linfoide.

Studi di *sequencing* delle regioni critiche del gene ibrido *bcr-abl* non hanno tuttavia rivelato alcuna alterazione strutturale della sequenza codificante la proteina chimica p210 in fase pre-trasformazione blastica: ciò porterebbe a negare un ruolo diretto del *bcr-abl* nella progressione della TB. Incerto è pure il ruolo della mutazione di *N-ras*, giacché raramente si osserverebbe inattivazione

degli oncogeni della famiglia *ras*. Del pari *sub judice* è l'interessamento del gene oncosoppressore *p53*: un coinvolgimento di *p53* è stato rilevato in circa il 15-20% delle TB mieloidi; nel 40% delle TB linfoidi è stata reperita invece una delezione omozigote del gene *CDK4i* (denominato anche *p16* o *MTS2*) localizzato sul cromosoma 9. È da escludere il coinvolgimento del gene onco-soppressore *RBI* (Gaidano *et al.*, 1993; 1994).

In complesso solo nel 30% dei casi di TB si può identificare o ipotizzare un possibile meccanismo causale della progressione maligna della malattia leucemica, mentre nei restanti casi gli eventi determinanti sono tuttora sconosciuti. Bisogna però tenere presente che l'espansione della popolazione cellulare mieloidale nella LMC, per effetto della esaltata e continuata proliferazione e dell'anormale prolungamento della sopravvivenza cellulare, favorisce l'emergenza di cloni cellulari biologicamente più devianti ed aggressivi attraverso alterazioni cariotipiche aggiuntive, quali la presenza di un isocromosoma 17q (da molti considerato patognomonico della TB), di un secondo cromosoma Ph¹, di trisomia 8, 19 o 21, oppure di perdita di un cromosoma sessuale X o Y, di cui non sono note le conseguenze funzionali.

Infine non è ancora ben valutabile l'importanza nella patogenesi della LMC della risposta immune al clone cellulare Ph¹-positivo, che presenta un ruolo indubbio nel processo della reazione *graft-versus-leukemia* (GvL) che si può riscontrare in corso di terapia trapiantologica (v. sotto) e che sembra essere imperniato sul fatto che la p210 prodotta dal gene riarrangiato *bcr-abl* potrebbe essere un bersaglio potenziale dei T linfociti (in analogia a quanto è noto in altre situazioni oncologiche per proteine espresse da geni cancro-correlati): le ibride sequenze molecolari di p210 potrebbero essere riconosciute come *non-self* quando siano presentate ai TCR dalle molecole HLA di classe I (Bocchia *et al.*, 1995).

LMC Ph¹-negativa

È una emopatia piuttosto rara a decorso più breve (meno di 20 mesi) della classica LMC Ph¹-positiva dell'adulto, con meno frequente esito in TB, spesso caratterizzata da leucocitosi non rilevante e da spiccata piastrinopenia. Manca per definizione la mutazione del cromosoma Philadelphia e invece in alcuni casi è stata reperita inattivazione del gene oncosoppressore *NF-1* (Shannon *et al.*, 1994): tale gene esplica attività GTPasica nei confronti dell'oncogene *ras*.

Disordini mieloproliferativi Ph¹-negativi

Sono singolari emopatie con caratteristiche cliniche intermedie tra la vera e propria LMC e le sindromi mielodisplastiche, apparentemente molto vicine alla l. mielomonocitica cronica (LMMC) in cui viene talora reperita una t(5;12)(q31-q33; p12-p13), implicante fusione dei geni *TEL/PDGF* (Golub *et al.*, 1994). In alcuni casi di DMP cronica Ph¹-negativa si possono riscontrare anomalie dei geni localizzati su 22q e 13q, come in t(11;21)(q13;q22), con mal note ripercussioni funzionali, ma verosimilmente riguardanti pur sempre processi di trasduzione del segnale mitogenico. Nei casi di DMP Ph¹-negativi che evolvono verso una TB acuta sono stati segnalati fenomeni mutazionali di attivazione degli oncogeni della famiglia *ras* o di inattivazione del gene onco-soppressore *p53* (Gaidano *et al.*, 1993).

Terapia

Terapia trapiantologica

La strategia terapeutica nella LMC si pone l'obiettivo di eradicare il clone neoplastico Ph¹-positivo, con ripristino di una normale mielopoiesi Ph¹-negativa. L'unico presidio

atto a conseguire tale fine è attualmente quello articolato nella ablazione del clone leucemico mediante megachemioterapia (più eventuale irradiazione corporea totale, TBI) seguita da trapianto di cellule midollari o di cellule staminali compatibili normali. Questa prassi può tuttavia essere attuata solo nel 10-20% dei casi perché circa il 60% dei pazienti al momento della diagnosi ha un'età superiore ai 55 anni, per cui non è passibile di alcun genere di trapianto da donatore, ed inoltre perché nel restante 40% solo un terzo circa trova un donatore consanguineo o un «unrelated donor» (non consanguineo).

1. I risultati del trapianto allogenico da consanguineo HLA identico (Allo-BMT) sono ormai consolidati e considerati soddisfacenti. Infatti l'allo-BMT praticato in fase cronica entro un anno dalla diagnosi consente sopravvivenze a 10 anni nel 50-60% dei pazienti. I pazienti trapiantati in fase accelerata presentano invece sopravvivenza a 5 anni del 35-40%. La sopravvivenza dei pazienti trapiantati in fase di trasformazione blastica è del 10-20% a 8 anni.

Il condizionamento viene effettuato con ciclofosfamide (CTX) 60 mg/kg/die e.v. per 2 giorni seguito da TBI (2,0 Gy frazionato in 6 giorni) ed è equivalente al trattamento con busulfano (BU) 4 mg/kg/die per os per 4 giorni seguito da CTX 60 mg/kg/die e.v. per 2 giorni. Questo trattamento consente nella maggior parte dei pazienti con LMC l'eradicazione apparentemente completa del clone Ph¹-positivo. Il controllo in PCR effettuato dopo un intervallo mediano di 14 mesi dal trapianto ha dimostrato (Guerrasio *et al.*, 1992) la negativizzazione di tutti i pochi casi che ad un primo esame post-trapianto erano risultati positivi e la persistenza di negatività in quelli in precedenza negativi; solo singoli casi sono apparsi positivi alla PCR (ma senza recidiva clinica) dopo 4 anni di osservazione. La tardiva permanenza del trascritto *bcr-abl* rivelato dalla PCR dopo BMT può tuttavia essere considerata predittiva di una ridotta probabilità di effettiva guarigione (Hughes *et al.*, 1991) anche se non di una recidiva imminente: sulla latenza della positività del *bcr-abl* influisce probabilmente l'entità della massa tumorale esistente al momento del trapianto (Miyamura *et al.*, 1993).

2. Il trapianto singenico da gemello HLA identico è gravato da una percentuale maggiore di recidiva precoce (circa 50%) rispetto all'allograpianto (20-30%).

3. Sono interessanti i dati riportati da Goldman (1994) sull'infusione di leucociti da donatore nel trattamento delle recidive dopo allograpianto e soprattutto di quelle in fase iniziale (molecolare o citogenetica). In quest'ultimo caso infatti 7 pazienti su 7 risposero favorevolmente alla trasfusione di leucociti da donatore HLA identico mentre solo 3 dei 7 pazienti in recidiva cito-ematologica raggiunsero una seconda remissione completa dopo analogo trattamento. In 10 pazienti si ottenne una remissione molecolare, che in 3 pazienti persistette per più di 2 anni. In altre indagini, a riprova dell'importanza del processo di *graft versus leukemia* (GvL), si raggiunse la remissione completa con infusione di linfociti CD8+ da donatore. Questo studio dimostrerebbe che i linfociti CD8+ sono responsabili del fenomeno della GvL.

4. I pazienti di età inferiore ai 45 anni senza donatore consanguineo compatibile possono essere avviati alla ricerca di un MUD (Bone Marrow Unrelated Donor). La sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto da MUD in fase cronica entro 1 anno dalla diagnosi, è del 45% a 5 anni; se il trapianto viene effettuato dopo 1 anno dalla diagnosi la sopravvivenza a 5 anni è del 36%; i pazienti trapiantati in fase accelerata hanno una sopravvivenza a 5 anni del 25-30% (v. MIDOLLO OSSEO*, trapianto incompati-

bile). I risultati sono più favorevoli con l'impiego profilattico di fluconazolo e ganciclovir (Hansen *et al.*, 1998).

5. L'obiettivo di eliminare o ridurre al minimo la massa leucemica Ph⁺-positiva è raggiungibile anche ricorrendo all'autotrapianto di cellule staminali (da sangue periferico) prelevate all'esordio di malattia o in fase di remissione dopo chemioterapia di induzione e opportunamente sottoposte a depurazione (*purging*) dal residuo di cellule leucemiche Ph⁺-positive (con procedimenti immunologici o farmacologici o di altro tipo) e criopreservate. Si pratica quindi megachemioterapia (con o senza TBI) per ottenere nel paziente l'ablazione del clone Ph⁺-positivo residuo e si reinfondono le cellule raccolte in precedenza dal paziente stesso.

Sono stati proposti due approcci di *purging* sostanzialmente diversi: *purging in vivo* e *purging ex vivo* ognuno dei quali può avvalersi di metodi diversi. Ne illustriamo alcuni dei più attuali.

L'approccio *in vivo* si basa sulla dimostrazione che l'evento mutageno che porta al riarrangiamento *bcr-abl* risparmia una parte dell'emopoiesi normale policlonale, per cui all'esordio clinico della malattia accanto al clone Ph⁺-positivo esiste una quota residua di putative cellule staminali normali Ph⁺-negative (riconosciute fenotipicamente CD34⁺CD33⁻HLA-DR⁻) la cui quantità si riduce progressivamente nel tempo ma è ancora rinvenibile in qualche misura nella fase terminale (TB) (Martinelli *et al.*, 1994). I tentativi attuali sono pertanto volti a recuperare dal paziente, il prima possibile, le cellule staminali Ph⁺-negative. A ciò è necessario mobilitare le cellule staminali Ph⁺-negative. Lo si ottiene con due meccanismi: a) somministrando fattori di crescita (GM-CSF o G-CSF) oppure e preferibilmente; b) sottoponendo il paziente a chemioterapia d'induzione con idarubicina 8 mg/m²/die c.v. nei giorni 1-5; Ara-C 800 mg/m²/die in 2 h d'infusione nei giorni 1-5; VPI6 150 mg/mq/die nei giorni 1-3. G-CSF 5 µg/kg/die s.c. dal giorno 8 fino a che i neutrofili non superano il valore di 1000/mm³. Profilassi antibiotica e antifungina con ciprofloxacina 500 mg mattina e sera, difluconazolo 150 mg/die. Vengono poi effettuate diverse leucafrese: la prima quando la concentrazione di globuli bianchi tocca i 500/mm³; la seconda quando i globuli bianchi superano quota 800/mm³; si prosegue quotidianamente fino a quando viene raggiunto il valore di 3.000/mm³. Si effettuerà allora un esame citogenetico sulle cellule staminali raccolte, valutando almeno 20 metafasi: qualora si riscontrerà assenza di cellule Ph⁺-positive, il paziente potrà essere avviato ad una chemioterapia mieloablativa con successiva reinfusione delle proprie cellule staminali Ph⁺-negative. Questa modalità di *purging* si è dimostrata promettente ma non si può ancora affermare che rappresenti un valido presidio terapeutico estensibile a tutti i pazienti.

Pure incerti sono i risultati ottenuti con sistemi di *purging ex vivo*. Uno dei modi utilizzati per ottenere cellule staminali Ph⁺-negative è quello delle colture a lunga termine; le cellule Ph⁺-positive infatti, poste in coltura, presentano svantaggi proliferativi rispetto alle cellule staminali Ph⁺-negative permettendo così la selezione di queste ultime. L'esperienza clinica di questo approccio è tuttavia ancora insufficiente.

Altri sistemi di *purging ex vivo* sono costituiti dall'utilizzo di oligonucleotidi antisense anti-myb, dei ribozimi o di inibitori della tirosinochinasi p210 prodotta dal *bcr-abl*, sempre al fine di eliminare le cellule Ph⁺-positive *ex vivo* e di potere reinfondere le residue cellule staminali Ph⁺-negative dopo chemioterapia ablativa (De Fabritiis *et al.*, 1995).

6. Negli ultimi anni sono stati effettuati diversi tentativi di sottoporre i pazienti con LMC a chemioterapia intensiva, seguita in fase di aplasia da infusione di cellule staminali midollari o periferiche Ph⁺-positive precedentemente prelevate in fase cronica: ciò al fine di ridurre il carico di cellule neoplastiche Ph⁺-positive e di poter meglio utilizzare su una massa di cellule ridotta le potenzialità terapeutiche offerte dall'interferone. Sono riportati in letteratura diversi casi in cui la reinfusione di cellule Ph⁺-positive dopo chemioterapia ablativa ha consentito il ripristino di una mie-

lopoiesi Ph⁺-negativa a seguito della somministrazione di IFN.

Terapia farmacologica

Oltre a questi approcci trapiantologici che possono essere tentati in pazienti in buone condizioni generali, senza patologie associate e di età inferiori ai 60 anni, esistono numerosi trattamenti farmacologici che consentono il controllo dell'espansione del clone leucemico ed in taluni casi portano alla scomparsa o alla netta riduzione della popolazione Ph⁺-positiva.

I trattamenti convenzionali basati per anni sull'uso del busulfano (BU) oggi sono stati praticamente abbandonati per la migliore sopravvivenza ottenibile con l'idrossiurea (HU) e soprattutto con l'interferone (IFN).

Il trattamento di scelta nei pazienti non avviabili ad un trattamento trapiantologico è costituito dall'interferone alfa. I pazienti che non tollerano l'interferone o con controindicazioni all'uso di questa sostanza potranno giovare della terapia con idrossiurea.

Negli ultimi anni sono stati acquisiti i risultati dei principali trial che hanno utilizzato l'interferone su ampie casistiche e con lunghi follow-up (Ozer *et al.*, 1993; Italian Cooperative Study Group, 1994; Hehlman *et al.*, 1994).

Le dosi di IFN ricombinante realmente somministrate sono state di 3-6 MU/die fino a progressione di malattia. Si sono ottenute sopravvivenze mediane di 5,6 anni, quindi sensibilmente maggiori di quelle osservate con HU (4,7 anni) o con BU (3,4 anni). Da questi studi risulta altresì che la risposta citogenetica completa (o di tipo «maggiore»), ottenibile con IFN nel 4-8% dei casi, comporta sopravvivenze assai lunghe, superiori a 6 ed anche a 10 anni nell'80% dei casi, mentre le risposte citogenetiche «minime» possono prevedere sopravvivenze a 5 anni del 40-60%. Sull'importanza prognostica della risposta citogenetica però non tutti concordano (Allan *et al.*, 1995).

Benché il costo globale della terapia con IFN-α sia significativamente più elevato rispetto alla HU, il rapporto costo-efficacia è accettabile secondo i parametri correnti, in termini di sopravvivenza e qualità di vita (Liberato *et al.*, 1996).

Si è tentato di ottenere un ulteriore miglioramento dei risultati in termini di sopravvivenza e di risposta citogenetica aggiungendo all'IFN la citosina arabinoside o l'idrossiurea. La combinazione IFN + Ara-C è risultata efficace mentre quella IFN + HU è tuttora *sub iudice*.

Recentemente Talpaz *et al.* (1995) hanno effettuato uno studio su 71 pazienti trattati con l'alcaloide cefalotossina Homoharringtonine (HHT), alla dose di 2,5 mg/m²/die per 14 giorni in infusione continua (6 cicli), ottenendo nel 72% dei casi una risposta ematologica completa e nel 16% una risposta parziale. Nel 31% dei casi è stata osservata una risposta citogenetica, completa nel 7%, «maggiore» nel 15%. Il reale valore di questo farmaco nel trattamento della LMC non è ancora provato; potrà essere interessante valutare l'effetto clinico di una associazione con l'interferone già sperimentata *in vitro* (Ottaviani *et al.*, 1996).

Bibliografia

- Allan N. C., Richards S. M., Shepherd P. C. A. *et al.*, *Lancet*, 1995, **345**, 1392.
- Bocchia M., Wentworth P. A., Southwood S. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 2680.
- De Fabritiis P., Amadori S., Petti M. C. *et al.*, *Leukemia*, 1995, **9**, 662.
- Gaidano G. L., Guerrasio A., Serra A. *et al.*, *Leukemia*, 1993, **7**, 946.
- Gaidano G., Serra A., Guerrasio A. *et al.*, *Ann. Hematol.*, 1994, **68**, 3.
- Goldman J. M., *Blood Rev.*, 1994, **8**, 21.
- Golub T. R., Barker G. F., Lovett M., Gilliland D. G., *Cell*, 1994, **77**, 307.
- Gordon M. J., Dowding C. R., Riley G. P. *et al.*, *Nature*, 1987, **328**, 342.

- Guerrasio A., Martinelli G., Saglio G. et al., *Leukemia*, 1992, **6**, 507.
 Hansen et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 962.
 Hehlman R., Heimpel H., Hostord J. et al., *Blood*, 1994, **84**, 4064.
 Hughes T. P. et al., *Blood*, 1991, **77**, 874.
 Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 820.
 Kantarjian H. M., Talpaz M., Hester J. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1995, **13**, 553.
 Liberato N. L., Quaglini S., Barosi G., *Brit. J. Haematol.*, 1996, **93** (suppl. 2), 69.
 Martinelli G., Lemoli R. M., Farabegoli P. et al., *Haematologica*, 1994, **79**, 445.
 McGahon A., Bissonnette R., Schmitt M. et al., *Blood*, 1994, **83**, 1179.
 Miyamura K., Tahara T., Tanimoto M. et al., *Blood*, 1993, **81**, 1089.
 Ottaviani E., Russo D., Visani G. et al., *Haematologica*, 1996, **81**, 75.
 Ozer H., George I. L., Schiffer C. A. et al., *Blood*, 1993, **82**, 2975.
 Pui L., Liu J., Gish G. et al., *Embo J.*, 1994, **13**, 764.
 Santucci M. A., Saglio G., Tura S., *Haematologica*, 1996, **81**, 63.
 Shannon K. L., O'Connell P., Martin G. A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 597.
 Vardiman J. W., *Chronic myelogenous leukemia and the myeloproliferative disorders*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hemopathology*, 1992, Baltimore, Williams & Wilkins, 1405.
 Verfaillie C. M., Benis A., Iida J. et al., *Blood*, 1994, **84**, 1802.
 Verfaillie C. M., McCarthy J. B., McGlave P. B., *J. Clin. Invest.*, 1992, **90**, 1232.

CARLO MAURI E GIUSEPPE LONGO

LEUCEMIE INFANTILI

[V. LEUCEMIE, VIII, 1556-1578; LEUCEMIE*, coll. *4579-4589]

SOMMARIO

Epidemiologia (col. 3161). - **Etiologia** (col. 3161). - **Patogenesi** (col. 3162). - **Classificazione** (col. 3162): *Morfologia e citochimica*. - *Immunofenotipo*. - *Citogenetica e biologia molecolare*. - **Approccio terapeutico** (col. 3165): *Leucemie acute*. - *Leucemia mieloide cronica*. - **Studi biologici** (col. 3169): *Determinazione della malattia minima residua*. - **Problematiche terapeutiche** (col. 3169): *Recidiva e malattia resistente*. - *Terapie alternative*. - *Sequela a lungo termine* (col. 3171).

Epidemiologia

L'incidenza della leucemia nell'infanzia varia in rapporto al tipo. Negli U.S.A., la l. linfoblastica acuta (LLA) colpisce all'incirca 2000 bambini ogni anno, mentre la l. mieloide acuta (LMA) è diagnosticata in circa 500 bambini e la l. mieloide cronica (LMC) in meno di 100 (Pui, 1995). In Italia, secondo il registro AIEOP, l'incidenza della LLA, della LMA e della LMC è rispettivamente di 336, 59 e 8 casi ogni anno. La l. linfocitica cronica (LLC), una delle forme più frequenti nell'adulto, colpisce solo eccezionalmente i bambini.

Etiologia

Tra i numerosi fattori favorevoli all'insorgenza del processo leucemico nei bambini hanno particolare importanza: la suscettibilità genetica, le alterazioni del sistema immunitario ed i fattori ambientali, quali radiazioni ionizzanti, farmaci, virus e agenti chimici.

Il ruolo di fattori genetici è supportato da alcune osservazioni: un rischio maggiore in soggetti con disordini cromosomici congeniti, un aumento di frequenza in consanguinei e soprattutto in gemelli monozigoti; la presenza di alterazioni cromosomiche o molecolari nelle cellule leucemiche dei soggetti colpiti. Una più elevata incidenza di leucemia acuta si osserva nei bambini affetti da disordini genetici congeniti, quali ad es. l'anemia di Fanconi e la sindrome di Down, in cui il rischio di sviluppare una leucemia è 20 volte superiore rispetto a quello di individui normali.

Indipendentemente da disordini genetici congeniti, i fratelli di bambini affetti da l. hanno un rischio di sviluppare la

malattia 2-4 volte superiore rispetto a quello dei bambini della popolazione generale. Nel caso di gemelli omozigoti, tale rischio è del 25% nei primi anni e diminuisce con l'aumentare dell'età. L'elevata incidenza di l. in gemelli monozigoti, specialmente nel primo anno di vita può essere dovuta o ad un evento genico comune prezigotico oppure avvenuto durante la vita intrauterina o al passaggio attraverso la circolazione placentare di cellule maligne da un feto all'altro (Ford et al., 1993).

È stato segnalato un aumentato rischio di linfopatie maligne in soggetti affetti da alcune malattie da immunodeficienza congenita, quali la sindrome di Wiskott-Aldrich, l'ataxia-teleangiectasia e l'ipogammaglobulinemia congenita (v. IMMUNODEFICIENZE**).

È accertato il ruolo leucemogeno svolto nell'uomo da alcuni virus linfotropi; in particolare, alcuni retrovirus sono associati a particolari tipi di leucemie.

Le radiazioni ionizzanti inducono nell'uomo lo sviluppo di l., soprattutto di tipo mieloide. Per quanto riguarda le basse dosi di radiazioni associate ad indagini di radiodiagnostica è segnalato un aumento del rischio di l. in bambini esposti in utero, soprattutto durante il primo trimestre di gravidanza.

Alcuni farmaci, quali gli alchilanti e le epipodofillotossine possono causare l. secondarie, soprattutto di tipo mieloide. C'è da precisare, comunque, che in oltre il 90% dei casi di l. infantili non si riesce ad identificare una chiara etiologia.

L'incremento dell'incidenza di LLA, riportato recentemente, potrebbe riflettere una maggiore esposizione ad agenti ambientali o essere casuale.

Patogenesi

Le l. sono considerate il risultato dell'espansione clonale di cellule progenitrici linfoidi o mieloidi che vanno incontro a trasformazione maligna e ad arresto maturativo a diversi livelli di differenziazione. Dai dati finora disponibili, sembrerebbe che la *leucemogenesi* sia un processo ad etiologia multifattoriale. Dal punto di vista patogenetico, i diversi fattori agirebbero sulle cellule linfoidi o mieloidi alterando la loro capacità proliferativa e differenziativa, dando così origine ad un clone di cellule «congelate» ad un determinato stadio maturativo. L'affinamento delle tecniche di studio citogenetico e lo sviluppo della biologia molecolare hanno determinato una svolta nella comprensione del processo di leucemogenesi. Così, il ruolo patogenetico, intuitivamente attribuito alle anomalie cromosomiche presenti nelle cellule neoplastiche ha trovato conferma nelle evidenze molecolari, da cui è emersa una corrispondenza tra coinvolgimento di determinate regioni cromosomiche e modificazione dei cosiddetti oncogeni cellulari. L'esatto meccanismo attraverso cui l'oncogene provoca una trasformazione cellulare non è conosciuto.

Il processo di leucemogenesi genera una serie di genotipi e fenotipi che correlano in vario grado con le caratteristiche cliniche e l'andamento della malattia, per cui la ricerca mirata ad identificare le differenze biologiche delle l. infantili ha importanti ripercussioni sulla gestione clinica.

Classificazione

Dal 1970 viene utilizzato il sistema classificativo proposto dal Gruppo Coordinatore FAB, basato sullo studio morfologico dei blasti dopo colorazione con May-Grünwald e Giemsa, integrato da reazioni citochimiche e citoenzimatiche. In questi ultimi anni è emersa l'utilità di metodiche di studio addizionali, quali le indagini immunologiche, citogenetiche e di biologia molecolare.

LEUCEMIE

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOBLASTICHE NEI BAMBINI

(Pui, 1995)

Sottotipo FAB	Frequenza
M0 Blasti con iniziali segni di differenziazione mieloidi	2%
M1 Mieloblasti scarsamente differenziati	13%
M2 Mieloblasti con segni di maturazione	28%
M3 Promielocita	6%
M4 Mielomonocitica (blasti mieloidi e monoblasti > 20%)	19%
M5 Monoblastica	21%
M6 Eritroleucemica	1%
M7 Megacarioblastica	10%

Morfologia e citochimica

Con lo schema classificativo FAB, in rapporto alle caratteristiche morfologiche e citoenzimatiche della popolazione leucemica è possibile differenziare innanzitutto le LLA dalle LMA e, nel loro ambito, i diversi sottotipi. Nell'ambito della l. mieloidi acuta si possono distinguere 8 diversi sottotipi, la cui incidenza in età pediatrica è riportata in tab. I. I sottotipi M0 ed M7 possono essere identificati solo con l'ausilio di tecniche immunologiche.

Le LLA possono essere distinte in tre sottogruppi (L1, L2 ed L3) in base alle loro caratteristiche morfologiche; tuttavia, la classificazione FAB non è di utilità nella loro gestione clinica.

Nell'ambito delle l. mieloidi croniche dell'infanzia sono riconosciuti due tipi: la forma *Philadelphia* positiva (tipo adulto) e la forma giovanile. La prima forma ha le stesse caratteristiche osservabili nell'adulto (v. sopra col. **3155), mentre la forma giovanile si presenta tipicamente come una leucemia mielomonocitica e colpisce i bambini di età < 4 anni.

Immunofenotipo

Molti blasti leucemici presentano caratteristiche simili a quelle dei normali progenitori mieloidi o linfoidi. Gli antigeni di differenziazione, presenti sulla superficie cellulare, possono essere identificati con anticorpi monoclonali specifici per una linea cellulare. L'uso di tali anticorpi ha permesso di dimostrare che la LLA è un'affezione biologicamente eterogenea, comprensiva di diversi sottotipi che riflettono le fasi sequenziali dell'ontogenesi delle normali popolazioni T o B linfoidi (tab. II).

1. *LLA della linea B.* - Questo gruppo comprende circa l'85% dei casi di LLA del bambino; di questi, oltre il 95%

TAB. II. CLASSIFICAZIONE DELLA LEUCEMIA LINFOLASTICA ACUTA NEI BAMBINI

(Pui, 1995)

Sottotipo immunologico	Frequenza
Early pre-B o pre pre B	57%
Pre-B	25%
Transitional pre-B	1%
B (slg +)	2%
T	15%

esprimono l'antigene *common* e altri antigeni di differenziazione della linea B ma non le immunoglobuline di membrana (LLA *early pre-B*, LLA *pre pre-B*, LLA *pre-B*), mentre meno del 5% esprimono le immunoglobuline di membrana (LLA B). Recentemente è stato descritto un quarto sottotipo, la LLA *pre-B transitional*, che sembra essere associato ad una prognosi favorevole.

2. *LLA della linea T.* - In questo gruppo, che comprende circa il 15% delle LLA, sono stati identificati diversi sottotipi in base al grado di differenziazione del timocita; tuttavia, tale sottoclassificazione non è di utilità nella pratica clinica.

L'espressività di diversi antigeni non correlati ad una specifica linea cellulare viene routinariamente valutata, a causa delle implicazioni cliniche di tale informazione.

Nel caso delle LAM, lo studio del fenotipo immunologico è indispensabile nel diagnosticare i casi di leucemia morfologicamente indifferenziata (M0) e, con l'uso di anticorpi monoclonali che riconoscono antigeni piastrinici, è possibile identificare la forma megacarioblastica (M7).

In un piccolo ma importante numero di casi, i blasti leucemici esprimono antigeni di superficie sia linfoidi che mieloidi. Questi casi vengono classificati sia come LLA con espressione di antigeni mieloidi sia come LAM positive ad antigeni linfoidi. In base al numero di anticorpi monoclonali utilizzati, nei bambini la percentuale di casi di LLA con *marker* mieloidi varia dal 6 al 22%, mentre quella dei casi di LMA con *marker* linfoidi è compresa tra il 17 ed il 60% (Pui, 1995).

Alcuni ricercatori sostengono che le LLA con antigeni mieloidi sono associate ad una prognosi peggiore, mentre, per altri, questo tipo di leucemia risponde bene a terapie intensive. Per quanto riguarda le LMA con *marker* linfoidi, vi sono forme più simili a leucemie linfoidi che a quelle mieloidi, infatti possono rispondere ad una terapia adatta alle linfoidi nel caso di fallimento di un'iniziale trattamento mieloidi.

Citogenetica e biologia molecolare

Nelle LLA del bambino, l'analisi cromosomica delle cellule leucemiche in mitosi riesce ad identificare anomalie clonali del cariotipo in almeno l'80-90% di casi. Quando sono presenti, le alterazioni strutturali sono più frequenti di quelle numeriche, anche se, in alcuni casi, possono coesistere. Le anomalie di struttura più frequenti sono le traslocazioni (*t*), ma possono osservarsi anche delezioni (*del*) parziali o complete inversioni (*inv*), più raramente inserzioni (*ins*). Nell'ambito delle anomalie strutturali si possono distinguere le «anomalie specifiche», caratteristiche quasi esclusive di un particolare tipo o sottotipo di clone leucemico e le «anomalie ricorrenti», comuni a diversi sottotipi o, addirittura, a diverse altre malattie ematologiche.

Per quanto riguarda le alterazioni cromosomiche numeriche solo due hanno rilevanza clinica nelle LLA dei bambini: l'iperdiploidia (> 50 cromosomi per cellula) che è associata ad una prognosi migliore, e l'ipodiploidia (< 45 cromosomi) che si accompagna ad una prognosi eccezionalmente infausta.

Una caratteristica importante delle LLA dell'infanzia è l'associazione tra alcune anomalie cromosomiche, quali le traslocazioni reciproche, ed il fenotipo immunologico. La maggior parte di questi riarrangiamenti sono ben definiti anche a livello molecolare e si ritiene abbiano un ruolo causale nel processo di leucemogenesi.

Nelle l. infantili, l'alterazione citogenetica più conosciuta è la t(9;22)(q34;q11), nota come *cromosoma Philadelphia*, un'anomalia ricorrente caratteristica della LMC, ma riscontrabile anche nella LLA della linea B. Lo studio molecolare ha messo in evidenza che tale alterazione risulta dalla fu-

sione dei geni *BCR-ABL*, con conseguente produzione, in base al punto di rottura del gene, di due diversi tipi di proteine, una di 210-kd tipica della forma adulta di LMC e una di peso molecolare inferiore (190-kd). Indipendentemente dal tipo di proteina prodotta, i blasti con la t(9;22) mostrano una straordinaria resistenza alla chemioterapia. La t(9;22) è presente nel 95% dei casi ed il riarrangiamento genico *BCR-ABL* è riscontrabile in tutti i bambini con LMC di tipo adulto; tali alterazioni sono, invece, assenti nella LMC giovanile. Sempre nelle LLA della linea B, possono essere presenti anomalie specifiche, quali la t(4;11)(q21;q23) che è associata ad un fenotipo immaturo (*early pre-B*) e la t(1;19)(q23;p13) presente in circa un quarto dei casi di LLA pre-B.

Le due anomalie cromosomiche specifiche più comuni nelle LMA sono la t(8;21)(q22;q22), frequente nella varietà M2 e spesso associata alla presenza di masse in sede extramidollare, e la t(15;17)(q22;q11-21), tipica della forma M3, importante perché identifica una forma particolare di LMA capace di rispondere bene ad una terapia biologica che agisce direttamente sulla lesione genica.

Nelle l. acute dell'infanzia, sia mieloidi che linfoidi, sono frequenti anomalie cromosomiche strutturali che coinvolgono la regione 23 posta sul braccio lungo del cromosoma 11. I punti di rottura dell'11q23 sono identici a livello molecolare sia nelle LMA che nelle LLA. Circa il 5% dei bambini ed il 70% dei bambini con LLA presentano tale riarrangiamento, che si esprime nella maggior parte dei casi con la t(4;11)(q21;q23), associata ad iperleucocitosi e prognosi infausta. Per quanto riguarda le LMA, i riarrangiamenti coinvolgenti l'11q23, che si esprimono nella maggior parte dei casi con la t(9;11)(p21-22;q23), sono le anomalie citogenetiche più frequenti nella l. acuta monoblastica (sottotipo M5), soprattutto negli infanti, e sono contrassegnati da disordini della coagulazione e da un coinvolgimento del sistema nervoso centrale (S.N.C.). Anche molti casi di LMA secondarie sono contrassegnate da riarrangiamenti coinvolgenti l'11q23.

Approccio terapeutico

Leucemie acute

Con gli schemi terapeutici attuali è possibile ottenere la guarigione in oltre il 70% dei bambini con LLA, ma solo nel 30-40% di quelli con LMA.

In base a presupposti biologici e farmacologici, i moderni schemi polichemioterapici si articolano in diverse fasi, quali: l'*induzione della remissione*, la *terapia post-remissionale* e la *profilassi della meningosi leucemica*.

Dal momento che le l. dell'infanzia comprendono diversi sottotipi con rilevanza prognostica diversa, il programma terapeutico varia nelle diverse forme.

1. *Leucemia linfoide acuta*. - La scelta dello schema terapeutico da utilizzare nei bambini con LLA dipende dalla valutazione dei cosiddetti fattori di rischio presenti al momento della diagnosi.

I bambini con LLA vengono considerati a *basso*, *alto*, *super-alto rischio* in base alle caratteristiche cliniche e biologiche della malattia alla diagnosi, quali l'età ed il numero dei leucociti nelle LLA della linea B, e la valutazione dei dati della citogenetica e dell'immunofenotipo in tutti i casi (tab. III). Con una rigorosa valutazione dei fattori di rischio al momento della diagnosi, solo i bambini ad alto rischio di recidiva vengono trattati con una terapia aggressiva, mentre un trattamento meno intensivo viene riservato per quelli a rischio più basso.

Indipendentemente dal rischio, la *terapia d'induzione* è la prima ed indispensabile fase, della durata di 4-6 settimane, che permette l'ottenimento della *remissione completa* (RC).

TAB. III. FATTORI DI RISCHIO

(Pui, 1995)

	Basso	Alto	Super Alto
Immunofenotipo	Pre pre-B; pre-B; «transitional» pre-B	T	
Età	1-9 anni	> 10 anni	< 1 anno
Leucociti	< 50.000/mm ³	> 50.000/mm ³	> 200.000
Citogenetica			t(9;22) t(4;11) riarrangiamento 11q23

Una terapia d'induzione comprendente 3 farmaci efficaci nelle LLA, quali la *vincristina*, la *L-asparaginasi* ed il *prednisone*, è in grado di indurre la RC nel 99% dei bambini con LLA a basso rischio (Ritter *et al.*, 1990; Schorin *et al.*, 1994; Rivera *et al.*, 1994; Pui *et al.*, 1994). L'aggiunta di un quarto farmaco, un'antraciclina (*daunorubicina* o *doxorubicina*) nella terapia d'induzione dei bambini ad alto rischio, ha comportato un incremento nella percentuale delle RC, fino a superare il 95% dei bambini trattati. Per i bambini ad altissimo rischio, oltre ai 4 farmaci sopracitati, alcuni schemi terapeutici d'induzione attualmente in uso comprendono anche la *ciclofosfamide* in associazione alla *citosina-arabinoside*.

La strategia terapeutica post-remissionale riconosce diverse fasi: il *consolidamento* o *intensificazione* che indica una fase precoce o tardiva, in cui vengono utilizzate combinazioni di farmaci che, per intensità, sono paragonabili alla terapia d'induzione; il *mantenimento*, corrispondente ad una fase di lunga durata in cui un'associazione chemioterapica di tipo blando viene somministrata in maniera continuativa. La maggior parte dei ricercatori è concorde nell'impiegare nei bambini a *basso rischio* terapie post-remissionali poco aggressive, per evitare la tossicità a lungo termine provocata da un trattamento intensivo. Una terapia post-remissionale che include la combinazione di due antimetaboliti, quali il *metotressato* (MTX) e la *6-mercaptopurina*, somministrati continuativamente per 2 o 3 anni porta a guarigione oltre l'80% di bambini con LLA a basso rischio (Camitta *et al.*, 1994).

Altri schemi in uso altrettanto efficaci prevedono, oltre l'MTX e la 6-MP, altri farmaci, quali la *vincristina* ed il *prednisone*, somministrati ciclicamente. Il ruolo di una fase chemioterapica post-remissionale di intensificazione è ancora controverso. Nei bambini a basso rischio l'uso di una intensificazione precoce o tardiva non sembra migliorare la durata della remissione, anche se con protocolli che prevedono l'uso del *metotressato* (MTX) a dosi medie o alte si è osservata una sopravvivenza libera da malattia di più lunga durata (Camitta *et al.*, 1989).

Nei bambini a *basso rischio* con un immunofenotipo pre-B, è anche importante distinguere quelli con la t(1;19) e quelli senza questa anomalia, dal momento che i bambini con la traslocazione necessitano di una terapia intensiva, mentre gli altri possono essere trattati con successo con gli schemi terapeutici adatti alle LLA a basso rischio. La t(1;19), che può anche essere presente nelle LLA *early pre-B*, in questi casi non è associata ad una prognosi infausta.

Sempre nell'ambito delle LLA della linea B, un corredo cromosomico iperdiploide (> 50 cromosomi per cellula) sembra comportare la guarigione nel 90% dei bambini trattati con programmi chemioterapici basati sull'impiego di antimetaboliti, senza sostan-

ziali sequele a lungo termine. Anche i bambini con traslocazioni dicentriche coinvolgenti il braccio corto dei cromosomi 9 e 12 possono trarre beneficio da terapie meno intensive.

Molti protocolli attualmente in uso per le LLA a rischio più elevato (che comprendono la maggior parte dei bambini con LLA) utilizzano una intensificazione di breve durata allo scopo di eradicare il maggior numero di cellule leucemiche residue. Con tale approccio, la percentuale di guarigione ottenuta nei pazienti ad alto rischio è paragonabile a quella ottenuta in precedenza solo in quelli a basso rischio. Sempre nei bambini ad alto rischio, risultati molto soddisfacenti sono stati ottenuti con schemi che prevedono la ripetizione ciclica sequenziale di diverse combinazioni di farmaci, quali *tenoposide* (VM-26), *citosina-arabioside*, *endoxan*, *6-thioguanina*, *6-mercaptopurina*, *antracicline*, *L-asparaginasi*, *nitrosuree* e, naturalmente, *vincristina* e *prednisone*. Nei bambini con LLA a rischio *super alto* si utilizzano protocolli che prevedono una fase post-remissionale molto intensiva, basata su combinazioni di farmaci non cross-resistenti, somministrati ciclicamente a dosi elevate, e che può includere anche il trapianto di midollo osseo allogenico.

Un discorso particolare merita la LLA con fenotipo B maturo e con la t(8;14) che comporta una prognosi veramente infausta con le terapie di tipo tradizionale. In questi ultimi anni, l'introduzione di schemi chemioterapici molto intensivi, includenti alte dosi di *ciclofosfamide*, *citosina-arabioside* e *metotressato* e profilassi intratecale della meningosi leucemica, somministrati per un breve periodo di tempo (meno di 6 mesi), ha consentito la guarigione a circa l'80% dei pazienti trattati (Reiter *et al.*, 1992; Patte *et al.*, 1993).

2. Leucemia mieloide acuta. – Nell'iter terapeutico della LMA del bambino, le tappe fondamentali sono: una *terapia d'induzione* mieloaplastizzante ed una *terapia post-remissionale* particolarmente aggressiva, comprendente anche il trapianto di midollo osseo, autologo o allogenico, per i bambini con un donatore compatibile.

Con l'impiego di una terapia d'induzione comprendente la *citosina-arabioside* in associazione ad un'antraciclina (*daunorubicina*, *doxorubicina* o *epirubicina*), con o senza *6-thioguanina* o *etoposide* è possibile ottenere la RC nel 75-80% dei bambini trattati.

Per quanto riguarda il tipo di chemioterapia post-remissionale, attualmente si è concordi nell'utilizzare cicli di farmaci non cross-resistenti, anche diversi rispetto a quelli utilizzati in induzione, quali il *mitoxantrone* e l'*amsacrine* (*MA-MSA*), somministrati a dosi medie o alte. Dai dati finora disponibili nelle LMA del bambino, il trapianto di midollo allogenico dà migliori risultati in termini di sopravvivenza libera da malattia rispetto a quelli ottenuti con il trapianto di midollo autologo o con la sola chemioterapia intensiva, che sembrano avere un'efficacia simile (Amadori *et al.*, 1993; Nesbit *et al.*, 1994).

La necessità di una terapia cosiddetta di *mantenimento* per uno o due anni nei bambini con LMA si è dimostrata inutile se la chemioterapia post-remissionale precoce è stata sufficientemente intensiva.

Lo studio citogenetico è stato di grande aiuto nell'identificare diversi sottotipi di LMA, per i quali è importante un approccio terapeutico particolare. Infatti i casi con anomalie quali la t(8;21) o l'inversione del cromosoma 16 sembrano avere una prognosi migliore se trattati con alte dosi di *citosina-arabioside*. Anche nei bambini affetti da sindrome di Down si hanno risultati migliori con schemi chemioterapici che includono la *citosina-arabioside*. Per altre anomalie, quali la monosomia 7, le traslocazioni 11q23, t(6;9) e t(1;22) essendo associate ad una prognosi infausta, è giustificato l'impiego di terapie alternative (Martinez-Camrent *et al.*, 1995).

Una considerazione a parte merita la *l. acuta promielocitica* (M3), in cui si è dimostrato particolarmente attivo un derivato della vitamina A, l'*acido all-trans retinoico* (ATRA), che induce la maturazione e la differenziazione dei blasti in granulociti maturi. L'ATRA, impiegata in induzione, ha determinato un incremento del numero di RC con una riduzione di eventi emorragici fatali, principale causa di insuccesso delle terapie antiblastiche utilizzate in precedenza. Inoltre, associato ad uno schema chemioterapico di induzione contenente un'antraciclina, l'ATRA (25 mg/m²/die), sembra migliorare considerevolmente non solo il numero delle RC ma anche l'andamento clinico successivo (Fenaux *et al.*, 1993). Per maggiori informazioni sull'ATRA, si rinvia alle coll. **3139-3141. A differenza degli altri sottotipi di LMA, nella l. promielocitica sembra si ottengano risultati migliori con un approccio post-remissionale che prevede, oltre ad una fase di intensificazione precoce con farmaci attivi nelle LMA, anche una terapia di mantenimento con *metotressato* (MTX) e *6-mercaptopurina* della durata di circa 2 anni.

3. Terapia della meningosi subclinica. – Il coinvolgimento clinicamente evidente del S.N.C. è un evento piuttosto raro alla diagnosi, mentre rappresenta una delle sedi preferenziali di recidiva, per cui è indispensabile attuare misure terapeutiche adeguate per evitare tale evenienza.

La *localizzazione meningea* è molto più frequente nelle LLA, mentre nella forma mieloide è più rara, anche se in alcuni sottotipi, quali M4 ed M5, l'incidenza è elevata. Ne consegue che i dati disponibili su questo argomento riguardano soprattutto la LLA. L'associazione di irradiazione craniale o craniospinale e instillazioni intratecali di *metotressato* (MTX) e/o *citosina-arabioside* (ARA-C) è stato il tipo di approccio preventivo largamente utilizzato in passato ed ha determinato una significativa riduzione dell'incidenza di recidive meningee dal 60%, osservata in precedenza, al 10-15% con conseguente incremento dei lunghi sopravvissuti. I danni acuti e cronici a carico del S.N.C. osservati soprattutto nei bambini più piccoli ha stimolato l'uso di schemi alternativi. Attualmente nella maggioranza dei bambini con LLA, come terapia della meningosi subclinica, viene utilizzata terapia intratecale con MTX e/o ARA-C a dosi dipendenti dall'età, associata a chemioterapia sistemica con gli stessi farmaci somministrati a dosaggio medio-alto, tale da attraversare la barriera ematoencefalica e raggiungere una concentrazione liquorale terapeutica.

Un effetto simile è provocato dall'uso per via sistemica del *desametasone* in sostituzione del *prednisone*. L'uso della radioterapia craniale viene riservata a bambini con particolari caratteristiche di rischio alla diagnosi, quali un'iperleucocitosi (leucociti $\geq 100.000/\text{mm}^3$), la presenza del cromosoma Philadelphia o di una meningosi clinicamente evidente.

Molto più scarsi sono i dati riguardanti la profilassi della meningosi nelle LMA. Attualmente si è concordi nell'utilizzare istillazioni intratecali di ARA-C o, in casi particolari, addirittura l'irradiazione craniale, come per le LLA.

Leucemia mieloide cronica

Il trapianto di midollo osseo allogenico è la sola forma di terapia curativa per la LMC, con una probabilità di sopravvivenza a 5 anni variabile dall'80 al 90% per la forma cosiddetta adulta ma che scende al 40-50% per la forma giovanile (Marin *et al.*, 1992). I pazienti con entrambe le forme, senza un donatore consanguineo HLA identico, possono trarre beneficio da un trapianto di midollo da consanguinei semicompatibili o da donatori HLA identici non consanguinei (Garnis *et al.*, 1993; Bunin *et al.*, 1992).

Sono stati anche proposti e utilizzati schemi terapeutici con l'*interferone-alfa* nei pazienti con LMC Philadelphia-

positivi, senza donatore per il trapianto allogenico. Gli studi più importanti sono stati condotti negli adulti, in cui un trattamento prolungato con l'interferone migliora la risposta citogenetica, ritarda la progressione della malattia e prolunga la durata della sopravvivenza. Nei bambini, considerata la rarità di questa forma morbosa gli studi sono più scarsi ed il numero di pazienti trattati esiguo. I dati più significativi riguardano uno studio su 15 bambini trattati con interferone-alfa, in cui 10 hanno presentato una risposta ematologica e di questi, 4 hanno avuto la scomparsa del cromosoma Philadelphia (Dow *et al.*, 1991).

Studi biologici

Determinazione della malattia minima residua

Al momento della diagnosi, la quantità di cellule leucemiche presenti in un bambino con LLA supera la cifra di 10^{12} , mentre al momento dell'ottenimento della R.C. il loro numero scende a 10^{10} , per cui non è possibile individuarle con le normali tecniche morfologiche. Diventa quindi sempre più importante l'uso di tecniche alternative, in grado di mettere in evidenza la *malattia minima residua*. A tale scopo, vengono attualmente utilizzate: tecniche immunologiche, le tecniche del FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), la tecnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Le tecniche immunologiche, capaci di identificare antigeni tipici di blasti leucemici che non sono riscontrabili nelle cellule midollari normali o in quelle del liquido cefalo-rachidiano, possono essere utilizzate con successo nel 90% dei casi di LLA della linea T, nel 35% dei casi di LLA della linea B e nel 40% di LMA. Le tecniche del FISH, che utilizzano sonde specifiche per il DNA per identificare anomalie cromosomiche numeriche o strutturali, possono essere utilizzate insieme alle metodiche morfologiche o immunoistochimiche, nelle LMA e nelle LLA. Le applicazioni cliniche sono limitate dalla mancanza di sonde disponibili e dalla variabilità dei risultati.

La tecnica PCR è stata ampiamente testata come metodica di amplificazione di sequenze di RNA o di DNA relative esclusivamente al clone leucemico. Nel caso di L. acute con anomalie genetiche specifiche, l'analisi PCR riesce ad identificare una quantità minima di blasti fino ad arrivare ad 1 blasto per 10^6 cellule normali. La PCR ha la capacità di poter identificare la malattia minima residua in oltre il 90% dei casi di bambini con LLA. Con tale tecnica possono essere identificati i blasti residui dopo l'ottenimento della remissione. Sebbene l'assenza di cellule leucemiche identificabili non assicuri la possibilità di guarigione, la loro persistenza o il loro incremento in analisi ripetute è predittivo di una recidiva, a volte anche molto tardiva.

Nei pazienti con LMC viene spesso applicata la tecnica dopo trapianto di midollo allogenico, ma i risultati non sono particolarmente predittivi per l'andamento del trattamento, anche se studi quantitativi seriati della PCR sembrano in grado di rilevare la comparsa di una recidiva precoce.

Nell'ambito delle LMA, sono particolarmente interessanti i dati riguardanti la varietà M3 (promielocitica) in cui si è osservata una correlazione tra risultati negativi ed aumento della sopravvivenza libera da malattia (Diverio *et al.*, 1993) e tra risultati positivi e la comparsa di recidive (Lo Coco *et al.*, 1992).

Problematiche terapeutiche

Recidiva e malattia resistente

Una delle problematiche più importanti nella terapia delle L. acute è rappresentata da una malattia resistente ad un primo schema di induzione e dalla comparsa di una *recidiva*, che può verificarsi sia a livello del midollo osseo sia in sedi extramidollari, quali il S.N.C. ed il testicolo. I bambini

che presentano una recidiva extramidollare isolata sono, comunque, ad alto rischio di sviluppare una successiva recidiva midollare; è quindi importante attuare, contemporaneamente alla terapia locale, specifica per la recidiva, una chemioterapia sistemica. Nel trattamento della recidiva meningea, più frequente nelle LLA che nelle LMA, i migliori risultati si ottengono con una strategia terapeutica che prevede la somministrazione intratecale di MTX + ARA - C fino alla sterilizzazione del *liquor*, cui segue chemioterapia sistemica con gli stessi farmaci somministrati ad alte dosi, associata a istillazioni intratecali oppure a radioterapia cranio-spinale per i pazienti precedentemente non irradiati.

La recidiva testicolare, evento raro nelle LMA, viene trattata con *irradiazione bilaterale*, seguita da *chemioterapia sistemica*.

Per i bambini affetti da LLA che presentano una recidiva midollare, la strategia terapeutica dipende dalla durata della prima remissione. Una recidiva che interviene dopo più di 6 mesi dalla sospensione della terapia o, comunque, dopo 3 anni di RC può essere trattata con successo con schemi d'induzione scarsamente aggressivi, comprendenti *vincristina*, *prednisone*, *L-asparaginasi* ed un'antraciclina. In una recidiva che intercorre durante la terapia post-remissionale o entro 6 mesi dalla sua sospensione, i maggiori successi vengono ottenuti con un'induzione intensiva, *mieloaplastizzante*, comprendente farmaci quali il *mitoxantrone*, l'*idarubicina* e la *citocina-arabinoside* ad alte dosi. Anche per le LMA, la terapia d'induzione della recidiva varia in rapporto al tempo di comparsa di quest'ultima; sempre, tuttavia, include la *citocina-arabinoside* in associazione ad altri farmaci attivi in questa forma di leucemia. Nelle recidive tardive viene utilizzata con successo la *citocina-arabinoside* a dosi intermedie, mentre in quelle precoci i risultati migliori si ottengono con la *citocina-arabinoside* ad alte dosi. Come approccio terapeutico post-remissionale, sia nella forma linfocitica che in quella mieloide, il trapianto di midollo offre maggiori possibilità di guarigione rispetto ad una chemioterapia intensiva, soprattutto per quei bambini recidivati durante o subito dopo la sospensione della terapia (Barrett *et al.*, 1994; Clift *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1993). Il trattamento di una L. linfocitica o mieloide, refrattaria ad un primo schema d'induzione richiede programmi terapeutici fortemente aggressivi comprendenti sia farmaci, quali *mitoxantrone*, *VP-16*, *AMSA*, *IDA* ed *ARA-C* somministrati ad alte dosi, sia il trapianto di midollo osseo, con cui è possibile ottenere qualche possibilità di guarigione.

Terapie alternative

Lo scarso numero di pazienti con donatore familiare istocompatibile ed i risultati fallimentari ottenuti con i diversi approcci chemioterapici hanno stimolato la ricerca verso altre forme di allotrapianto, quali il trapianto da donatore consanguineo semicompatibile, quello da donatore non consanguineo compatibile ed il trapianto da cordone ombelicale. Con un diverso controllo della GvHD (*Graft-versus-Host Disease*) ed una diversa prevenzione delle complicanze infettive, queste forme alternative di allotrapianto potranno dare una reale possibilità di diventare lungo-sopravviventi a quei bambini con forme di leucemia particolarmente aggressive.

Per i pazienti affetti da LMC con recidiva dopo trapianto di midollo allogenico, l'impiego dell'infusione di linfociti dallo stesso donatore originario di midollo, associato o meno a terapia con interferone-alfa, ha comportato seconde remissioni di lunga durata (Porter *et al.*, 1994). Attualmente, nella speranza di poter impiegare con successo forme simili di immunoterapia anche in altri tipi di L., sono in corso *trial clinici* che prevedono l'impiego di immunosti-

molanti, quali l'interleuchina-2 (IL-2) e cloni di cellule T specifici verso antigeni presenti solo sulle cellule leucemiche, allo scopo di intensificare l'efficacia antileucemica del trapianto. Nelle l. acute, risultati terapeutici promettenti sono stati ottenuti con alcune citochine, quali l'IL-2 e l'interleuchina-3 (IL-3), ed alcuni fattori di crescita mieloidi, quali il fattore stimolante la crescita granulocito-macrofagica (GM-CSF) ed il fattore stimolante la crescita granulocitaria (G-CSF) (Pui *et al.*, 1997). Per quanto riguarda le interleuchine, l'IL-2 sembra dare risultati promettenti se somministrata in RC, in presenza, cioè, di una piccola massa leucemica. L'impiego dei fattori di crescita mieloidi nelle LLA è stato limitato al periodo successivo a megadosi di chemioterapia, per abbreviare la durata della citopenia. Ancora controverso appare invece il ruolo del G-CSF e del GM-CSF nelle LMA, dove sono stati utilizzati sia per ridurre il periodo di citopenia post-terapeutica, sia per reclutare il maggior numero di blasti prima di iniziare la chemioterapia, allo scopo di migliorarne i risultati. In uno studio recente, il G-CSF ha determinato sia la remissione che la ricostituzione dell'ematopoiesi da parte delle cellule del donatore in 3 su 7 pazienti con LMA o con LMC recidivati dopo allotrapianto di midollo.

Molti studi sono focalizzati a superare la resistenza farmacologica dei blasti sia attraverso l'inibizione del prodotto genico che promuove la resistenza ai farmaci antiblastici sia modulando l'espressività del gene che codifica una proteina associata alla resistenza farmacologica. Tra gli agenti biologici in corso di studio, citochine quali l'interferone-alfa, l'interleuchina-4 e gli immunconiugati hanno il più alto potenziale per superare il meccanismo che è in genere responsabile della resistenza farmacologica. Alcune citochine, utilizzate a questo scopo, si sono dimostrate capaci di inibire anche gli enzimi che metabolizzano i farmaci antiblastici, provocandone una più elevata concentrazione sierica con conseguente aumento del loro effetto a livello sistemico.

Con lo sviluppo della biologia molecolare, è possibile sfruttare le lesioni geniche delle cellule leucemiche per escogitare terapie efficaci, per esempio, usando nucleotidi anti-senso capaci di interferire con la trasduzione dell'RNA messaggero in oncoproteine o con l'inserzione di un gene soppressore della crescita tumorale.

Si sta anche introducendo la determinazione sierica dei farmaci antiblastici, allo scopo di poter determinare una concentrazione efficace per ogni bambino, con vantaggi anche in termini di tossicità (Evans *et al.*, 1998).

Sequela a lungo termine

L'insorgenza di secondi tumori è una delle complicanze più devastanti della chemioterapia delle l. In uno studio retrospettivo su 9720 bambini trattati per LLA, è stata riscontrata un'incidenza 7 volte maggiore di tumori in generale e 22 volte maggiore dei tumori a carico del S.N.C., in rapporto a quella segnalata nella popolazione generale (Neglia *et al.*, 1991). Bambini sottoposti ad irradiazione cranica ad un'età inferiore ai cinque anni hanno presentato una maggiore incidenza di tumori cerebrali.

Recentemente è stato segnalato un incremento dei casi di LMA in pazienti trattati con terapie intensive per LLA; ciò è da attribuire all'effetto dose e schedula dipendente delle epipodofillotossine (VP-16 e VM-26). Nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo allogenico è stata segnalata l'insorgenza di secondi tumori, soprattutto linfomi non-Hodgkin, tumori cerebrali e melanomi, con una frequenza sette volte maggiore rispetto a quella attesa. Per quanto riguarda il rischio teratogeno e mutageno dei farmaci antiblastici non è stato segnalato alcun incremento di anomalie congenite o di tumori in bambini nati da pazienti trattati

con chemioterapia per una l. insorta in età infantile. La profilassi per la meningosi leucemica, impiegata nel passato, e comprendente l'irradiazione cranica in combinazione con il MTX intrarachide ha provocato anche la comparsa di danni cronici a carico del S.N.C., quali deficit neuro-psicologici e disfunzioni endocrine. Sono state, infatti, segnalate una diminuzione delle capacità intellettive e delle funzioni psicomotorie, nonché alterazioni neuroendocrine, con ritardo nello sviluppo fisico e nella crescita ed obesità; tali danni sono risultati più gravi e più frequenti nei bambini più piccoli di sesso femminile. Deficit dell'ormone della crescita ed insufficienza gonadica sono stati segnalati anche in pazienti sottoposti a trapianto di midollo e trattati come regime di condizionamento con alte dosi di busulfano e ciclofosfamide.

La terapia con antracicline può determinare l'insorgenza di cardiomiopatia in un certo numero di pazienti, specialmente quando la dose totale del farmaco superava i 200/mg/m² e quando i bambini avevano un'età inferiore a quattro anni.

Bibliografia

- Amadori S., Testi A. M., Aricò M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 1046.
 Barrett A. J., Horowitz M. M., Pollock B. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 1253.
 Bunin N. J., Casper J. T., Lawton C. *et al.*, *Bone Marrow Transplant.*, 1992, **9**, 119.
 Camitta B., Leventhal B., Lauer J. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1989, **7**, 1539.
 Camitta B., Mahoney D., Leventhal B. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 1383.
 Clift R. A., Buckner C. D. A., Appelbaum F. R. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1992, **10**, 1723.
 Dow L. W., Raimondi S. C., Culbert S. J. *et al.*, *Cancer*, 1991, **68**, 1678.
 Diverio D., Pandolfi P. P., Biondi A. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 3556.
 Evans W. E. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 499.
 Fenaux P., Le Deley M. C., Castaigne S. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 3241.
 Ford A. M., Ridge S. A., Cabrera M. E. *et al.*, *Nature*, 1993, **336**, 358.
 Gams A. S., Haake R., McGlave P. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 834.
 Lo Coco F., Diverio D., Pandolfi P. P. *et al.*, *Lancet*, 1992, **340**, 1437.
 Mann T., Butturini A., Kantarjian H. *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1992, **14**, 229-232.
 Martinez-Climent J. A., Lane N. J., Rubin C. M. *et al.*, *Leukemia*, 1995, **9**, 95.
 Neglia J. P., Meadows A. T., Robinson L. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 1330.
 Nesbit M. E. Jr., Buckley J. D., Feig S. A. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 127.
 Patte C., Leverger G., Rubie H. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1993, **12**, 317 (abstract).
 Peterson F. B., Lynch M. H. F., Clift R. A. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 1353.
 Porter D. L., Roth M. S., McGarigle C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 100.
 Pui C.-H., Crist W. M., *J. Pediatr.*, 1994, **124**, 491.
 Pui C.-H., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 1618.
 Pui C.-H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (25), 1781-1787.
 Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.-D. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 2471.
 Ritter J., Creutzig U., Reiter A. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, **116**, 100.
 Rivera G. K., Pinkel D., Simone J. V. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **329**, 1289.
 Schorin M. A., Blattner S., Gelber R. D. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 740.

FORINA GIONA

LEUCOVORIN: v. FOLINICO ACIDO** (coll. **2349-2350).

LIMBICO SISTEMA [v. vol. VIII, coll. 1708-1727]

SUMMARY

Genesi del concetto di sistema limbico (col. 3173). - Dati classici sui rapporti fra sistema limbico, emozioni e stati affettivi (col. 3174). -

Sviluppi e revisioni attuali delle conoscenze anatomo-funzionali riguardanti il sistema limbico (col. 3176). - Considerazioni conclusive (col. 3178).

Genesi del concetto di sistema limbico

Non esiste una definizione di sistema limbico [s. l.] universalmente accettata; infatti da decenni questo termine è usato diffusamente nelle neuroscienze e in psichiatria per significare concetti disparati e discordanti, tanto che alcuni esperti ne sconsigliano l'impiego nell'interesse della chiarezza, mentre altri lo ritengono comunque utile per facilitare la descrizione di aspetti complessi e in parte ancora oscuri dell'organizzazione cerebrale. Il neurologo americano MacLean, che per primo lo propose nel 1952, diede questo nome a un complesso di strutture interconnesse del diencefalo e della parte mediale del telencefalo, ipotizzando che qui risiedesse il substrato nervoso delle emozioni. La sua formulazione incorporava la nozione anatomica del «grande lobo limbico» di Broca — un anello di tessuto cerebrale formato dalla circonvoluzione del cingolo e da quelle subcallosale e paraippocampale e disposto a mo' di orlo (*limbus*) attorno al diencefalo sulla superficie mediale di ciascun emisfero cerebrale — e l'ipotesi anatomo-funzionale che va sotto il nome di «circuitto di Papez» (1937). Questo circuito, situato nella profondità del lobo limbico, comprende: a) il corpo mammillare dell'ipotalamo; b) il nucleo anteriore del talamo; c) la circonvoluzione del cingolo; e d) la formazione ippocampale; nonché le connessioni fra a e b (il fascio mammillo-talamico), fra b e c (le radiazioni talamo-corticali), fra c e d (il fascio del cingolo), e infine il fornice, che chiude il circuito unendo d ad a (fig. 1). Papez (1937) riteneva che l'attivazione della corteccia della circonvoluzione del cingolo da parte dell'ipotalamo (corpo mammillare) tramite il talamo generasse l'esperienza soggettiva delle emozioni, e che a sua volta l'ipota-

lamo potesse essere attivato da informazioni con contenuto emozionale provenienti dalla corteccia tramite la formazione ippocampale.

A partire dal 1952 e nel corso di vari anni MacLean (1990) ampliò e modificò questa ipotesi: 1) includendo nel suo concetto di s. l. altre strutture interconnesse con le stazioni del circuito di Papez, come l'amigdala, il setto, l'intero ipotalamo, l'abenula e la parte ventrale dei gangli della base; 2) contrapponendo alla struttura citoarchitettonica più evoluta della isocorteccia (la corteccia delle funzioni cognitive) quella relativamente primitiva della meso- e allocorteccia del s. l. (la corteccia delle funzioni emotive); 3) postulando una evoluzione a tre stadi del sistema nervoso, caratterizzata dall'emergenza del s. l. nella transizione fra rettili ancestrali e paleomammiferi, e dall'aggiunta nei mammiferi moderni dell'isocorteccia ai moduli evoluti precedentemente e sostanzialmente conservati, e 4) individuando come caratteristiche accomunanti i diversi componenti del s. l. la spiccata suscettibilità agli agenti epilettogeni patologici e sperimentali, e la tendenza di attività epilettiche generate in una regione del sistema a propagarsi entro il sistema stesso ma non ad altre regioni dell'encefalo.

Dati classici sui rapporti fra sistema limbico, emozioni e stati affettivi

La documentazione classica (sintetizzata da MacLean, 1990) si rifà anzitutto alla sintomatologia emozionale dell'epilessia del lobo temporale con focolai in regioni limbiche (soprattutto ippocampo e amigdala). Durante l'aura e anche durante l'accesso (se non vi è perdita di coscienza) il paziente avverte frequentemente paura, ansia, tristezza o rabbia senza riferimenti oggettivi precisi, unitamente a sensazioni viscerali sgradevoli; più raramente vengono riferiti sensi di benessere, piacere, euforia. Gli automatismi motori

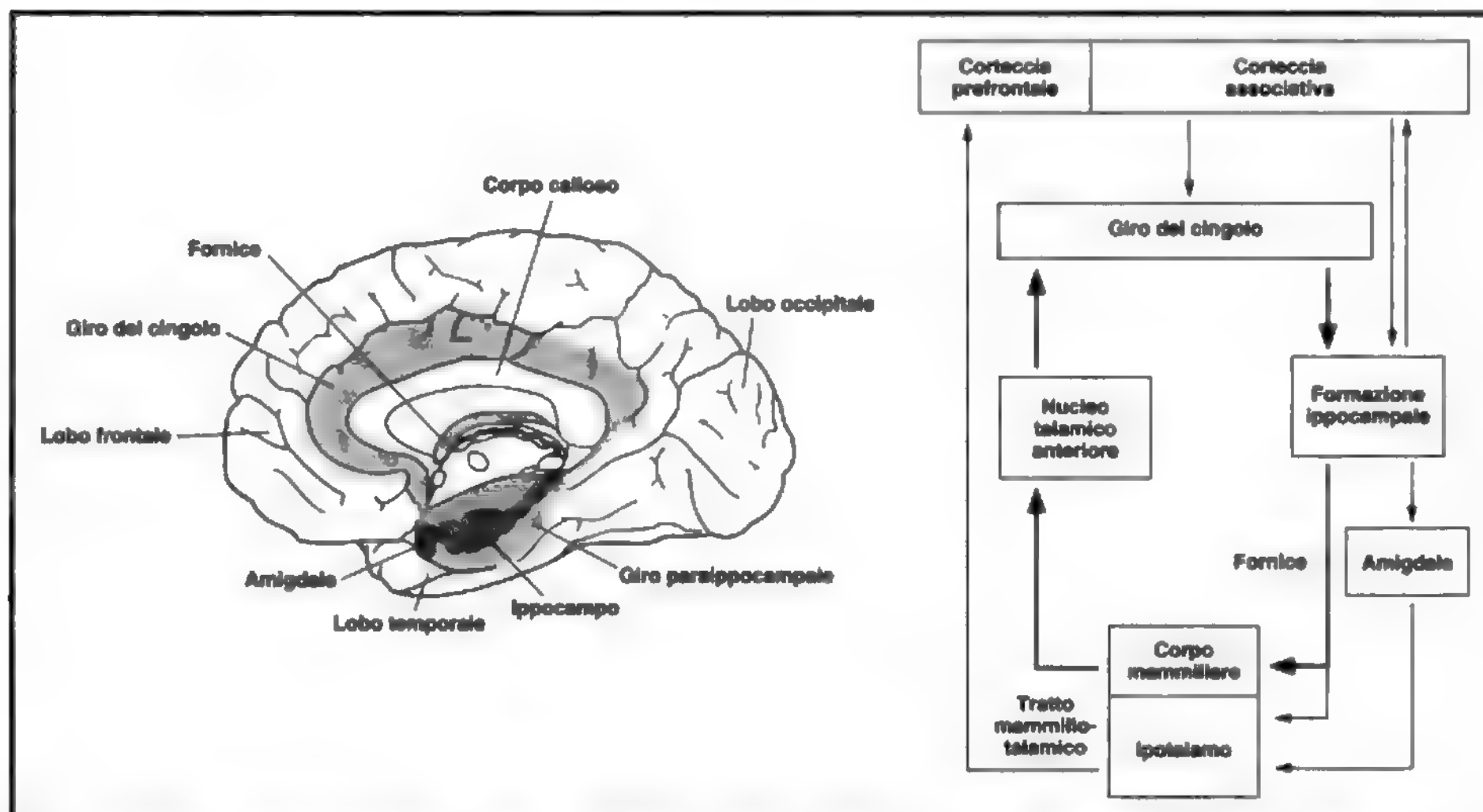


Fig. 1. A sinistra, il grande lobo limbico di Broca (in grigio); a destra, il circuito di Papez (freccie spesse) e le sue connessioni con altre strutture limbiche o isocorticali (freccie sottili).

accessuali, soprattutto mimici (pianto, riso, espressioni spaventate o irate), si accordano generalmente con l'esperienza soggettiva. La stimolazione elettrica applicata nella regione del focolaio durante operazioni neurochirurgiche in anestesia locale tende a riprodurre in questi pazienti la sintomatologia soggettiva ed oggettiva delle auro e degli accessi. Negli animali la stimolazione elettrica in regioni del s. l. evoca reazioni di aggressione e di difesa oppure comportamenti appetitivi alimentari e sessuali; inoltre gli animali possono segnalare di gradire la stimolazione di regioni limbiche (come anche di altre regioni sottocorticali) imparando ad autostimolarsi, oppure di non gradirla affatto apprendendo ad eseguire azioni che permettano di evitarla. Per converso, effetti contrari di riduzioni dell'emotività e dell'affettività sono stati descritti dopo lesioni limbiche. Un esperimento classico di Klüver e Bucy (1939) ha dimostrato che l'asportazione bilaterale della parte inferomediale del lobo temporale (includente l'ippocampo e l'amigdala) induce mansuetudine in macachi previamente molto aggressivi, oltre che altri sintomi di natura non emozionale, e Terzian e Dalle Ore (1955) hanno confermato questi effetti in un paziente epilettico con asportazione bilaterale del lobo temporale mediale. Lesioni della circonvoluzione del giro del cingolo interferiscono con il comportamento materno nei ratti e con la comunicazione vocale fra prole e madre nelle scimmie crisotrici (cfr. MacLean, 1990).

Sviluppi e revisioni attuali delle conoscenze anatomo-funzionali riguardanti il sistema limbico

La fig. 2 presenta in forma semplificata le conoscenze attuali sulle strutture tradizionalmente assegnate al s. l. e sulle loro connessioni afferenti ed efferenti. Vanno sottolineati gli ampi rapporti reciproci fra amigdala, formazione ippocampale e isocorteccia, l'importanza della corteccia peri- ed entorinale come porta d'ingresso della formazione ippocampale, la suddivisione dello striato ventrale (in particolare il nucleo *accumbens*) e dell'amigdala in nuclei o sottonuclei con connessioni differenziate, e la convergenza di proiezioni dalle strutture limbiche telencefaliche su vari nuclei ipotalamici. Informazioni da tutte le modalità di senso convergono dalle aree corticali corrispondenti sulla formazione ippocampale e sul nucleo basolaterale dell'amigdala, che riceve anche informazioni direttamente dai nuclei specifici di senso del talamo. Il senso dell'olfatto ha rapporti privilegiati, rispetto ad altre modalità di senso, con strutture limbiche in quanto il bulbo olfattivo e la corteccia piriforme proiettano direttamente allo striato ventrale, al nucleo corticale dell'amigdala e alla corteccia entorinale. (In passato gli stretti rapporti topografici fra strutture olfattive e lobo limbico avevano erroneamente suggerito una funzione primariamente olfattiva per l'ippocampo e altre strutture limbiche, giustificando il termine oggi disusato di *rinencefalo* per designare queste strutture). Infine le strut-

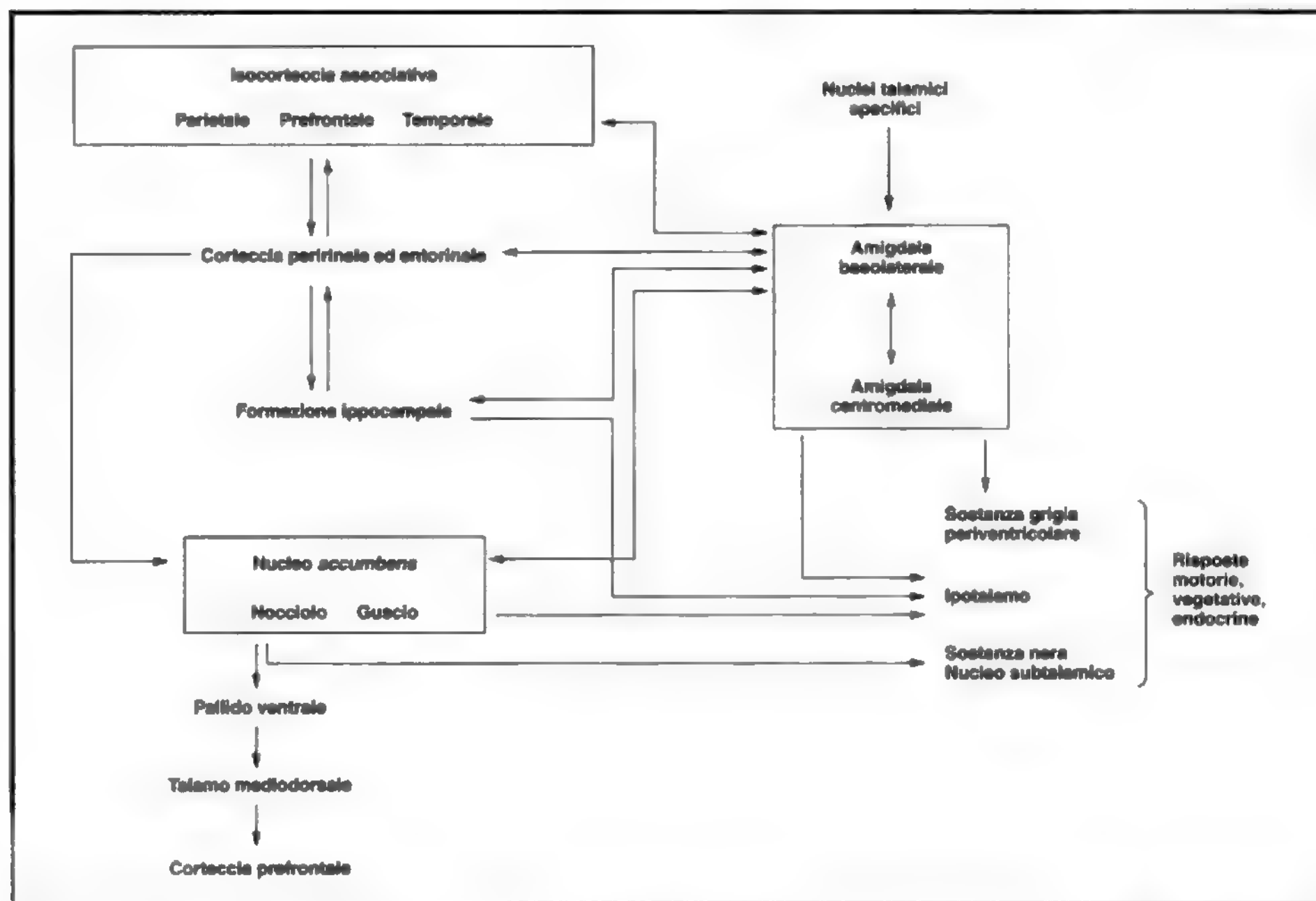


Fig. 2. Schema delle connessioni della formazione ippocampale, dell'amigdala e del nucleo *accumbens*. Non sono indicate le importanti connessioni con le altre strutture limbiche con i sistemi dopaminergici, noradrenergici, colinergici, serotoninergici e istaminergici del tronco dell'encefalo e del telencefalo, deputati alla regolazione del ciclo sonno-veglia e della reattività generale del sistema nervoso all'ambiente.

ture limbiche hanno ampi rapporti reciproci con i sistemi catecolaminergici e colinergici del tronco encefalico, del diencefalo e del telencefalo.

Le ragioni principali per revisionare i concetti classici sul lobo limbico sono le seguenti.

1. I componenti del *circuito di Papez* non hanno rapporti evidenti con le funzioni emozionali. In esperimenti su varie specie animali è stato dimostrato che la formazione ippocampale (subicolo, fascia dentata, corno d'Ammon) è particolarmente importante per la memoria dei luoghi e l'orientamento spaziale. Negli animali e nell'uomo le lesioni del corpo mammillare, del talamo anteriore e soprattutto della formazione ippocampale e delle aree corticali peririnali ed entorinali ad essa adiacenti interferiscono con la memoria, non con il comportamento emozionale. I pazienti con lesioni in queste sedi sono praticamente incapaci di memorizzare nuove informazioni relative a fatti, eventi, persone, luoghi, pur potendo ritenere le memorie antecedenti alle lesioni. Si ritiene pertanto che la formazione ippocampale, le regioni periarquicorticali adiacenti e altri componenti del circuito di Papez servano a formare memorie a lungo termine che vengono poi depositate in altre regioni cerebrali (Squire e Knowlton, 1995).

2. La struttura limbica avente funzioni emozionali è l'*amigdala* (LeDoux, 1995). L'*amigdala* è un complesso di nuclei situato fra lo striato e la corteccia piriforme, fornito di molteplici connessioni con strutture corticali e sottocorticali, che ha una importanza funzionale primaria per le emozioni negative (rabbia, frustrazione, tristezza, paura). I pazienti con degenerazione bilaterale dell'*amigdala* hanno difficoltà a riconoscere espressioni facciali della paura ma non di altre emozioni. Inoltre essi, come gli animali con lesioni sperimentali bilaterali dell'*amigdala*, non possono essere condizionati con il paradigma del cosiddetto condizionamento di avversione o di paura. Un animale o un uomo con sistema nervoso integro che riceva uno stimolo visivo o uditivo neutro seguito sistematicamente da uno stimolo doloroso o comunque sgradevole (ad es., un suono assordante), dopo poche stimolazioni comincia a rispondere allo stimolo neutro con la stessa reazione di avversione (aumento della sudorazione, della frequenza respiratoria e cardiaca e della pressione arteriosa) che è evocata incondizionatamente dallo stimolo sgradevole. Dopo la lesione bilaterale dell'*amigdala* i soggetti umani e animali percepiscono perfettamente gli stimoli neutri e sgradevoli ed esibiscono una normale reazione di avversione ai secondi stimoli, ma non trasferiscono la risposta agli stimoli neutri anche dopo ripetute presentazioni dei due tipi di stimolo. L'*amigdala* contiene due sistemi necessari al condizionamento di avversione: il complesso basolaterale, che ricevendo proiezioni da varie regioni corticali e sottocorticali è in grado di associare informazioni provenienti dai vari organi di senso; e il nucleo centrale che, ricevendo le proiezioni del complesso basolaterale e proiettando a sua volta all'ipotalamo laterale e alla sostanza grigia periacqueduttale, è in grado di emettere i comandi per la generazione delle risposte legate alla paura. Di queste risposte, l'ipotalamo laterale media quelle di carattere vegetativo, e la sostanza grigia periacqueduttale media quelle di carattere motorio. Esperimenti elettrofisiologici negli animali dimostrano che la risposta dei neuroni di un nucleo del complesso basolaterale ad uno stimolo uditivo viene potenziata a lungo termine se lo stimolo uditivo è associato ripetutamente con uno stimolo sgradevole. Pertanto l'importanza funzionale dell'*amigdala* sembra essere quella di registrare associazioni fra stimoli neutri e stimoli sgradevoli potenzialmente pericolosi, e quindi di formare memorie con contenuto emozionale. Gli effetti di mansuetudine susseguenti

alle lesioni del lobo temporale mediale (v. sopra) vengono oggi attribuiti all'asportazione dell'*amigdala*.

3. Una struttura limbica che recentemente ha attirato molta attenzione è il *nucleo accumbens*, che fa parte (con il tubercolo olfattivo) dello striato ventrale, cioè della sostanza grigia situata sotto il putamen e la testa del caudato. Esso riceve proiezioni dall'*amigdala* e da varie aree corticali, nonché dall'area tegmentale ventrale del mesencefalo (nucleo dopaminergico paranigrale). Una parte del *nucleo accumbens* (il «guscio», *shell*) sembra particolarmente importante per gli effetti di rinforzo e probabilmente anche per le emozioni positive (benessere, sollievo, piacere, euforia, estasi). La lesione delle afferenze dopaminergiche dal nucleo paranigrale al *nucleo accumbens* attenua od elimina il comportamento di autostimolazione e la sensibilità agli eventi rinforzanti naturali (ad es., gratificazioni alimentari e sessuali), e lo stesso effetto si ottiene con l'iniezione diretta di antagonisti della dopamina nel *nucleo accumbens*. Durante l'autostimolazione si osserva un aumento considerevole della concentrazione di dopamina nel *nucleo accumbens*, e varie sostanze che producono farmacologicamente questo effetto potenziano l'autostimolazione. Queste sostanze includono la simpamina (amfetamina), che favorisce la liberazione di trasmettitore da parte dei terminali dopaminergici, e la cocaina che inibisce il riassorbimento di dopamina da parte degli stessi terminali. Anche l'etanolo, la nicotina, l'eroina, le sostanze oppioidi endogene e le benzodiazepine aumentano con vari meccanismi la concentrazione di dopamina nel *nucleo accumbens*. Il guscio del *nucleo accumbens* proietta all'ipotalamo laterale e all'area preottica, ed è così in grado di controllare risposte motorie, vegetative ed endocrine; un'altra parte del *nucleo accumbens*, il cosiddetto «nocciolo» (*core*), proietta, tramite il pallido ventrale e la parte reticolata della sostanza nera, a nuclei talamici (nucleo mediodorsale, nuclei della linea mediana, parte mediale del nucleo ventrale laterale) che a loro volta proiettano alla corteccia prefrontale e cingolata e all'ippocampo, ed è pertanto in grado di influenzare ampi settori dell'attività nervosa. Gli animali da esperimento gradiscono autosomministrarsi per via sistemica o intracerebrale (tramite cannule impiantate appositamente) le sostanze che aumentano l'azione della dopamina sul *nucleo accumbens*. Poiché molte di queste sostanze sono notoriamente oggetto di abuso anche nell'uomo, la modulazione dopaminergica del *nucleo accumbens* può essere collegata in via ipotetica al fenomeno della tossicodipendenza umana (Robbins e Everitt, 1996) (v. anche: TOSSICOMANIE*, *neurobiologia delle tossicodipendenze*, col. *7131).

4. Nel cervello dei mammiferi esistenti le strutture limbiche mostrano uno sviluppo proporzionale a quello dell'isocorteccia, e quindi non si può affermare che esse non siano evolute rispetto alle strutture corrispondenti del cervello dei paleomammiferi.

Considerazioni conclusive

È evidente da quanto detto che, poiché componenti tradizionalmente assegnati al s. l. hanno funzioni molto diverse, il s. l. non può essere considerato un sistema funzionalmente unitario come, ad esempio, il sistema visivo. Inoltre, poiché i molteplici ruoli funzionali svolti da strutture limbiche nella memoria, nella motivazione e nel comportamento emozionale richiedono indubbiamente la partecipazione delle aree isocorticali e dei sistemi a proiezione diffusa del tronco dell'encefalo che regolano l'attenzione e il ciclo-sonno veglia, una separazione fra queste parti del sistema nervoso centrale e il s. l. può risultare arbitraria e artificiosa. Il fatto che il termine s. l. continui ad essere usato ampiamente nella letteratura scientifica indica che

LIMBICO SISTEMA

indubbiamente esso può essere utile al tentativo di distinguere i substrati delle grandi funzioni del sistema nervoso (Kötter e Meyer, 1992), ma le concezioni corrispondenti a questo termine variano sostanzialmente da un autore all'altro. Ad esempio, il termine può essere impiegato in senso puramente anatomico (la corteccia limbica: Lopes da Silva *et al.*, 1990), con significato funzionale limitato al comportamento emozionale e all'amigdala, e quindi con l'esclusione di componenti limbici classici (Damasio, 1994), oppure in un senso funzionale molto esteso, associandolo ad altri grandi settori del sistema nervoso come i gangli della base (il s. l. e dei gangli della base per il conseguimento di scopi: Gray, 1995). Sembra chiaro pertanto che al momento attuale qualsiasi impiego del termine s. l. non possa prescindere dalla precisazione della sua accezione.

V. anche: COMPORTAMENTO [v.; v.*]; EMOZIONE; MEMORIA [v.; v.*]; MOTIVAZIONE.

Bibliografia

- Damasio A. R., *Descartes' Error. Emotion, Reason and The Human Brain*, 1994, Putnam, New York.
Gray J. A., *A model of the limbic system and basal ganglia: Applications to anxiety and schizophrenia*, in Gazzaniga M. S. ed., *The Cognitive Neurosciences*, 1995, MIT Press, Cambridge MA, pp. 1165-1176.
Klüver H., Bucy P. C., *Archives of Neurology and Psychiatry*, 1939, 42, 979-1000.
Kötter R., Meyer N., *Behavioural Brain Research*, 1992, 52, 105-127.
LeDoux J. E., *Annual Review of Psychology*, 1995, 46, 209-235.
Lopes da Silva F. H., Witter M. P., Boeijinga P. H., Lohman A. H. M., *Physiological Reviews*, 1990, 70, 453-511.
MacLean P. D., *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 1952, 4, 407-418.
MacLean P. D., *The Triune Brain in Evolution: Role in Paleocerebral Functions*, 1990, Plenum Press, New York.
Papez J. W., *Archives of Neurology and Psychiatry*, 1937, 38, 725-743.
Robbins T. W., Everitt B. J., *Current Opinion in Neurobiology*, 1996, 6, 228-236.
Squire L. R., Knowlton B. J., *Memory, hippocampus and brain systems*, in Gazzaniga M. S. ed., *The cognitive neurosciences*, 1995, MIT Press, Cambridge MA, pp. 825-837.
Terzian H., Dalle Ore G., *Neurology*, 1955, 5, 373-380.

GIOVANNI BERLUCCHI

LINFEDEMA

F. *lymphoedème*. - I. *lymphedema*. - T. *Lymphoedem*. - S. *linfedema*.

SOMMARIO

Definizione e introduzione (col. 3179). - **Etiologia e patogenesi** (col. 3180). - **Clinica e diagnostica strumentale** (col. 3181). - **Stadiazione** (col. 3185). - **Terapia** (col. 3186).

Definizione e introduzione

Viene definito linfedema (l.) quel particolare quadro patologico caratterizzato da uno stato di tumescenza dei tessuti molli, per solito superficiali, dovuto all'accumulo per stasi, nello spazio interstiziale, di liquido ad alto contenuto proteico, la linfa. Il l. trova la propria origine nella riduzione della capacità di trasporto del sistema linfatico, determinata dalla ostruzione o dallo sviluppo anomalo dei vasi linfatici e/o dei linfonodi del distretto corporeo interessato.

Generalmente ad evoluzione cronica, ma talora anche a manifestazione acuta, il l. prevalentemente si riscontra a carico degli arti, più frequentemente quelli inferiori, potendo localizzarsi altresì ai genitali esterni, o addirittura all'entero.

Condizioni di stasi linfatica interessanti distretti viscerali sono più comunemente indicati con il termine di linfostasi. Nei casi in cui la stasi non sia semplicemente espressa dal-

l'accumulo di linfa, ma di chilo proveniente dalla cavità addominale, è più appropriato il termine di *chiledema*.

Etiologia e patogenesi

In generale, dal punto di vista nosografico, si distinguono i l. in «primari» e «secondari».

Sono definiti «primari» i l. che non riconoscono una causa chiaramente identificabile (l. idiopatici), anche se spesso è possibile individuarne uno o più fattori etiologici scatenanti. Rientrano, in genere, in questa categoria anche i l. «congeniti propriamente detti», così definiti perché già manifesti alla nascita. Talora i l. congeniti riconoscono una base eredo-familiare (malattia di Nonne-Milroy), che può trovare riscontro, ma non costantemente, nella evidenziazione di una anomalia cromosomica.

Eccezionalmente, un l. congenito può conseguire a briglia amniotica o associarsi ad altre patologie congenite (ad es., quando localizzato ad un arto inferiore, ad una lussazione o sublussazione congenita d'anca).

In genere, i l. primari si manifestano dopo la nascita e, a seconda dell'epoca di comparsa, possono essere a manifestazione precoce o tardiva, riconoscendo come fattori «scatenanti» un trauma anche banale, un'infezione, o un intervento chirurgico, e, come fattori predisponenti, soprattutto nel sesso femminile, epoche specifiche della vita sessuale (pubertà, gravidanza, menopausa), o alterazioni dello status neuro-ormonale (l. cosiddetti neuro-endocrini).

Dal punto di vista fisiopatologico, patogenetico ed anatomopatologico, i l. primari possono trovare riscontro in quadri di ipoplasia, iperplasia, displasia linfatico-linfonodale e di alterata linfogenesi. Le anomalie dello sviluppo del circolo linfatico possono interessare specificamente i linfonodi, i vasi linfatici oppure entrambi tali ordini di strutture. Ma bisogna tenere presente che, nella maggior parte dei casi di ipoplasia, è possibile dimostrare un quasi costante coinvolgimento dei gangli linfatici, tale da giustificare un quadro ostruttivo del tutto sovrapponibile, sul piano fisiopatologico e diagnostico, a quello dei classici l. secondari a linfadenectomia e/o terapia radiante.

Ipo- e displasie linfatico-linfonodali sono alla base di circa il 90% dei casi di l. primario. Esse riguardano sia il numero dei linfonodi e/o collettori linfatici del distretto interessato dalla malattia, sia la struttura parietale e/o valvolare dei vasi e dei gangli. L'iperplasia presente nell'8-10% dei l. primari, prevalentemente interessa il numero dei collettori linfatici, aumentato in modo abnorme nel distretto interessato e si associa generalmente a displasia strutturale linfatico-linfonodale. La base ipo-displasica di molti l. cosiddetti primari può trovare anche riscontro nella ridotta capacità di formazione e di attivazione di un adeguato circolo collaterale, nelle circostanze in cui tale supplenza risulti necessaria (ad es., a seguito di traumi, infezioni, interventi chirurgici, etc.).

Altrettanto importanti sono le alterazioni della linfogenesi, quanto, quelle della linfodinamica. Uno stato di «iperlinfogenesi» può conseguire alla esistenza di quadri di iperstomia artero-venosa distrettuale oppure a fistole artero-venose (come, ad es., nella malattia di Klippel-Trénaunay) o angiodisplasie affini.

La condizione di ridotta o mancata linfogenesi, per agenesia, ipoplasia o alterata permeabilità della parete dei cosiddetti linfatici iniziali (o capillari linfatici), rappresenta una evenienza molto rara, se non eccezionale.

Tra le alterazioni linfodinamiche, infine, a parte quelle da insufficiente drenaggio della linfa lungo le vie anatomicamente precostituite, cui si è già fatto riferimento, è essenziale segnalare anche il reflusso di linfa e/o di chilo dall'alto verso il basso, per incompetenza o insufficienza dei mezzi

intrinseci antigravitazionali (Tosatti, 1974), normalmente rappresentati dalle valvole, dalla struttura reticolo-mio-elastica della parete dei collettori linfatici e dall'architettura strutturale degli stessi gangli linfatici (l. e chiledemi da re-flusso gravitazionale).

I l. secondari, con differenza dai primari, riconoscono moventi etiologici chiaramente identificabili sul piano anamnestico e clinico (l. definibili anche come acquisiti). Possiamo così distinguere l. post-traumatici, post-infettivi e post-infiammatori (post-linfangitici, post-flebitici, etc.), da radioterapia, da chirurgia, da paralisi, da neoplasia (primitiva o secondaria), da infestazione parassitaria (*Filaria bancrofti*). Questi ultimi risultano a carattere endemico in alcune aree tropicali o sub-tropicali dell'Asia, dell'Africa e del Sud-America.

È tuttavia doveroso precisare che, non raramente, anche i l. cosiddetti secondari o acquisiti riconoscono una base di predisposizione congenita. È noto, che lo stesso l. post-mastectomia, la cui incidenza varia dal 5 al 35% dei casi, in relazione anche all'associazione o meno della terapia radiante a quella chirurgica, si verifica con maggiore probabilità nei casi in cui è dimostrabile l'assenza (per anomalia anatomica od ostruzione secondaria al trauma chirurgico, alla terapia radiante o ad una linfangite acuta) della via deltoidea che salta l'ascella drenandosi direttamente nelle stazioni linfoghiandolari sopraclaveari. Lo studio preventivo linfangioscintigrafico comparativo dell'arto superiore omolaterale alla sede della neoplasia mammaria potrebbe individuare categorie di pazienti a maggior rischio per la comparsa di un l. secondario, suscettibili di misure terapeutiche preventive.

Fattori predisponenti di displasia congenita parieto-valvolare dei collettori linfatici sono chiamati in causa da alcuni AA. persino nel l. da *Filaria* (Jamal *et al.*, 1994).

Pertanto, sulla guida di tali cognizioni, appare tuttora valida la classificazione dei l. proposta da Tosatti, già trent'anni orsono (tab. I).

Clinica e diagnostica strumentale

La diagnosi del l. si basa, innanzitutto, sull'anamnesi e sull'esame obiettivo, che consentono di precisare l'epoca e la modalità di comparsa della patologia, la localizzazione, l'evoluzione e, di conseguenza, l'estensione, il volume, le

caratteristiche fisico-semeiologiche del l., più specificamente ponendone la diagnosi differenziale dal flebedema.

Il l. ha una consistenza dura, mentre l'edema venoso è molle (caratteristico, in quest'ultimo, il segno della *fovea* alla compressione digitale). Tale differenza dipende, sostanzialmente, dal fatto che la linfa stagnante rappresenta un ottimo *pabulum* per i fibroblasti del tessuto connettivo-sottocutaneo, che maturano più rapidamente in fibrociti, provocando la formazione di tessuto connettivo fibro-sclerotico.

L'edema linfatico ha una localizzazione tipicamente rizomelica o totale («a colonna»), mentre l'edema venoso ha una ubicazione acromelica, fatta eccezione per la *phlegmasia alba/coerulea dolens*, da tromboflebite acuta profonda del distretto femoro-iliaco.

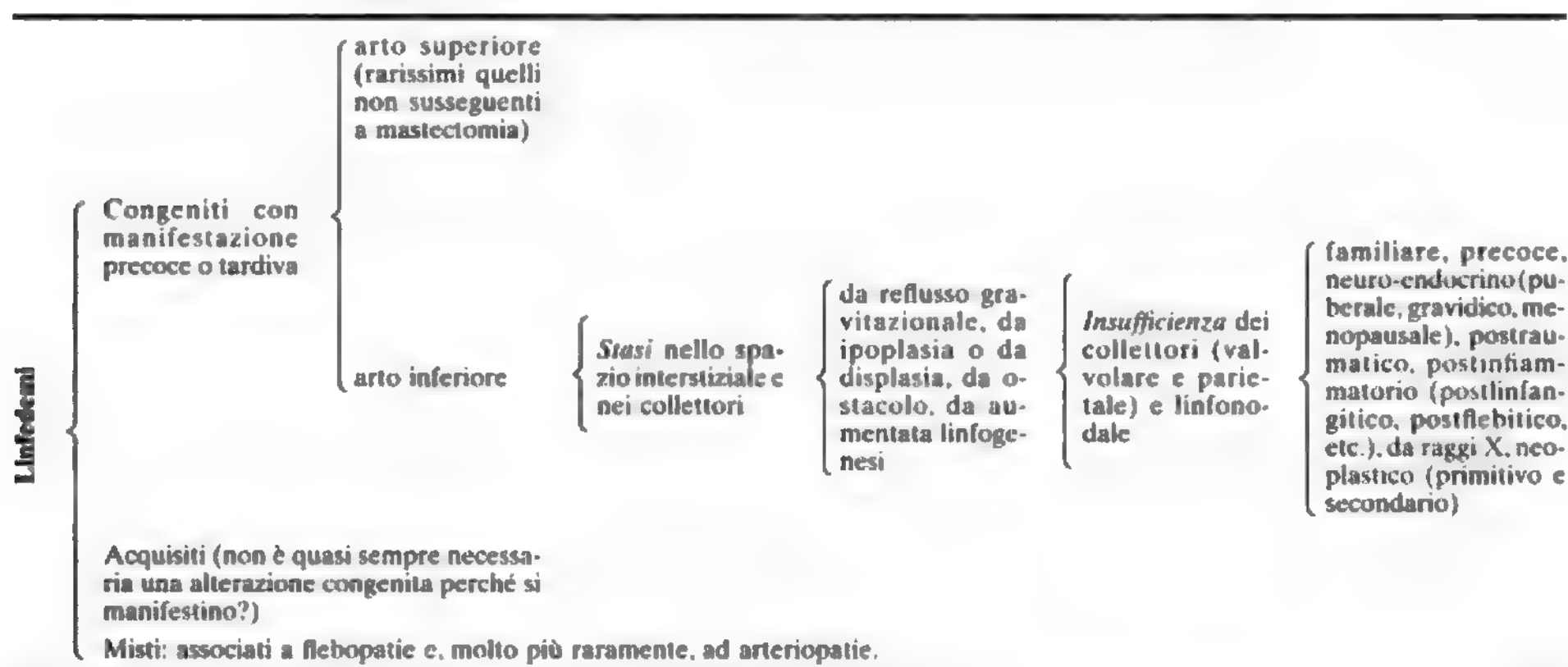
Il l., a differenza dal flebedema, non evolve di solito verso lesioni cutanee distrofiche-discromiche, sino all'ulcera, ma va facilmente incontro a complicanze linfangitiche acute, reticolari diffuse o erisipeloidi, dovute ad infezioni da cocci grampositivi, favorite dalla stasi linfatica.

Il flebedema spesso si associa a varici e varicoflebiti; al contrario del l. esso subisce, specialmente dopo il riposo notturno, modificazioni posturali rapide e si caratterizza, per una velocimetria venosa Doppler alterata, con aumento significativo della pressione venosa in clino- ed ortostatismo (Bartolo, 1983).

Tuttavia, esistono forme miste di linfo-flebedema o di flebolinfedema, a prevalente componente venosa (come nella sindrome post-flebitica al III stadio) o linfatica. Delle forme miste fa parte il quadro assai più complesso di un'angiopatia caratterizzata dall'esistenza di macro o micro fistole congenite, artero-venose (come nella sopracitata malattia di Klippel-Trénaunay), da gigantismo con allungamento dell'arto colpito e dismorfismo più o meno marcati del piede (eccezionale la localizzazione all'arto superiore), da angioma piano a carta geografica con colorazione rossa «vino porto» e iperidrosi della superficie plantare.

Esistono peraltro forme spurie, mascherate dalla predominanza del l. e, quindi, più difficilmente riconoscibili. In questi casi lo studio del circolo arterioso e di quello venoso e, in particolare, la misurazione della pressione venosa con metodica Doppler possono risultare dirimenti, giustificando ulteriori indagini strumentali (dalla flebosintigrafia alla

TAB. I. CLASSIFICAZIONE ETIOPATOGENETICA DEI LINFEDEMI



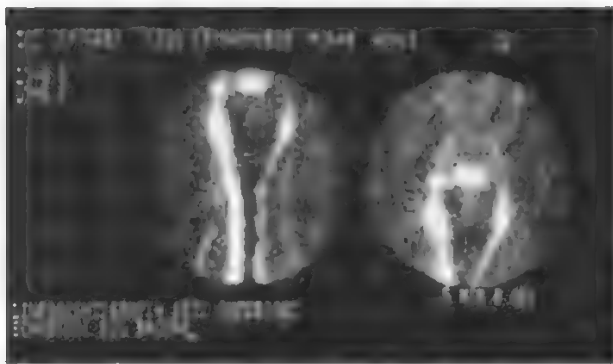


Fig. 1. Linfo-scintigrafia degli arti inferiori, che evidenzia una marcata dilatazione dei collettori linfatici mediali della gamba e della coscia bilateralmente, a dimostrazione di una patologia da reflusso gravitazionale linfatico-chiloso.

flebografia, sino all'arteriografia digitale quando esista il sospetto specifico di un'angiopatia).

Allo stato attuale le metodiche più indicate per lo studio del l., sono la linfoangioscintigrafia o linfografia radioisotopica e la linfoangiografia diretta.

La linfoangioscintigrafia è la metodica di «screening» maggiormente utilizzata per lo studio dei linfedemi (fig. 1) e, non essendo sostanzialmente invasiva, è facilmente ripetibile nel «follow-up» dei pazienti, specialmente dopo il trattamento microchirurgico.

L'esame viene praticato iniettando in sede dermo-ipodermica, negli spazi interdigitali, una piccola dose di un tracciante (Tecnecio- Tc^{99m}) adsorbito a sferule colloidali (solfuro colloidale, renio, destrano, etc.), il cui linfo-tropismo consente sia la visualizzazione con una gamma-camera delle vie collettrici linfatiche «preferenziali», sia la valutazione della velocità di transito e la captazione linfonodale.

La misurazione della clearance del tracciante rappresenta un parametro molto utile dal punto di vista linfo-dinamico.

La linfoangiografia diretta con Lipiodol® ultrafluido, iniettato in un collettore linfatico del dorso del piede o della mano, isolato preferibilmente con tecnica microchirurgica (fig. 2), è più particolarmente indicata nello studio dei l. o dei chiledemi degli arti inferiori e/o dei genitali esterni da reflusso gravitazionale, suscettibili di trattamento chirurgico (Kinmonth, 1982). Tale indagine, leggermente invasiva

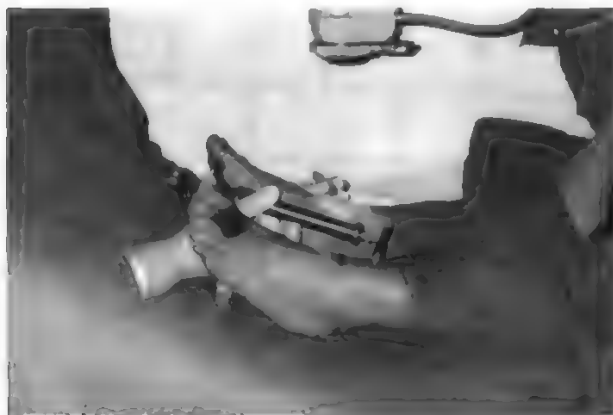


Fig. 2. Linfografia eseguita con tecnica microchirurgica.

non è del tutto scevra da complicanze, peraltro assai rare, di ordine generale (microembolia polmonare, nel caso dell'esistenza di fistole linfo-venose periferiche; reazione di tipo anafilattico al Lipiodol), o locale (infezione nella sede dell'incisione cutanea, linfoangite acuta, linfoforrea, etc.). Tuttavia, se praticata secondo norme assai ben codificate, la linfoangiografia diretta non comporta sequele statisticamente degne di rilievo. Tale esame, che può anche essere praticato in età pediatrica, consente lo studio morfo-funzionale, del circolo superficiale e, facendo ricorso a particolari accorgimenti tecnici, anche di quello profondo (fig. 3).

In ogni caso, la linfoangioscintigrafia rappresenta l'indagine di prima istanza, legittimando il ricorso alla linfoangiografia solo nei casi di dubbia interpretazione e, comunque, suscettibili di trattamento chirurgico.

La metodica di linfoangiografia indiretta che fa ricorso all'iniezione dermo-ipodermica di un mezzo di contrasto idrosolubile (Iotasul®), pur essendosi dimostrata utile a chiarire alcuni aspetti etiopatogenetici dei l. primari, non è entrata a tutt'oggi nella corrente pratica clinica. Altrettanto si può affermare per la microlinfografia fluoresceinica (Bollinger *et al.*, 1981).

Il classico test linfo-cromico di Hudack-McMaster, che utilizza l'iniezione intradermica-sottocutanea di una modesta quantità di un colorante vitale, dotato di spiccato linfo-tropismo (Bleu Patent V), viene oggi impiegato come tempo preliminare della linfoangiografia diretta e delle operazioni microchirurgiche, allo scopo di consentire un più rapido ed agevole riconoscimento dei collettori linfatici. I recenti studi di Olszewski e Bryla (1994) e di Campisi (1991-95) hanno messo a punto una metodica di misura della pressione endolinfatica e del flusso linfatico. Tali parametri, insieme con la valutazione della pressione venosa, consentono la misurazione del gradiente pressorio linfo-venoso, essenziale per il corretto approccio terapeutico microchirurgico del linfedema. Tale metodica comporta l'isolamento e l'incannulamento di un collettore linfatico al terzo inferiore della superficie mediale della gamba.

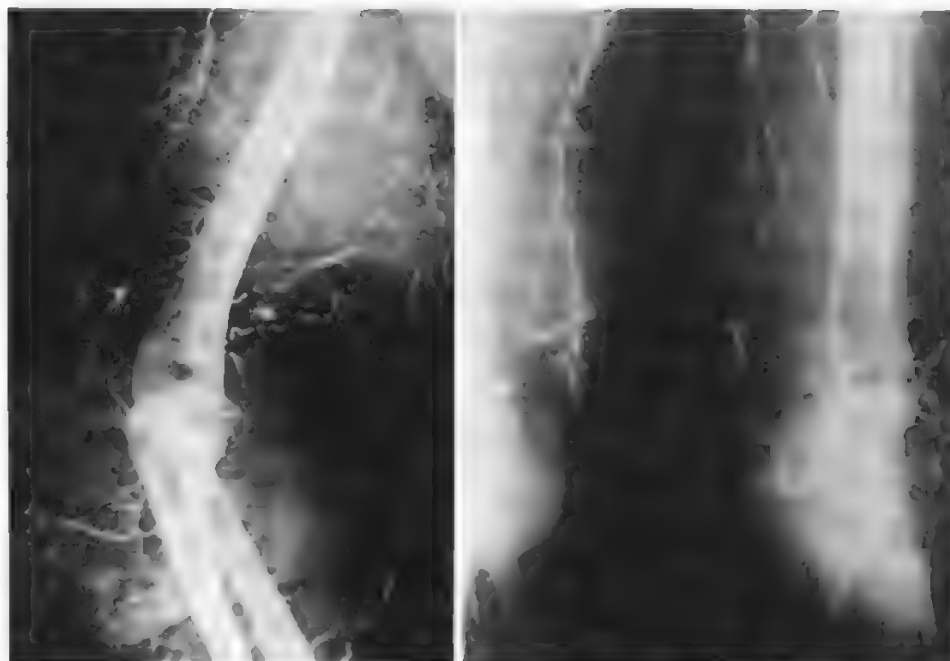
Degni di notevole interesse si stanno dimostrando gli studi con le metodiche di diagnostica per immagini, quali ecotomografia, tomografia computerizzata e soprattutto, risonanza magnetica nucleare (linfo-RMN).

Sulla guida delle ricerche sperimentali effettuate sul cane (Chang, 1985) sono state registrate in pazienti con l. (Olszewski e Bryla, 1994) e, in particolare, in quelli candidati alla microchirurgia (Campisi *et al.*, 1994), le deviazioni dalla norma del flusso e della pressione linfatica (tab. II). In ac-

TAB. II. VARIAZIONI DEL FLUSSO E DELLA PRESSIONE LINFATICA IN CONDIZIONI NORMALI E NEL LINFEDEMA

Parametri	Normale	Linfedema
Contrazioni spontanee	Presenti	Rare
Componente pressoria idrostatica	Assente	Presente
Pulsatilità linfatica	6/min a riposo, 18/min dinamica	Irregolare, se presente
«End-pressure» dinamica	40 mmHg	200-300 mmHg
Contrazioni muscolari	Non aumentano il flusso linfatico	Incremento del flusso linfatico
Supporto elastico	Non aumenta il flusso linfatico	Incremento del flusso linfatico

Fig. 3. Linfoangiografia dell'arto superiore (a sinistra: l. post-mastectomia) e dell'arto inferiore (a destra: l. da reflusso gravitazionale).



cordo a quanto preconizzato da Yamada (1969) questi studi hanno dimostrato che l'esistenza di un valido gradiente linfatico-venoso e soprattutto il suo stabile mantenimento specie in assenza di attività (come avviene durante il riposo notturno) è premessa all'intervento microchirurgico di cui condiziona i risultati a medio e lungo termine (fig. 4).

Stadiazione

A parte gli eccezionali casi di l. acuto post-linfangitico e/o post-traumatico, il l. solitamente si presenta come un'affezione ad andamento cronico, evolutivo, ingravescente ed invalidante, caratterizzata dall'aumento volumetrico progressivo dell'arto o degli arti colpiti, sino all'elefantiasi, con marcata compromissione funzionale.

La malattia, che evolve per stadi (tab. III), si caratterizza per le frequenti complicanze linfangitiche acute, erisipeloidi, ricorrenti, con grave stato settico conseguente, la cellulite indurativa dermato-liposclerotica, le linfoadeniti cro-

TAB. III. PROCEDURE TERAPEUTICHE IN RAPPORTO AGLI STADI EVOLUTIVI DEL LINFEDEMA

I stadio <i>Edema iniziale ed irregolare</i>	Terapia medica, drenaggio linfatico manuale e meccanico, contenzione elastica
II stadio <i>Edema persistente</i>	Terapia medica, drenaggio linfatico manuale e meccanico, contenzione elastica Microchirurgia
III stadio <i>Edema persistente ed ingravescente (linfangiti acute)</i>	Terapia medica, drenaggio linfatico manuale e meccanico, contenzione elastica Termoterapia Microchirurgia
IV stadio <i>Fibrolinfedema</i>	Terapia medica Drenaggio linfatico manuale e meccanico Contenzione elastica Microchirurgia
V stadio <i>Elefantiasi propriamente detta</i>	Chirurgia plastica riduttiva differita

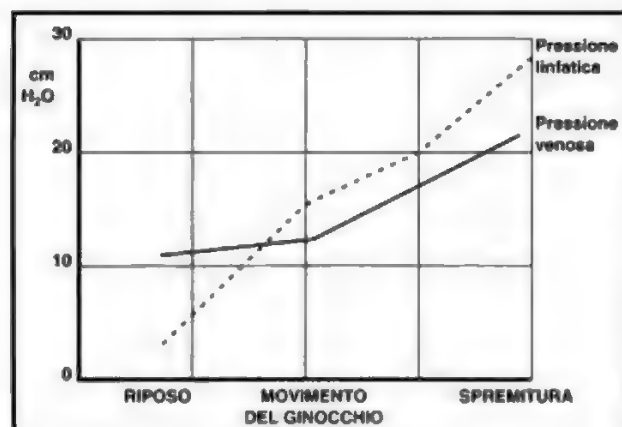


Fig. 4. Variazioni della pressione linfatica e venosa, statiche e dinamiche.

niche fibro-sclerotiche (nei l. primari) e la verrucosi linfostatica (fig. 5). Complicanza rara, più particolarmente nel l. post-mastectomia, è il tralignamento verso un linfangiosarcoma (v. STEWART-TREVES, SINDROME DI**), da non confondere con la disseminazione di eventuali recidive locali cutanee del carcinoma mammario.

Talora è possibile osservare l'associazione del linfedema, più particolarmente nella localizzazione agli arti inferiori, con la malattia di Kaposi, non obbligatoriamente legata, quest'ultima, ad una immunodeficienza acquisita da HIV.

Terapia

Alla fine degli anni '60, le soluzioni terapeutiche proponibili per la cura del linfedema erano davvero scarse. Solo i



Fig. 5. L. dell'arto superiore (in alto: l. post-mastectomia al IV stadio; in basso: l. post-lingfangitico al III stadio).

casi più gravi ed avanzati di elefantiasi (v.) propriamente detta venivano sottoposti a trattamento chirurgico, essenzialmente allo scopo di ridurre il volume degli arti linfede-matosi. Le metodiche principalmente adottate erano quelle di Charles (1912) o cutolipofasectomia totale, di Thompson (1967), o drenaggio con un lembo dermico scarificato sottofasciale, e di Servelle (1947), o linfoangectomia totale superficiale. Trattandosi di interventi ampiamente demolitivi e cruenti, questi non potevano essere proposti per il trattamento delle forme meno avanzate o iniziali della malattia e tanto meno in età pediatrica.

Ma, grazie soprattutto agli studi fisiopatologici e clinici realizzati particolarmente da Foldi (1973), si poterono porre le premesse per un trattamento medico-fisico conservativo, giungendo all'ideazione della tecnica di linfo-drenaggio manuale codificata sul piano clinico da Vodder (1969), dallo stesso Foldi e da Leduc (1980). Anche le metodiche di terapia compressiva pneumodensiva, con apposite apparecchiature all'uopo realizzate di cui esistono in commercio diversi tipi (ad aria, a mercurio), registrarono un progressivo miglioramento ed una graduale diffusione.

Il trattamento medico specifico, prevede l'impiego degli antibiotici, in particolare della penicillina secondo i protocolli a lungo termine proposti da Olzewski (1994), nei casi di l. con linfoangiti acute erisipeloidi ricorrenti, degli antinfiammatori, di blandi diuretici somministrati all'occorrenza e, comunque, tutti associati alle indispensabili misure igieniche e all'uso pressoché costante di opportuni bendaggi e tutori elastici. Da alcuni anni è stata segnalata la scoperta degli effetti terapeutici dei benzopironi legata fondamentale-mente agli studi di Casley-Smith J. R. e Casley-Smith J. R.

(1986). Ma il corretto impiego di tale categoria di farmaci non è stato ancora definitivamente codificato per il trattamento del l.

Anche la termoterapia dell'antica medicina cinese (for-ni) o di quella latino-mediterranea (impacchi caldo-umidi), recentemente riproposta in versione moderna, rispettivamente, da Chang (1985) (calore secco prodotto da microonde) e da Campisi, Boccardo e Tacchella (1994) (aria calda e umida in circuito chiuso), per il trattamento del l. post-linfoangitico, non ha ancora ricevuto, pur con gli incoraggianti risultati ottenuti, un consenso unanime.

L'esistenza di casi resistenti al trattamento conservativo, la necessità di abbreviare la durata della malattia, di evitare al paziente frequenti e lunghi ricoveri, di consentirgli un ritorno alla vita familiare e di lavoro hanno stimolato la ricerca di nuove più idonee soluzioni chirurgiche, non più resettive e sintomatiche, ma bensì volte a correggere i meccanismi del l.

Già all'inizio degli anni '70, Tosatti (1974) aveva proposto un metodo di legatura antigravitazionale dei collettori linfatici dilatati ed insufficienti, per il trattamento della linfo-stasi degli arti inferiori e/o dei genitali esterni dovuta al reflusso gravitazionale.

Questa metodica rappresenta uno dei primi modelli di approccio chirurgico funzionale diretto ai vasi linfatici e/o ai linfonodi.

L'avvento della microchirurgia ha dato un contributo determinante a questo nuovo orientamento. Si sono imposte le tecniche di anastomosi linfoveno-venose e linfoatico-venose multiple (Degni, 1974; Olzewski, 1984), mentre l'arricchirsi dell'esperienza clinica (Campisi *et al.*, 1994) e il perfezionarsi degli strumenti e delle tecniche operatorie hanno consolidato e diffuso le conoscenze della linfoangio-

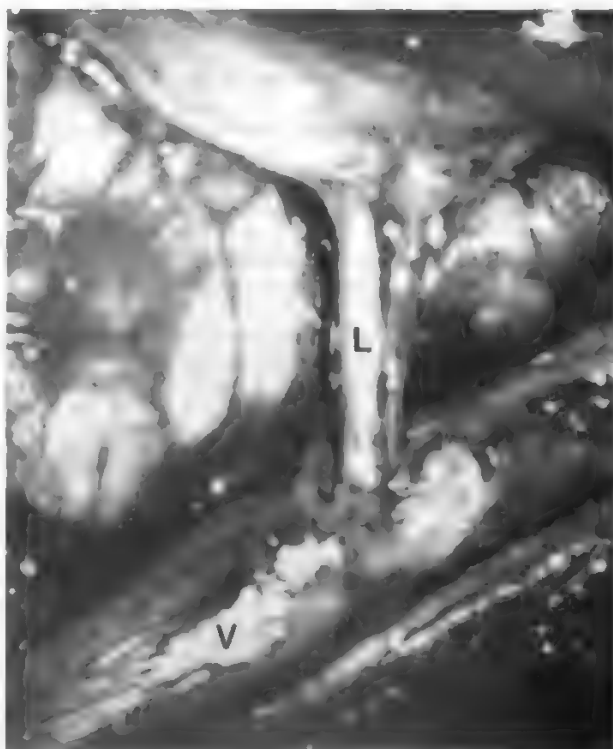


Fig. 6. Anastomosi linfoatico-venose multiple termino-laterali (LVA: Lymphatic-Venous Anastomosis).

logia e i risultati della microchirurgia linfatica. Di queste metodiche possono avvantaggiarsi non solo i l. secondari, ma anche quelli primari, potendosi intervenire precocemente in età pediatrica con alcune opportune varianti tecniche quali l'anastomosi linfatico-capsulo-venosa (Campisi *et al.*, 1994).

Nella stragrande maggioranza dei cosiddetti l. primari, soprattutto degli arti inferiori, esistono infatti alterazioni istopatologiche linfonodali (fibrosclerosi pulpale, con dilatazione dei collettori linfatici afferenti ed iperplasia leiomuscolare parietale), che contrassegnano la natura ostruttiva anche di questo tipo di linfedemi, in analogia a quelli secondari (Campisi *et al.*, 1994).

Pertanto, la microchirurgia linfatica «derivativa» (Campisi *et al.*, 1991) trova nelle anastomosi linfatico-venose multiple la sua tipica espressione (fig. 6).

Per i casi, in cui alla patologia linfostatica si associ anche una patologia venosa (dall'ipertensione venosa alle varici, dalle tromboflebiti acute superficiali e/o profonde alle sequele post-flebitiche), tale da controindicare un intervento derivativo linfatico-venoso, sono state messe a punto più recentemente metodiche di microchirurgia linfatica «ricostruttiva» (Campisi *et al.*, 1995). È così possibile ottenere risultati soddisfacenti a lungo termine ricorrendo all'im-

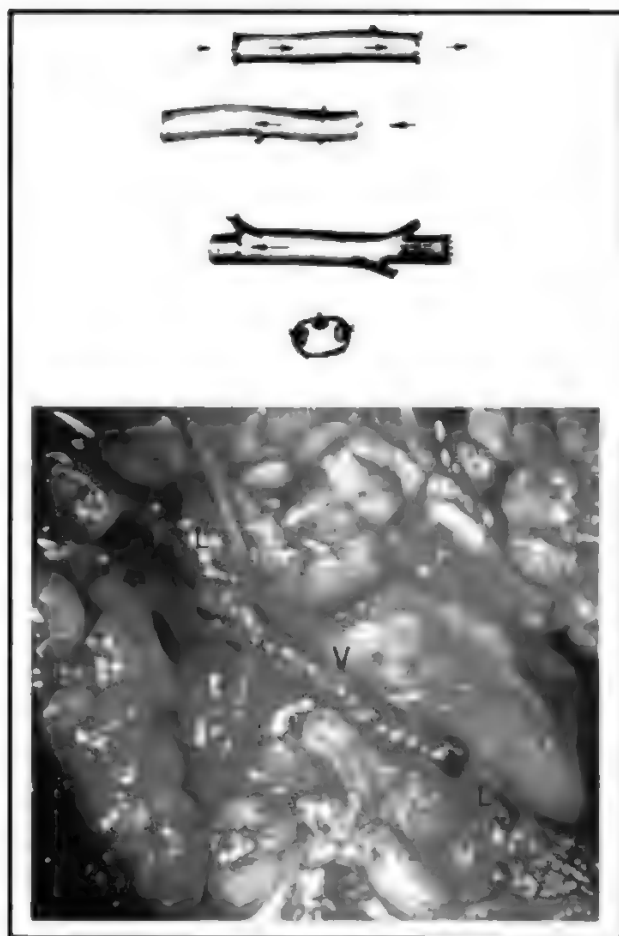


Fig. 7. Anastomosi linfatico-veno-linfatiche (LVLA: *Lymphatic-Venous-Lymphatic Anastomosis*) o linfatico-veno-linfatico-plastica (in alto: disegno schematico; in basso: anastomosi al microscopio operatore: 25 $\times$).

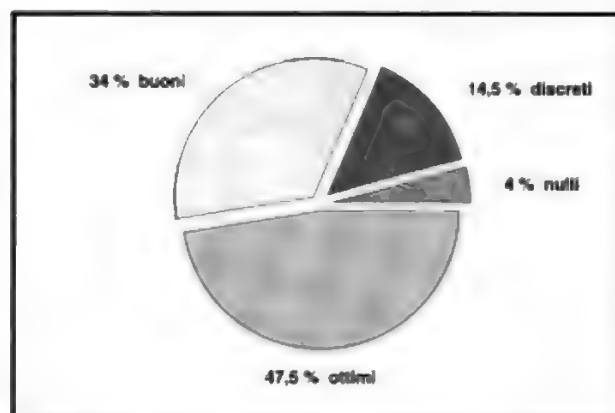


Fig. 8. Risultati clinici a 5 anni dall'intervento di microchirurgia linfatica. I risultati sono stati considerati ottimi quando la riduzione dell'edema era > 75%; buoni con riduzione dell'edema tra il 75% e il 50%; discreti tra 50 e 25%; nulli al di sotto del 25%.

piego di autotrapianti segmentali di collettori linfatici, la cui applicazione è possibile solo per il trattamento di un l. a localizzazione monolaterale (Campisi, 1984; Baumeister, 1988) oppure, alla interposizione di innesti venosi autologhi o linfatico-veno-linfatico-plastica (Campisi *et al.*, 1991): questa metodica (fig. 7) di più semplice e rapida realizzazione, rispetto all'altra, consente di trattare simultaneamente un l. a localizzazione anche bilaterale; molto rara è la possibilità, specie nei l. secondari, di poter realizzare, in alternativa all'innesto venoso o linfatico, un'anastomosi diretta termino-terminale tra collettori linfatici a monte e a valle dell'ostacolo.

Il ricorso all'impiego di lembi liberi microvascolari linfatico-linfonodali (Becker, 1991; Trévidic *et al.*, 1994), tutt'ora in via di sperimentazione clinica, rappresenta una suggestiva prospettiva al trattamento di l. non responsivi ad un corretto intervento medico-fisico conservativo, i quali tuttavia non possano avvantaggiarsi, per cause congenite (aplasia o ipoplasia) o acquisite (elefantiasi con linfangiti ostruttive diffuse), delle tecniche microchirurgiche derivate o ricostruttive già citate.

In un controllo programmato a 1, 3, 6, 12 mesi e una volta all'anno per i primi 5 anni dopo l'intervento, i risultati della microchirurgia linfatica possono risultare positivi in una percentuale superiore all'80% dei casi (fig. 8), con maggiore evidenza nei pazienti operati più precocemente, al II o al III stadio (figg. 9 e 10).

Nel panorama terapeutico globale del l. è assai possibile definire il ruolo che spetta alla chirurgia nei confronti del trattamento conservativo medico-fisico (tab. IV).

La cosiddetta *combined physiotherapy* (Foldi, 1994), rap-

TAB. IV. APPROCCIO TERAPEUTICO NEL LINFEDEMA

Terapia medica	Terapia fisica
Benzopironi	Contenzione elastica
Misure igieniche	Bendaggi
Antibiotici (linfangiti)	Drenaggio linfatico manuale
	» » meccanico ad aria
	» » » a mercurio
Termoterapia	Microchirurgia
Microonde	Derivativa
Aria calda e umida	Ricostruttiva



Fig. 9. In alto, a sinistra: l. primario dell'arto superiore in un bambino; al centro: prima dell'intervento; a destra: dopo 1 anno dall'intervento. In basso: l. post-mastectomia (a sinistra: prima dell'intervento; a destra: dopo 3 anni).

presenta la soluzione terapeutica di prima scelta per la maggior parte dei l. Nei casi non responsivi (che possono giungere sino al 30-40%), il ricorso quanto più precoce possibile alla microchirurgia linfatica permette di recuperare almeno in parte la funzione drenante del circolo linfatico, con risultati che possono venir stabilizzati e anche progressivamente migliorati con la successiva applicazione di un trattamento conservativo di supporto. La chirurgia resettiva maggiore non ha più ragione d'essere; solo in rari casi, una volta stabilizzati i risultati del trattamento microchirurgico e/o medico-fisico conservativo, trovano ancora indicazione interventi resettivi minori con finalità estetico-riduttive.

Sul piano di una prevenzione secondaria, un ruolo importante spetta alla diagnosi precoce e alla selezione di pazienti ad alto rischio di comparsa della patologia linfostatica dopo linfadenectomie oncologiche, specialmente se associate a radioterapia (Campisi *et al.*, 1994; Pissas, 1995). In questi casi è ragionevole prospettare la possibilità del precoce ricorso alla microchirurgia, allo scopo di debellare, già al suo esordio, un l. la cui inesauribile evoluzione sia sostenuta da una ragionevole probabilità statistica.

B. Inghiraffa

Lymphology, 1983, **34**, 11.

Bottezzati M., De Lodi P., Anfossi A., *La terapia chirurgica dei linfedi*, in Bottezzati M., Patesi F., *Terapia delle malattie vascolari*, Ed. Minerva Medica, 1990.

Burrows R. G. H., *Progress in Lymphology* XI, 1988, Elsevier, Amsterdam, pp. 409-420.

Becker C. *et al.*, *EJLRP (Europ. J. Lymphology Related Problems)*, 1991, **2** (n. 6), 75-77.

Bollinger A., Jager K., Sgier F., Seglias J., *Circulation*, 1981, **64**, (1)195-(1)200.

Campisi C., *Lymphology*, 1991, **24**, 48-53.

Campisi C., *Lymphology*, 1991, **24**, 71-76.

Campisi C., *«Microchirurgia Applicata in Clinica Chirurgica Generale e d'Urgenza»*, 1991, Utet, Torino.

Campisi C., *Phlebolympology*, 1995, **7**, 11-15.

Campisi C., *The Modern Surgery of Lymphedema*, in *Proceedings XV International Congress of Lymphology*, 1995, september 25-26 Recife; september 27-30 São Paulo.

Campisi C., *Patologia Vascolare*, 1995, **1** (2), 49-59.

Campisi C., Boccardo F., *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 810-814.

Campisi C., Boccardo F., Alitta P., *Microsurgery*, 1995, **16** (7), 463-468.

Campisi C., Boccardo F., Casaccia M. jr., *EJLRP*, 1991, **2** (6), 48-61.

Campisi C., Boccardo F., Tacchella M., *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 639-643.

Campisi C., Boccardo F., Tacchella M., *Microsurgery*, 1995, **16** (3), 161-166.

Campisi C. *et al.*, *Microsurgery Scientific Reports*, 1984, **4**, 20-24.

Campisi C. *et al.*, *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 282-285.

Campisi C. *et al.*, *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 803-890.

Campisi C. *et al.*, *Twenty year clinical experience in the microsurgical management of lymphedema*, *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 651-657.

Casley-Smith J. R., Casley-Smith Judith R., *High-Protein Edemas and the Benzo-Pyrones*, 1986, J. B. Lippincot. Company, Sidney.

Chang T. S., *Progress in Lymphology*, X ISL Congress, 1985, Adelaide, 168-170.

Chang T. S., *Progress in Lymphology*, X ISL Congress, 1985, Adelaide, 230-231.

Charles R. H., *A system of treatment*, in Latham A., English T. C. eds., 1912, Churchill, London, vol. 3, 504.

Degni M., *Cardiovascular Rivista Brasileira*, 1974, **10**, 175.

Foldi M., *Lymphology*, 1994, **27**, 1-5.

Jamal S., Kumaraswami V., Witte M. H. *et al.*, *Lymphatic abnormalities in microfilaraemias by lymphoscintigraphy*, in *Progress in Lymphology XIV*, *Lymphology*, 1994, **27** (Suppl.), 1-893.



Fig. 10. In alto, a sinistra: I. dell'arto inferiore monolaterale secondario al V stadio prima dell'intervento. In alto, a destra: dopo una settimana dall'intervento. In basso, a sinistra: I. primario al IV stadio prima dell'intervento. In basso, a destra: dopo 5 anni dall'intervento.

- Kinmonth J. B., *The Lymphatics. Surgery, Lymphography and Diseases of the Chyle and Lymph Systems*, 1982, Edward Arnold, London.
- Leduc A., *Le drainage lymphatique. Théorie et pratique*, 1980, Masson, Paris.
- Olszewski W., *Handbook of Microsurgery*, 1984, CRC Press, Boca Raton.
- Olszewski W., Bryla O., *Lymphology*, 1994, 27 (Suppl.), 512-516.
- Olszewski W., *Lymphology*, 1984, 27 (Suppl.), 345-348.
- Pissas A., *Proceedings XV International Congress of Lymphology*, 1995, September 25-26, Recife, September 27-30, São Paulo.
- Servelle M., *Rev. Chir.*, 1947, 66, 294.
- Thompson N., *Surg. Clin. North Am.*, 1967, 47, 2.
- Tosatti E., *Lymphatique profonde et lymphoedèmes chroniques des membres*, 1974, Masson, Paris.
- Trévidic P., Marzelle J., Cormier J. M., *Apport de la microchirurgie au traitement des lymphoedèmes*, in *Encycl. Méd. Chir. (Paris-France)*, Techniques Chirurgicales-Chirurgie Vasculaire, 1994, 43-225.
- Vodder E., *La méthode Vodder - Le drainage lymphatique manuel*, 1969, Inst. for Lymphdrainage, DK-2880 Bagsvaer.
- Yamada Y., *Nagoya J. Med. Sc.*, 1969, 32, 1-21.

CORRADINO CAMPISI

LINFOCITI [v. vol. VIII, coll. 1868-1887; Agg. I, coll. *4641-4649]

SOMMARIO

Basi cellulari della risposta immunitaria (col. 3194). - **Sottopopolazioni linfocitarie** (col. 3197): *Linfociti T*. - *Linfociti B*. - *Linfociti NK* (o cellule Natural Killer).

Basi cellulari della risposta immunitaria

La cellula staminale pluripotente (CSP), situata nel midollo osseo, dà origine ai progenitori dei linfociti [1.] T e B. Nel microambiente timico si completa la maturazione dei l. T, mentre a livello midollare va a compimento il ciclo maturativo per i l. B. Le cellule linfocitarie sono responsabili della risposta immunitaria *specific*a e hanno la capacità di conservare memoria dell'incontro con l'antigene che li ha originariamente stimolati (v. IMMUNITÀ [v.*; v.**]). Cellule della serie monocito-macrofagica, cellule dendritiche e altri

elementi in grado di processare l'antigene (come per esempio le cellule di Langerhans) sono fondamentali per l'attivazione della risposta immunitaria. Un'altra popolazione cellulare, nota come NK (*Natural Killer*), deriva dalla CSP. Essa acquisisce caratteri particolari e svolge funzioni importanti nel controllo delle infezioni virali e della crescita tumorale.

I L. T e B esprimono vari recettori di membrana che risultano tra loro funzionalmente identici e in grado di riconoscere un definito determinante antigenico. Il riconoscimento dell'antigene costituisce il presupposto operativo della reazione immunitaria e quindi dell'instaurarsi della memoria immunologica. Durante l'ontogenesi, la CSP viene dapprima identificata nel mesenchima del sacco vitellino e quindi nel fegato, che è l'organo ematopoietico per eccellenza nella fase di vita embrionale. Con il passare del tempo, durante lo sviluppo e la crescita dell'embrione, la funzione ematopoietica viene svolta dal midollo osseo. Questa caratteristica verrà poi conservata dal midollo per tutta la vita extrauterina. Precursori delle cellule linfatiche vengono costantemente generati sia prima che dopo la nascita: la differenziazione successiva in cloni di L. T e B maturi conserva stabile il patrimonio immunitario dell'organismo.

Ciascun individuo è dotato di miliardi di cloni linfocitari T e B: ciascun clone ha un recettore rivolto contro un diverso antigene. Il complesso delle cellule che hanno tali proprietà di riconoscimento e che pertanto conferiscono un potere di identificazione assai elevato nei confronti di molecole estranee all'organismo viene definito *repertorio* cellulare della risposta immunitaria.

Durante l'ontogenesi, molecole elaborate nel timo (fattori timici) inducono una maturazione selettiva delle cellule che transitano all'interno del timo stesso (L. T o timo dipendenti), così come a livello del midollo osseo si ha un'induzione delle cellule che si specializzeranno nella sintesi e produzione di anticorpi (L. B dipendenti, dove B identifica la lettera iniziale di *bone marrow*). I L. B esprimono sulla loro superficie le immunoglobuline di membrana: nel corso della risposta immunitaria si trasformano in plasmacellule e producono anticorpi. Le cellule T, invece, comprendono sottopopolazioni con diverse proprietà funzionali e il loro ruolo varia quando interagiscono con l'antigene.

L'analisi morfofunzionale dei L. è molto progredita grazie all'uso di anticorpi monoclonali, in grado di riconoscere marcatori specifici presenti sia sulle cellule B sia sulle T: tali marcatori vengono espressi selettivamente o per periodi limitati di tempo su una determinata frazione cellulare.

Nell'ambito della differenziazione linfocitaria timica si distinguono due vie: nella prima si genera il recettore $\gamma\delta$ T Cell Receptor ($\gamma\delta$ TCR), nell'altra si trova il recettore $\alpha\beta$ TCR. Le catene $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ conservano una struttura assai simile a quella presentata dalle molecole di immunoglobuline (v.; v.*): si tratta di due strutture polipeptidiche collegate da un ponte disolfuro; ciascuna componente è divisibile in due regioni principali (*domain*), una *costante*, ancorata alla membrana cellulare, e l'altra *variabile*, in grado di combinarsi con l'antigene. La maggior parte dei linfociti T circolanti nel sangue periferico e di quelli siti nel timo e negli organi linfatici presenta $\alpha\beta$ TCR, mentre i $\gamma\delta$ TCR si trovano in gran parte associati al tessuto linfatico delle mucose.

Dopo la loro migrazione verso le strutture linfatiche periferiche, i cloni dei L. T vengono selezionati e procedono con una fase differenziatrice. I L. con recettore $\alpha\beta$, dopo attivazione, producono linfocine (v. INTERLEUCHINE**); (TIOCHINE**) come per esempio l'IL-2, che viene sintetizzata assieme al suo recettore ad alta affinità. Le cellule $\gamma\delta$ hanno una funzione meno caratterizzata, ma la presenza

della molecola CD8 conferisce a tali cellule, una volta distribuite nei tessuti periferici, una capacità di interazione con cellule bersaglio dotate di molecole di classe I del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (v. ISTOCOMPATIBILITÀ (v.; v.*)).

I L. T derivano tutti da pro-timociti ($CD4^+$; $CD8^-$) che vengono prodotti, nell'adulto, a livello del midollo osseo e che raggiungono il timo migrando dalla zona sottocapsulare all'area midollare, attraversando vari momenti maturativi. Le varie sottopopolazioni dei L. T possono essere identificate grazie ad alcuni marcatori di membrana. Tra le molecole più importanti dal punto di vista funzionale riassumiamo le seguenti:

1) comparsa sulla membrana di molecole *tipiche*; dapprima L. $CD4^+$ $CD8^-$ TCR⁺, quindi $CD4^+$ $CD8^+$ TCR⁺ e da ultimo i $CD4^+$ TCR⁺ e i $CD8^+$ TCR⁺;

2) fase della *selezione positiva* (maturano i L. in grado di riconoscere gli antigeni di istocompatibilità prodotti dal proprio patrimonio genetico) con attuazione della restrizione genetica;

3) eliminazione dei cloni T con TCR ad alta o media affinità verso le molecole MHC-self.

In sostanza la risposta cellulare, al termine del ciclo maturativo dei L. T, consente di immettere nella circolazione del sangue cellule mature *self*-ristrette, in grado cioè di individuare l'antigene nell'ambito delle molecole *self* del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (restrizione MHC), mentre la capacità di risposta è assai moderata nei confronti di sistemi di membrana con *self* a bassa espressione di MHC. Dopo il riconoscimento iniziale dell'antigene i L. T maturi acquisiscono memoria immunologica (diventando L. *committed*) e durante la loro vita sono capaci di iniziare in ogni momento una reazione nei confronti dell'antigene originariamente selezionato. Questo aspetto funzionale è conseguente alla stabilità del riassetto genico, che conserva le caratteristiche del TCR. Nel corso degli anni la generazione di nuovi cloni rallenta ed è significativamente ridotta rispetto alla vita fetale, durante la quale si formano grandi quantità di cellule. Per l'attuazione della risposta cellulare, i L. T debbono associare al TCR il complesso CD3. Si distinguono pertanto i $CD3^+$ $CD4^+$, con prevalente funzione *helper*, ed i linfociti $CD3^+$ $CD8^+$, ad attività soppressoria (Ts) e citotossica verso cellule infettate da virus o cellule tumorali (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTL).

La via di maturazione dei L. B si caratterizza per l'interazione iniziale di cellule precursori con cellule stromali del midollo osseo che danno origine ad una popolazione in rapida proliferazione (pre-B linfociti) nella quale si verifica il riarrangiamento di alcuni geni e la successiva produzione citoplasmatica della catena μ .

I L. pre-B non hanno sulla membrana recettori costituiti da immunoglobuline; successivamente, sempre nel midollo osseo, grazie ad un riarrangiamento produttivo delle catene pesanti si formano le IgM di membrana (L. B immaturo). I L. B presenti in questa fase di maturazione sono facilmente eliminati dal contatto con l'antigene o resi tolleranti. È soltanto in un secondo momento, quando acquisiscono le IgD di membrana, che i L. B (maturi) abbandonano il midollo osseo e diventano capaci di rispondere all'antigene specifico con il contributo delle cellule T a funzione *helper*. Nei centri germinativi del linfonodo, i L. B interagiscono con l'antigene presente sulle cellule follicolari dendritiche; grazie all'intervento dei L. T *helper* vanno quindi incontro a proliferazione e per mezzo di processi di diversificazione somatica si instaura il meccanismo di *class switching*: passaggio, durante la sintesi e produzione di una molecola anticorpale, dall'isotipo IgM ad altro isotipo (per esempio IgG o IgA). Si verifica in questo modo la conservazione

della regione variabile dell'anticorpo mentre vengono a modificarsi le proprietà biologiche della frazione costante, caratteristica che conferisce una certa forma di plasticità funzionale. In questo modo i l. B dei centri germinativi danno luogo a plasmacellule in grado di produrre anticorpi ad alta affinità e generano cellule-memoria recircolanti.

Sottopopolazioni linfocitarie

Per i l. ed i globuli bianchi in genere è possibile ricorrere ad una tipizzazione, molto utile sia per quanto riguarda la biologia cellulare sia per quanto concerne la clinica, utilizzando i marcatori di superficie che consentono di differenziare le diverse sottopopolazioni. Gli anticorpi monoclonali possono identificare varie sottopopolazioni linfocitarie e caratterizzarle rispetto allo stadio evolutivo e/o momento funzionale.

Attraverso un sistema di collaborazione internazionale che si è giovata di vari *Workshop*, una nomenclatura codificata ha permesso di raggruppare i diversi marcatori secondo *cluster of differentiation* (CD).

In tal modo sono differenziabili i cosiddetti marcatori di linea cellulare, quelli propri di certe fasi maturative (marcatori di maturazione) e i marcatori di attivazione cellulare. Nell'ambito delle molecole della superficie cellulare sono riconosciute evolutivamente due superfamiglie, quella delle immunoglobuline e quella delle integrine. La possibilità di utilizzare la citometria a flusso (v.*; v.***) ha consentito un'ampia diffusione degli anticorpi monoclonali che rivestono un'importante ruolo sia nella diagnostica sia nel monitoraggio di numerose terapie.

Linfociti T

Vengono distinti in base al recettore per l'antigene (TCR-1 $\gamma\delta$; TCR-2 $\alpha\beta$). I TCR-1 non riconoscono le molecole MHC di classe II. Invece i linfociti con TCR-2 possono interagire con molecole MHC di classe II (CD4⁺) o MHC di classe I (CD8⁺). Tutti i l. T posseggono il CD3 (complesso CD3) che si combina a formare un'unità operativa con il TCR. Oltre il 90% dei l. esprime il recettore TCR-2, mentre i TCR-1 non superano di solito il 10% delle sottopopolazioni. Inoltre i linfociti TCR-1 non esprimono i marcatori CD4 e CD8. Alcuni tuttavia risultano CD8⁺. Funzionalmente i l. CD4⁺ si dividono in due gruppi: a) i CD4⁺CD45RO che svolgono un ruolo modulatore verso i l. T e i l. B (sono anche identificati con anticorpo monoclonale CD29⁺); b) quelli che stimolano la risposta soppressiva della sottopopolazione CD8⁺ e tipizzati con l'isomero CD45RA. Per i l. T CD4⁺CD45RA⁺ si parla di cellule «vergini» (*naïve*) cioè non ancora venute a contatto con l'antigene, mentre i CD4⁺CD45RO⁺ sono definiti linfociti memoria (*memory cell*). Nell'ambito della funzione *helper* i l. T possono essere distinti in due sottopopolazioni funzionalmente diversificate da un punto di vista funzionale: una secernente IL-2, IL-12, IFN γ e TNF (Th-1) e l'altra secernente le interleuchine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Th-2). Sostanzialmente la sottopopolazione Th-1 ha prevalentemente una funzione pro-infiammatoria (reazioni flogistiche in genere e di citotossicità) mentre quella Th-2 svolge un ruolo orientato alla stimolazione umorale (i l. B così modulati vanno incontro più facilmente a processi proliferativi e, trasformandosi in plasmacellule, producono gli anticorpi). Esistono anche l. Th-0 con un quadro intermedio rispetto a Th-1 e Th-2.

Gli studi sulla funzione cellulare hanno cercato di correlare fenotipo cellulare e funzione, generando talora una qualche confusione, sia perché non è sempre possibile codificare una precisa linea cellulare con caratteri di omogeneità, sia perché sottopopolazioni eterogenee sono in grado

di espletare una medesima funzione. In prima approssimazione va comunque considerato valido identificare l'espressione del CD8 con l'attività cellulare litica; d'altro canto esistono fenotipi cellulari CD4⁺ che sono anche capaci di esercitare una funzione litica. I termini *suppressor* (o funzione soppressiva) e *helper* (o funzione adiuvante) vanno quindi considerati con prudenza, riferendosi talora più ad uno stato funzionale che ad una vera e propria caratteristica di distinzione clonale (in pratica esistono cellule CD4⁺ con caratteristica funzione *helper*, ma anche linfociti CD8⁺ possono svolgere un'attività *helper*, sebbene l'attività *suppressor* sia prevalentemente ristretta alle stesse CD8⁺, così come l. esprimenti capacità citolitica si trovano anche nelle cellule CD4⁺). La citotossicità antigene-specifica è dunque mediata da l. T CD8⁺ che esercitano tale funzione secondo due schemi: 1) lisi diretta della cellula infettata (da un virus); 2) reclutamento di altre popolazioni (linfocitarie e non) per mezzo di citochine e possibilità di controllo di microrganismi a localizzazione intracitoplasmatica.

I l. T sono dotati di numerose molecole di membrana determinanti per la risposta immunitaria. Tra queste ricordiamo il ligando del CD40 che ha una funzione importante per agganciare i l. B durante la risposta immunitaria o nelle fasi di cooperazione cellulare. Il ruolo di questa molecola è stato evidenziato in soggetti affetti da una rara forma di immunodeficienza primitiva (agammaglobulinemia con IperIgM). Questi l. non sono in grado di effettuare lo *switch* isotipico e quindi di trasformarsi in plasmacellule secernenti le altre classi immunoglobuliniche.

Nell'ambito delle sottopopolazioni Th-1 e Th-2 (la cui distinzione va intesa in senso clonale e non morfologico) occorre precisare che esse rappresentano momenti funzionali delle cellule, piuttosto che distinti *subset* cellulari. Infatti non sono stati ancora individuati antigeni esclusivi di queste cellule, né produzione esclusiva di vari *pattern* di citochine. Inoltre la maggioranza dei dati ottenuti *in vitro* sono stati prodotti usando cloni cellulari dopo stimolazione con antigeni, superantigeni o citochine, quindi con sistemi tecnici lontani dalle condizioni naturali presenti *in vivo*. Nonostante queste incertezze metodologiche sono state descritte alterazioni della produzione di citochine orientate verso un *pattern* di tipo Th-1. Questo si verificherebbe nel corso di infezioni virali acute e di parassitosi. Per contro una produzione di tipo prevalentemente Th-2, quindi con aumento della produzione di IL-4 e IL-5, sarebbe marcata in alcune malattie allergiche (asma bronchiale, sindrome da iper-IgE, eczema atopico). Nella malattia da virus dell'immunodeficienza acquisita o *malattia da HIV* (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.*; v.**]) è stato descritto un *pattern* di tipo Th-1 (prevalente produzione di IL-2 e IFN γ) nella prima fase della malattia, mentre nella fase di AIDS conclamata si osserverebbe uno *shift* verso il tipo Th-2. Questa anomalia sarebbe più accentuata nei soggetti con AIDS in fase terminale e/o con sindromi allergiche concomitanti ed elevata produzione di IgE.

Linfociti B

Vengono considerati cellule mature i l. B presenti nel sangue periferico e localizzabili nei mantelli del follicolo linfatico secondario. Questo *subset* cellulare usa molecole IgM di riconoscimento per l'antigene specifico (immunoglobuline di membrana identificate con la sigla sIgM). Essi oscillano tra l'8 e il 15% dei l. nel sangue periferico e rappresentano gran parte delle cellule linfatiche della milza e dei linfonodi; rappresentano circa il 10% dei linfociti del midollo osseo; derivano da un progenitore comune (CSP) secondo due fasi: a) differenziazione antigene-indipendente (dalla CSP al l. che esprime sIgM, detto anche l. B «vergini»

ne») durante la quale si verifica il riarrangiamento dei geni che codificano per la struttura della parte variabile dell'anticorpo e si assiste ad un'importante espansione policlonale con ampia proliferazione; b) differenziazione antigene-dipendente (durante la quale il l. B sIgM⁺ «vergine», grazie ad un processo di *splicing* a carico dell'RNA, elabora una seconda immunoglobulina di membrana che si disloca vicino alla sIgM, consentendo la definizione di l. B «maturo» (sIgM⁺sIgD⁺) correlata alla selezione clonale secondaria all'incontro dell'antigene con lo stesso l. B.

I l. B maturi si caratterizzano per mezzo di alcuni anticorpi monoclonali: CD19, CD20, CD21 (recettore per il frammento C3d del complemento e sito di combinazione con l'EBV), CD22 (omologo della proteina associata alla mielina), CD23 (sinonimo di FcεRII quale recettore a bassa affinità per le IgE e tipico delle cellule B attivate), CD35 (recettore per il C3b), CD40 (fosfoproteina glicosilata importante per la trasduzione di segnali conseguenti alla combinazione con la molecola di CD40-ligando presente su l. T).

Se nell'ambito dei l. T risulta abbastanza agevole una distinzione di sottopopolazioni cellulari, per quanto concerne i l. B la situazione sembra essere più omogenea; esiste tuttavia un monomero di 67kD (CD5⁺), probabilmente con funzione di ligando, che consente di definire una linea di l. B del tutto particolare, non riscontrabile nel midollo osseo, che nell'adulto popola i margini dei centri germinativi del follicolo secondario ed è in grado di elaborare autoanticorpi in modo spontaneo (in particolare gli anti ss-DNA).

Linfociti NK (o cellule Natural Killer)

Si tratta di una popolazione cellulare implicata soprattutto nel controllo delle infezioni da virus. Le NK hanno un aspetto di grande linfocita granulare (presenza di granuli azzurrofili), non esprimono TCR e risultano fenotipicamente CD3⁻; hanno come marcatori caratteristici il CD16 (monomero con sinonimo di FcγRIII; recettore a bassa affinità per le IgG), il CD56 e il CD57 ed esprimono la CD11c (che lega particelle opsonizzate con iC3b) e la CD2 (presente anche sui T, ligando dell'LFA-3, recettore per le emazie di montone). L'attivazione delle NK, ottenuta mediante stimolazione con CD2 e CD16, ha quale conseguenza l'espressione del recettore per l'interleuchina 2 (IL-2); questo recettore è noto come TAC o CD25. Concettualmente il dato caratteristico delle NK sta nella loro funzione citolitica indipendente da una pregressa sensibilizzazione verso il bersaglio e non correlata ad un riconoscimento ristretto MHC dipendente, come si verifica per le altre cellule linfocitarie.

Tuttavia è stato identificato un sistema allogenico nel contesto del quale avverrebbe il riconoscimento di antigeni da parte delle NK e d'altra parte è noto che tali cellule sono dotate di una qualche forma di recettore specifico, dal momento che esistono chiare dimostrazioni della loro capacità discriminante nei confronti di cellule bersaglio (per esempio, *in vitro*, aggreghano cellule infettate da virus e risparmiano le altre, dimostrando una intrinseca capacità di distinzione e selezione recettoriale). Attraverso il CD16 esse esprimono una funzione citotossica anticorpo mediata (ADCC, *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*) e probabilmente sono in grado di esercitare anche meccanismi regolatori grazie alla produzione di mediatori chimici (TNF-α, GM-CSF, IFNγ). È noto inoltre che le cellule NK e alcuni l. T con funzione citolitica *NK-like*, se stimolati da una concentrazione dell'IL-2 possono acquisire una potente funzione citolitica con caratteristiche anti-tumorali (LAK, *Lymphokine Activated Killer cells*). La collocazione filogenetica

e ontogenetica delle cellule NK è complessa: esse non sono dotate dell'assetto germinativo che caratterizza i geni del TCR e pertanto la loro derivazione sembra extra-timica, mentre appare ragionevole assimilarle a forme di cellule dotate di funzione litica ancora primitiva. Le cellule NK non si trovano né nel midollo osseo né all'interno della popolazione linfocitaria dei linfonodi; si identificano invece a livello splenico e costituiscono circa l'8-10% delle cellule linfatiche del sangue periferico.

Le cellule NK svolgono un ruolo fondamentale nella risposta contro le infezioni virali e nella distruzione di cellule neoplastiche, almeno da quanto si è evidenziato in laboratorio o in animali da esperimento.

Bibliografia

- Burnet F. M., *Aust. J. Sci.*, 1957, **20**, 67.
 Gray D., *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, **11**, 49.
 Haas V., Pereira P., Tonegawa S., *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, **11**, 637.
 Kinkade P. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 9.
 Oppenheim J. J., Rossio J., Gearing A., *Clinical applications of cytokines*, 1993, Oxford Univ. Press, Oxford.
 Parslow G. T., *Lymphocytes and lymphoid tissues*, in Stites D. P., Terr A. I., Parslow G. T. eds., *Basic and clinical immunology*, 1994, Prentice Hall International, USA.
 Report of WHO Scientific Group, Primary Immunodeficiency Diseases, *Clin. Exp. Immunology*, 1997, **109**, S. 1, 1-28.
 Roitt I., Brostoff J., Male D., *Immunologia*, 1994, Zanichelli, Bologna.
 Romagnani S., Emmi L., Almerigogna F., *Malattie del sistema immunitario*, 1995, McGraw Hill, Milano.
 Rosen F. S., Seligmann M. eds., *Immunodeficiencies*, 1993, Harwood Ac. Pbl. Switzerland.
 Ugazio A. G., Duse M., Notarangelo L. D. et al., *Il bambino immunodepresso*, 1995, CEA, Milano.
 WHO Scientific Group Report, *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, **99** (S. 1), 2.

FERNANDO AIUTI E GIUSEPPE LUZI

LINFOMI [v. vol. VIII, coll. 1901-1969; Agg. I, coll. *4649-4665]

SOMMARIO GENERALE

INTRODUZIONE	col. 3200
EPIDEMIOLOGIA	col. 3202
ETIOLOGIA	col. 3205
REPERTI ISTOCITOLOGICI DELLA MALATTIA DI HODGKIN. CLASSIFICAZIONE DEGLI ISTOTIPI	col. 3212
REPERTI ISTOCITOLOGICI DEI LINFOMI NON-HODGKIN. CLASSIFICAZIONE DEGLI ISTOTIPI	col. 3224
PATOGENESI	col. 3302
STADIAZIONE E DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	col. 3324
QUADRI CLINICI	col. 3349
NEOPLASIE DELLE CELLULE MONOCITO-MACROFAGICHE E DELLE RETICOLARI DENDRITICHE	col. 3419
INDIRIZZI TERAPEUTICI E PROGNOSI	col. 3425

INTRODUZIONE

I linfomi [I.] sono malattie neoplastiche dovute all'espansione clonale di cellule linfoide in differenti stadi di sviluppo differenziativo/maturativo. La trasformazione neoplastica di queste cellule segue un processo a tappe multiple (*mul-*

tstep disease), che comporta lesioni interessanti proto-oncogeni e oncogeni (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**) e geni soppressori del tumore (v. ANTIONCOGENI**). Il processo ha esordio unicentrico in seno a preesistenti strutture linfoidi centrali o periferiche, prevalentemente in linfonodi ma pure nell'anello di Waldeyer, nella milza, in aree linfoidi di organi vari, e si diffonde per continuità e/o per via linfatica e/o ematica ad altri organi, linfoidi e non linfoidi, formando masse neoplastiche di varie dimensioni. Il l. — specie in talune sue forme — può assumere espressioni più o meno francamente leucemiche, ma tale evento non è frequente benché il «traffico» ematico delle cellule linfoidi neoplastiche sia sempre manifesto almeno in alcune fasi evolutive della malattia. Ciò induce tradizionalmente a tenere distinti i «linfomi» dalle «leucemie» linfoidi: si tratta tuttavia di processi neoplastici strettamente affini. Le leucemie linfoidi (v.; v.*; v.***) si distinguono dai l. essenzialmente per la loro prevalente genesi in seno ad organi linfoidi centrali, per la concentrazione spesso cospicua delle cellule neoplastiche nel sangue periferico e per la loro costante infiltrazione del midollo osseo oltre che, in variabile misura, della milza, dei linfonodi e di organi extralinfonodali. Vi sono però forme morbose, quali i linfomi/leucemie a piccoli linfociti, la *Adult T Cell Leukemia/Lymphoma* (ATLL), la *Hairy Cell Leukemia* (HCL, tricoleucemia [v.*]), la sindrome di Sézary (v. SÉZARY, MALATTIA DI; v. anche sotto, coll. **3282; **3404), il cui inserimento tra i l. invece che tra le leucemie (o viceversa) è sostanzialmente convenzionale.

I l. comprendono forme anatomo-cliniche eterogenee, che possiamo raccogliere in due classi distinte: il *linfoma di Hodgkin*, di solito ancora tradizionalmente indicato come «morbo» o «malattia» di Hodgkin (MH), e la vasta congerie dei *linfomi non Hodgkin* (LNH).

La MH viene considerata a sé stante perché il suo quadro clinico e l'istopatologico presentano caratteristiche diverse da ogni altro tipo di l. e perché la sua interpretazione nosologica ed etiopatogenetica comporta problemi differenti da quelli propri degli altri l., indicati appunto — in contrapposizione alla MH — come «l. non-Hodgkin». Questi ultimi comprendono numerose entità nosologiche, assai diversificate per caratteristiche istocitologiche, biologiche, cliniche, ma si tratta pur sempre di inequivocabili processi neoplastici interessanti le linee linfoidi B o T in vario stadio maturativo.

Per analogie anatomo-cliniche, è invalso largamente l'uso di indicare con il termine di «l.» anche rari processi neoplastici di natura non linfocitaria, ma interessanti cellule del sistema monocito-macrofagico o cellule fisse del tessuto stromale linfoide: tali il «l. istiocitico vero» (e la «istiocitosi maligna»), il «sarcoma a cellule reticolari interdigitate» e l'eccezionale «sarcoma a cellule dendritiche follicolari». Le cellule dendritiche e le interdigitate vengono oltretutto considerate, anche dal punto di vista funzionale, quali «cellule accessorie» del sistema linfoide.

Esistono inoltre «disordini linfoproliferativi atipici», che per aspetti clinici e talora anche istopatologici sono vicini ai l., ma che tra questi non possono essere compresi perché non si tratta di processi neoplastici in senso proprio ma di eventi iperplastici policlonali ad etiologia ignota; non di rado, tuttavia, in seno ad essi si sviluppa un vero l. Questi disordini sono eterogenei: vi sono comprese la linfadenopatia angioimmunoblastica (v.; v.*), la malattia di Castleman multicentrica (MCM, svolta a col. 3388; v. anche LINFOMA BENIGNO DI CASTLEMAN, VIII, 1899, dove è descritta solo la forma scleroialina), le forme linfoproliferative non tumorali che si sviluppano in pazienti sottoposti a trapianto d'organo, in soggetti affetti da immunodeficienze geneticamente determinate e in pazienti con immunodeficienza

acquistata (AIDS). Ne faremo cenno a proposito dell'etiologia e della patogenesi dei l. e della loro diagnosi differenziale istopatologica e clinica.

EPIDEMIOLOGIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3202). - **Frequenza globale dei linfomi** (col. 3202). - **Distribuzione geografica** (col. 3203). - **Linfomi a particolare distribuzione geografica** (col. 3203). - **Insedimenti particolari** (col. 3203). - **Etnia** (col. 3204). - **Età, sesso, stato socio-economico** (col. 3204).

Introduzione

Per vari motivi le nostre cognizioni circa l'epidemiologia dei l. non sono del tutto soddisfacenti. Mal comparabili tra loro sono le statistiche elaborate in regioni diverse e in tempi diversi, a causa dei criteri non omogenei di rilevamento e delle differenti classificazioni istopatologiche adottate. Ciò riguarda soprattutto i dati raccolti nei paesi in via di sviluppo, ma non solo quelli. È da notare che in molti paesi, anche occidentali, le statistiche ufficiali per il territorio nazionale concernono la mortalità e non l'incidenza delle neoplasie: con l'avvento dei moderni presidi terapeutici dopo il 1970, i due rilievi sono profondamente divaricati, specie nella MH, ora in buona parte suscettibile di guarigione. Preziosi sono comunque i rilievi pubblicati da Workshops internazionali o da singole istituzioni (Magrath *et al.*, 1984; Greaves e Chan, 1985; Muir *et al.*, 1987; Parkin *et al.*, 1988, 1992, 1993; Thomas, 1992; Kosary *et al.*, 1995). Tali pubblicazioni forniscono importanti notizie circa la distribuzione geografica dei l. nel mondo, la loro incidenza globale e quella dei singoli sottotipi, nella popolazione generale di molti paesi e in rapporto all'etnia, all'età, al sesso, alle classi sociali, ed anche in merito alle modificazioni che i reperti hanno subito nel corso degli ultimi decenni. Valore prevalentemente orientativo hanno le indagini epidemiologiche circoscritte a limitati distretti (città, province, regioni) e le casistiche raccolte da singoli centri di ricerca.

Frequenza globale dei linfomi

Non conosciamo la reale incidenza globale dei l. nella popolazione mondiale, ma è assodato che tali neoplasie non figurano tra le cause più frequenti di malattia e di morte.

In USA i LNH si trovano al settimo posto tra le cause di morte per neoplasia maligna (Thomas, 1992). In Italia nel periodo 1970-1974 la mortalità per l. si è aggirata su 4,6-4,7 casi per 100.000 abitanti/anno (0,5% di tutte le cause di morte), di cui il 45% spettava alla MH ed il 55% ai LNH. Nel 1989 l'ISTAT ha registrato un tasso di mortalità, per i LNH, di 6,4 casi/100.000 nei maschi e 4,9 nelle femmine. Mancano per l'Italia valutazioni della morbosità per l. riguardanti globalmente il territorio nazionale. Mauri *et al.* (1979) hanno stimato l'incidenza dei l. in Italia nel periodo 1970-1979 in 4-5000 casi/anno.

Da molti rilievi emerge che negli ultimi 50 anni la morbidità per *malattia di Hodgkin* (MH) è stata alquanto costante: ad es. nella popolazione bianca in USA, nel periodo 1973-1978, l'incidenza si è aggirata tra 2,9 e 3,0 per 100.000/anno (Medeiros e Greiner, 1995). La mortalità per MH è invece drasticamente diminuita negli ultimi 20 anni, in rapporto ai nuovi indirizzi terapeutici.

Al contrario, l'incidenza dei *linfomi non-Hodgkin* (LNH) ha subito nell'ultimo ventennio un incremento reale (almeno in Europa e in USA), specie per quanto concerne i l. del follicolo e quelli a grandi cellule. Secondo i dati forniti dal SEER Program (Kosary *et al.*, 1995), durante il periodo contemplato (1973-1987) il tasso di incidenza dei LNH, aggiustato per l'età, è aumentato negli USA del 39% tra i bianchi, del 46% tra i negri. Considerando solo le due date estreme, la morbidità mostra un incremento superiore al 60% (8,5 per 100.000 nel 1973; 13,7 nel 1987) (Ries *et al.*, 1991). Altri dati registrati in USA tra il 1935-1939 ed il 1983-1988 mostrano un incremento annuo medio di LNH del 4% tra i maschi e del 3% tra

le femmine. In Italia, le più recenti rilevazioni disponibili (dati dei Registri Tumori esistenti) comprovano pure un cospicuo incremento dell'incidenza dei LNH nel corso dell'ultimo ventennio (Balzi *et al.*, 1997). Tale fenomeno è imputabile soprattutto all'aumento della popolazione anziana in cui i LNH sono particolarmente frequenti; sebbene in misura quantitativa modesta vi contribuisce però anche il potenziale effetto oncogenetico degli stati di immunodeficienza acquisita (trapianti d'organo, AIDS, v. sotto). In definitiva, mentre negli anni '50 la MH rappresentava più del 40% di tutti i L., attualmente la sua incidenza relativa è al di sotto del 30% e si aggira in qualche statistica sul 20%.

Distribuzione geografica

I L. sono ubiquitari, ma nelle diverse regioni del globo figurano con frequenza diversa. Su tale evento incidono certamente molti fattori: etnia, clima, condizioni socio-economiche, diversa frequenza delle classi di età, malattie infettive endemiche (malaria, mononucleosi infettiva, infezioni da particolari retrovirus o herpesvirus, HIV).

I *linfomi globalmente considerati*, sono più frequenti nel mondo occidentale che in Africa e meno ancora in Asia.

Secondo alcuni rilievi, l'incidenza della *malattia di Hodgkin* (MH) varia tra 4,8 casi per 100.000 nella provincia di Quebec e 0,2 casi nella provincia cinese di Tianjin. Si notano pure differenze geografiche della frequenza dei *sottotipi istologici* della MH: in Occidente prevale il sottotipo sclerosi nodulare (50-70% dei casi), in aree non occidentali sono più frequenti i sottotipi a cellularità mista o a deplezione linfocitica.

I *linfomi non-Hodgkin* (LNH) sono più frequenti in USA e nell'Europa settentrionale che nell'Europa orientale e in Asia, con reperti variabili da area ad area nel Medio Oriente, nell'America meridionale e probabilmente anche in Africa. Le frequenze spaziano tra 11,4 casi per 100.000/anno nel cantone svizzero di Vaud e 1,5 casi a Nagpur in India (Muir *et al.*, 1987). I LNH dell'età infantile sono però più frequenti in Africa e in Medio Oriente che in Occidente, e vi prevalgono quelli ad esordio extralinfonodale. Differenze geografiche sono documentate per i *sottotipi istologici* dei LNH e per la loro frequenza in rapporto all'età e al sesso (v. oltre).

Linfomi a particolare distribuzione geografica

In alcune aree geografiche si osservano frequentemente tipi di L. che sono invece insoliti o addirittura assenti in Occidente. Tipico è l'esempio del *linfoma di Burkitt* (BL), endemico (soprattutto in età infantile tra i 5-8 anni e con incidenza doppia nei maschi rispetto alle femmine) in Uganda, in aree tra 600 e 1500 metri di altezza, e nelle regioni nilotiche occidentali; è frequente pure in alcune zone africane non tropicali, nonché in Papuasie ed in Nuova Guinea. Nei territori endemici rappresenta i 2/3 di tutti i tumori dell'infanzia. In Europa e in USA il BL rappresenta un evento sporadico, che interessa una fascia di età più avanzata di quella propria del BL endemico.

Singolare è il *clustering* geografico presentato dall'*Adult T Cell Leukemia/Lymphoma* (ATLL), frequente tra la popolazione adulta nei Caraibi e soprattutto nelle zone rurali costiere delle isole sud-occidentali del Giappone (Kyushu) a clima caldo e piovoso, dove ha diffusione simil-endemica. Casi sporadici vengono reperiti in altre aree del Giappone; è un evento eccezionale in Europa e in USA. Vi è implicato il retrovirus HTLV-I (v. RETROVIRUS [v.°, v.°] e col. °°3207).

Particolare distribuzione geografica ha pure l'insolita *malattia immunoproliferativa del tenue* (IPST) con o senza le caratteristiche proprie della malattia delle catene pesanti alfa. Tale L. si osserva soprattutto in Medio Oriente, nell'Africa settentrionale e nelle regioni mediterranee adiacenti. In Egitto è tuttavia raro ed in Italia sono stati reperiti solo singoli casi, specie in soggetti siciliani.

Inseguimenti particolari

È dubbio se nei paesi occidentali esistano reali differenze di frequenza tra i L. (sia MH che LNH) tra aree urbane ed aree rurali, come è invece stato ipotizzato. Si tende pure ad escludere ogni rapporto tra le patologie del territorio di impianti industriali (Cartwright *et al.*, 1987) e di installazioni nucleari (centrali e discariche). Né pure tra gli adulti sopravvissuti ai bombardamenti nucleari in Giappone nel 1945 i L. sono stati particolarmente frequenti, a differenza delle leucemie e delle aplasie mieloidi gravi.

Etnia

I L. sono stati riscontrati in tutte le razze umane, tuttavia con frequenze diverse. Particolarmente colpita appare la razza ebraica, sia in Israele che in USA e in Inghilterra (Cartwright *et al.*, 1987). Differenze esistono però tra ebrei sefarditi ed ashkenazy: nei primi prevalgono le leucemie linfoblastiche acute, nei secondi il BL ed i linfomi intestinali.

La *malattia di Hodgkin* (MH) è più frequente tra le popolazioni bianche che tra le negre. Negri, cinesi, giapponesi e popoli orientali in genere mostrano frequenza di *linfomi non-Hodgkin* (LNH) inferiore a quella della popolazione bianca. Nei negri e negli orientali emigrati in USA l'originaria bassa frequenza di LNH si modifica nel tempo fino ad approssimarsi ai valori riscontrabili nella popolazione bianca convivente nel territorio; fa eccezione la leucemia linfocitica cronica, la cui frequenza permane bassa tra gli orientali anche se residenti in USA.

Età, sesso, stato socio-economico

L. sono stati osservati in tutte le età della vita ed in entrambi i sessi, tuttavia con frequenza diversa nei due sessi e nelle varie classi di età. I *linfomi globalmente considerati* prevalgono nell'età media ed avanzata e nei maschi.

La *malattia di Hodgkin* (MH) figura con frequenza diversa in rapporto al sesso e nel complesso è più frequente nei maschi (62%) che nelle femmine (38%) con rapporto M/F = 1,62 (Mauri *et al.*, 1979). Questa ripartizione è ben riconoscibile soprattutto nei soggetti con MH sottotipo a prevalenza linfocitica (LP) dove si riscontra un rapporto M/F di 2,64, ma è evidente anche nei sottotipi a cellularità mista (MC) o con deplezione linfocitica (LD). Nella forma di sclerosi nodulare (NS) invece, la differenza tra i sessi pressoché si annulla (M/F 1,10), anzi in età giovane si nota più elevata frequenza tra le femmine.

In rapporto all'età, nei paesi occidentali sviluppati si riscontra una distribuzione bimodale della MH in entrambi i sessi (v. fig. 62, col. °°3352). La MH è assai rara nell'età infantile al di sotto dei 5 anni. L'incidenza della malattia comincia ad aumentare tra i 10-14 anni, raggiunge un acme tra i 20-34 anni (40,6% dei casi), successivamente decresce ma aumenta dopo i 50 anni fino all'età avanzata. In linea generale nei paesi in via di sviluppo l'incidenza della MH sembra essere più elevata nel giovane adulto; nei paesi occidentali, invece, in età avanzata.

Tra i bianchi la distribuzione età-specifica del *sottotipo sclerosi nodulare* (NS) è unimodale, specie nel sesso femminile, dove prevale largamente tra 10-39 e soprattutto tra 20-24 anni (74,7%). Il *sottotipo a prevalenza linfocitica* (LP) è poco frequente e l'incidenza aumenta alquanto con l'avanzare dell'età. Il *sottotipo a cellularità mista* (MC) mostra costante prevalenza nei maschi rispetto alle femmine, con un aumento del rapporto M/F da 1,7 a 2,1 dal periodo 1973-1977 al 1983-1987. La curva di distribuzione per età mostra graduale incremento dell'incidenza negli anziani. Il *sottotipo a deplezione linfocitica* (LD) ha presentato nel corso dell'ultimo ventennio un decremento da 7,22 a 3,8%, ma dopo i 65 anni costituisce ancora il 15-20% di tutti i casi di MH, specie nei maschi.

In linea generale le *classi sociali* più elevate presentano maggiore frequenza di MH che non quelle più basse ma la differenza si attenua se si considerano solo i soggetti di età superiore ai 55 anni.

Pure i *linfomi non-Hodgkin* (LNH) presentano frequenza diversa a seconda dell'età e del sesso, sia che si considerino globalmente che per sottotipi istologici. Sono relativamente insoliti nell'età infantile-giovanile, la loro frequenza aumenta con il progredire dell'età, raggiungendo l'acme tra i 40 e i 70 anni. Ciò è particolarmente evidente per i L. a malignità bassa o intermedia, mentre quelli ad alta malignità appaiono ben rappresentati in tutte le classi di età. La prevalenza del sesso maschile rispetto al femminile è tra i LNH ancora più rilevante che nella MH.

Lo *stato sociale* del paziente non sembra avere peso statistico nei riguardi della frequenza di mortalità per LNH.

Bibliografia

- Balzi D., Bidoli E., Franceschi S. *et al.*, AIRT. *Stima dell'incidenza e mortalità per tumore nelle regioni italiane, 1990*. Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (Italia), 1997.
Cartwright R. A., McKinney P. A., Barnes N., *Baillière's Clin. Haematol.*, 1987, 1, 59-79.
Greaves M. F., Chan L. C. (eds.), *Leukemia Res., Special Issue*, n. 6, 1985.

- Glaser S. L., Jarrett R. F., *Baillière's Clin. Haematol.*, 1996, 9, 401-416.
- Greiner T. C., Medeiros L. J., *Cancer*, 1995, 75, 370-380.
- Grufferman S., Delzel E., *Epidemiol. Rev.*, 1984, 6, 76.
- Kosary C. L., Ries L. A. G., Miller B. A. et al. eds., *SEER Cancer Statistics Rev. 1973-1992*. NCI, NIH Publ. n. 96-2789, Bethesda, MD, 1995.
- Magrath I. T., O'Connor G. T., Ramot B., *Progr. Cancer Res. Therapy*, 1984, 27, Raven Press, New York.
- Mauri C., Silingardi V., Perugini S. et al., *Morbo di Hodgkin e linfomi non Hodgkin*. Atti 80° Congr. Soc. It. Med. Interna, Pozzi, Roma, 1979.
- Medeiros L. J., Greiner T. C., *Cancer*, 1995, 75, 357-369.
- Muir C., Waterhouse J., Mack T. et al., *Cancer incidence in five continents*, 1987, vol. I, ARC Sci. Publ., n. 8, Lyon.
- Parkin D. M., Laara E., Muir C. S., *Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980*, *Intern. J. Cancer*, 1988, 41, 184-197.
- Parkin D. M., Muir C. S., Whelan S. L. et al., *Cancer incidence in five continents*, 1992, vol. VI, IARC Sci. Publ. n. 120, Lyon.
- Parkin D. M., Pisani P., Ferlay J., *Estimates of the worldwide incidence of eight major cancers in 1985*, *Intern. J. Cancer*, 1993, 54, 594-606.
- Ries L. A. G., Hankey B. F., Miller B. A. et al., *Cancer statistics review 1973-1988*, National Cancer Institute, NCI Publ. n. 91, 1991, 2789.
- Thomas D. B., *Cancer*, in Maxcy, Rosenau, Last eds., *Public Health and Preventive Medicine*, 1992, Appleton & Lange Publ. 13th ed., Norwalk, USA, 812.
- Zanetti R., Crosignani P. eds., *Il cancro in Italia. I dati di incidenza dei Registri Tumori, 1983-1987*, Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, Associazione italiana di epidemiologia, 1992, Torino, pp. 227-236.

CARLO MAURI

ETIOLOGIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3205). - **Fattori di rischio** (col. 3206). - **Fattori genetici** (col. 3206). - **Immunodepressione** (col. 3206): *Immunodeficienze congenite*. - *Trapianti d'organo e immunodepressione farmaco-indotta*. - *Malattie varie con cronica stimolazione antigenica e con disordini immunologici*. - *Malaria*. - **Agenti virali** (col. 3207): *Retrovirus HTLV-I (Human T cell Leukemia Virus)*. - *Retrovirus HTLV-II*. - *Virus di Epstein-Barr (EBV)*. - *Human Herpesvirus type-6*. - *Human Herpesvirus type-8*. - *Virus dell'epatite C*. - *Virus dell'immunodeficienza acquisita dell'uomo (HIV)*.

Introduzione

L'etiologia dei l. è ancora mal nota, tranne in forme particolari. È tuttavia evidente che la linfomagenesi non è riconducibile ad un unico fattore morboso e che non è univoca in tutta l'eterogenea gamma di questi tumori. Ad avviare e completare tale processo concorrono fattori e condizioni di diversa natura e di diverso valore causale. Non è proponibile una rigorosa distinzione tra fattori genericamente predisponenti e fattori etiopatogenetici diretti, essendo la linfomagenesi un processo imperniato su molteplici eventi interdipendenti e non tutti noti, susseguentisi nel tempo (*multistep disease*). Ai fini espositivi possiamo però raggruppare i fattori etiologici in classi diverse, tra cui annoveriamo: «fattori di rischio», fattori genetici, stati di immunodeficienza primaria congenita, immunodepressioni iatrogene, malattie associate a cronica stimolazione antigenica e a disordini immunologici, processi infettivi comprendenti malaria, mononucleosi infettiva (EBV), infezione da virus della immunodeficienza acquisita dell'uomo (HIV), da alcuni retrovirus leucemogeni (HTLV-I, HTLV-II), da «*oncogenic virus candidate*» quali gli herpesvirus HHV-6 e HHV-8 ed il virus dell'epatite C (HCV). Il processo di linfomagenesi si concreta qualora, a seguito dell'azione dei predetti fattori, insorgano nelle cellule linfoidi alterazioni cromosomiche associate a deregolazione di protooncogeni e di geni oncosoppressori (v. sotto *Patogenesi*).

Fattori di rischio

Appendicectomy e tonsillectomia sono state considerate da alcuni (Vianna et al., 1971-1980) quali possibili eventi favorevoli l'insorgenza di MH e di LNH. All'opposto, altri AA. propendono a riconoscere un minor rischio di MH giovanile nei soggetti tonsillectomizzati in età inferiore ai 10 anni (Bonelli et al., 1990). Silingardi et al. (1982) hanno provato che né l'uno né l'altro intervento chirurgico influiscono significativamente sull'incidenza, l'età d'esordio e la sede clinica iniziale della malattia di Hodgkin.

Fattori genetici

Fattori genetici sono stati invocati come possibili responsabili di linfomagenesi (Mack et al., 1995) in base al reperto di l. in entrambi gemelli omozigoti (analogo evento non viene osservato in gemelli dizigoti), in più familiari aventi concordanza di determinati aplo tipi HLA, in più membri di popolazioni con rilevante endogamia, in fratelli (più che in sorelle) di maschi affetti da MH.

Immunodepressione

Molteplici condizioni di immunodepressione svolgono indubbiamente un ruolo importante nella linfomagenesi, soprattutto perché comportano deficiente immunosorveglianza verso emergenti cloni cellulari mutati. Conosciamo infatti numerosi deficit immunologici congeniti e acquisiti, caratterizzati da aumentata incidenza di l.

Immunodeficienze congenite

Sono noti nuclei familiari caratterizzati da anomalie immunitarie ereditarie associate ad incidenza particolarmente elevata di l. L'evento si verifica soprattutto nelle seguenti sindromi: atassia-teleangiectasia (AT), *common variable immunodeficiency* (CVID), sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS), deficienza di IgA, immunodeficienza combinata grave (SCID), *X-linked lymphoproliferative syndrome* (X-LP), anomalia leucocitaria di Chediak-Higashi (che comporta deficienza quantitativa e funzionale delle cellule NK). In tali condizioni il rischio di l. (LNH) è difficilmente quantificabile, anche perché in rigorose revisioni di materiale biotipico non sempre sono stati riscontrati — secondo i criteri attuali — sicuri reperti ascrivibili ad un fenotipo tumorale. In linea di massima la frequenza di l. in condizioni di immunodeficienza primaria viene valutata tra 1-7% nella SCID e 7-14% nella WAS, si aggira sul 10% nella AT e sul 35-65% nella X-LP (Frizzera, 1992).

Trapianti d'organo e immunodepressione farmaco-indotta

I soggetti sottoposti a trapianto d'organo o di cellule midollari presentano una probabilità almeno 40 volte superiore alla restante popolazione di sviluppare un l. (soprattutto LNH). I l. post-trapianto presentano notevoli differenze biologiche e cliniche rispetto ai l. correlati ad altre condizioni di immunodepressione, quali gli AIDS-LNH (Gaidano et al., 1994): si tratta infatti spesso di proliferazioni linfoidi a grandi cellule anaplastiche di tipo policlonale, oligoclonale o monoclonale; hanno particolare predilezione per il S.N.C.; presentano frequentemente infezione da EBV, raramente riarrangiamento dell'oncogene *c-myc*.

Pure condizioni morbose di vario tipo, sottoposte a prolungate terapie con farmaci immunodepressori, presentano rilevante propensione alla formazione di l.

Non è infine insolito che pazienti con MH trattati con radio- e/o chemioterapia, dopo anni di remissione completa sviluppino un LNH, mentre è raro l'evento opposto.

Malattie varie con cronica stimolazione antigenica e con disordini immunologici

È noto che malattie flogistiche croniche associate ad anomale condizioni immunologiche, quali l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la sindrome di Sjogren, la tiroidite di Hashimoto predispongono all'insorgenza di l. Pure le gastriti croniche associate a *Helicobacter pylori*, le flogosi croniche intestinali da batteri patogeni enterici, la malattia celiaca e la dermatite erpetiforme possono

favorire lo sviluppo di LNH. È sorprendente che almeno nelle fasi iniziali il MALT-linfoma gastrico appaia dipendente dallo stimolo antigenico dovuto all'*H. pylori* e che l'eradicazione di questo mediante antibiotici induca talora la regressione del l. gastrico (Wotherspoon *et al.*, 1993). Anche la *malattia linfoproliferativa del tenue* può, in fase iniziale, regredire con adeguata terapia antibiotica e la sindrome linfomatosa ad essa associata in tal caso non progredisce (v. anche col. **3253). Frequentissima è l'evoluzione in l. immunoblastico (generalmente di linea T) della *linfadenopatia angioimmunoblastica* (v. oltre, coll. **3291 e segg.).

Si è prospettato che l'esposizione cronica ad essenze di legname e ad alcuni composti chimici impiegati nell'industria e nell'agricoltura (benzolo, caucciù, clorofenossiacidi, clorofenoli) possa rappresentare una prolungata stimolazione antigenica, prima tappa di un processo neoplastico *multistep*: nella maggior parte dei casi non sono state fornite prove inconfutabili. Tuttavia in alcune regioni degli USA è stata accertata un'incidenza particolarmente elevata di LNH tra agricoltori che avevano a lungo e largamente impiegato erbicidi del tipo acido fenossiacetico ed insetticidi organofosforici (Waterhouse *et al.*, 1996).

Malaria

La malaria agirebbe tramite depressione dell'immunità T cellulare mediata nei confronti del tumore o del virus di Epstein-Barr (EBV) (v. oltre) e/o quale mitogeno per i linfociti B: l'intensa proliferazione di questi rappresenterebbe il *milieu* in cui si sviluppa il l. di Burkitt (BL). Nel complesso della popolazione dell'Uganda la correlazione istotipo linfomatoso/endemicità della malaria (*Plasmodium falciparum*) appare elevata non solo nei confronti del BL ma anche dei l. non-Burkitt (NBLNH) ad alto grado di malignità, mentre non è statisticamente significativa per i LNH a basso grado, che si riscontrano più spesso in adulti (in cui l'impatto immunodepressore della malaria non è spiccato).

Agenti virali

Grande importanza hanno assunto da poco più di un ventennio (e in particolare negli ultimi anni) le ricerche sul ruolo linfomagenetico di alcuni agenti virali linfotropi (tab. I). Si presume che solo all'HTLV-I possa essere attribuito il significato di fattore causale diretto di un l., mentre all'EBV e all'HHV-8 spetterebbe piuttosto un ruolo di importante cofattore. Agli altri agenti virali citati in tab. I si tende ad ascrivere solo un'azione, sia pure rilevante, di depressori dell'immunosorveglianza e/o di fattori antigenici di cronica stimolazione linfoide nella prima fase di avvio *multistep* alla linfomagenesi.

Retrovirus HTLV-I (Human T cell Leukemia Virus)

È implicato nella genesi dell'*Adult T cell Leukemia/Lymphoma* (ATLL) (Yoshida *et al.*, 1984) e di una forma di *linfoma cutaneo a cellule T* (*Cutaneous T-cell Leukemia/Lymphoma*, CTCL) osservabile nelle aree geografiche dove l'ATLL è endemico (Hall *et al.*, 1994). Vi sono inoltre indizi di una associazione dell'HTLV-I con altri l. rinvenibili in aree non endemiche (Pankade *et al.*, 1995) (tab. I). Il genoma provirale in parte deletato di HTLV-I è stato rinvenuto nelle cellule neoplastiche di *micosi fungoide* in quasi il 100% dei casi (Whittaker e Luzzatto, 1993).

Non è noto il meccanismo di trasmissione interumana dell'HTLV-I (da madre al figlio con l'allattamento? sessuale? parenterale con emotrasfusioni o con uso promiscuo di siringhe in tossicodipendenti?); non sono noti serbatoi non umani del virus. L'HTLV-I infetta linfociti T maturi CD4⁺ ed in una parte di questi esplica *effetto trasformante*, provocandone l'espansione incontrollata, forse con la cooperazione del *T cell growth factor* (TCGF). L'HTLV-I sembra indurre la trasformazione dei linfociti T grazie alla produzione di una proteina trans-regolatrice HTLV-I Tax, che potenzia l'espressione di tutti i geni virali e attiva per via trascrittiva l'espressione di taluni geni dell'ospite (IL-2, *c-myc*, *c-fos*, GM-CSF) (Giordano e Dalla-Favera, 1997).

Le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione da HTLV-I e della ATLL sono state riportate a suo luogo (v. sopra *Epidemiologia*). L'anticorpo contro l'antigene associato all'HTLV-I è stato reperito in Giappone nel 10-25% degli adulti sani abitanti nelle aree endemiche per l'ATLL e occasionalmente in altri

TAB. I. VIRUS LINFOTROPI COINVOLTI NELL'ETIO-PATOGENESI DI LINFOMI

Virus	Linfoma	Frequenza dell'infezione (%)
Retrovirus		
HTLV-I	<i>Adult T-cell leukemia</i> (ATLL)	100
	<i>Cutaneous T-cell leukemia/lymphoma</i> (CTCL) in aree endemiche	?
	CTCL a grandi cellule anaplastiche CD30 ⁺ in aree non endemiche	?
	Micosi fungoide/S. di Sézary?	?
HTLV-II	Micosi fungoide?	?
	L. a linfociti CD8 ⁺ ?	?
	Tricoleucemia?	?
Herpesviridae		
EBV	L. di Burkitt endemico	100
	(in ospite immunocompetente)	
	Malattia di Hodgkin (MH)	~ 50
	L. a cellule T	?
	L. angioimmunoblastico	
	L. angiocentrico	
	L. a grandi linfociti granulati in regioni asiatiche	
	(in ospite immunocompromesso)	
	LNH cerebrale primitivo	
	Sindrome linfoproliferativa <i>X-linked</i>	
	AIDS-LNH sistemici (immunoblastico, a grandi cellule)	100
	Disordini linfoproliferativi correlati a trapianto o a immunosoppressione	~ 80
HHV-6	Malattia di Hodgkin (MH)	12-29
	L. angioimmunoblastico	58
	LNH	0-6
	L. a grandi linfociti granulati	?
HHV-8	Istiocitosi dei seni	?
	(AIDS correlati)	
	LNH delle cavità corporee a cellule B	100
	AIDS-MH	15
	AIDS-LNH	15
	Malattia di Castleman multicentrica	100
	Linfadenopatia generalizzata persistente	25
	(AIDS non correlati)	
Flaviviridae	MH e LNH	eccezionale
	Malattia di Castleman multicentrica	40
	Linfadenopatia angioimmunoblastica	20
Flaviviridae	HCV	
	Crioglobulinemia essenziale mista (EMC) tipo II	81-96
	LNH-B in EMC-II	100
	LNH-B	30
	CLL-B	0
	L. linfoplasmacitoide (Waldenström)	?
	Malattia di Hodgkin	0-8
HIV	LNH-B	
	AIDS-LNH sistemici	85
	L. a piccole cellule non incise	30
	L. diffuso a grandi cellule	70
	L. primario del S.N.C.	15
	LNH-T	rara
	Malattia di Hodgkin (MH)	rara

distretti. Indagini recenti hanno provato che il virus ha nel mondo diffusione più larga di quanto inizialmente si ritenesse (Manca *et al.*, 1994), ma non sembra che ciò comporti un'incidenza dell'ATLL più ampiamente disseminata.

Retrovirus HTLV-II

È endemico tra le popolazioni indiane d'America; tra i tossicodipendenti i sieropositivi per l'HTLV-II toccano l'80-90%. In Italia ed in altri paesi europei la frequenza di sieropositivi per l'HTLV-II è assai bassa tra i giovani maschi clinicamente sani (0,12%). Non sicuramente provato è il ruolo dell'HTLV-II nella genesi di alcuni l. (tab. I), ed il candidato più probabile sembra essere la tricoleucemia (v.*).

Virus di Epstein-Barr (EBV)

Problemi di grande rilievo sono stati sollevati dalla scoperta dell'EBV nei linfociti del linfoma di Burkitt (BL) (Epstein *et al.*, 1964), come pure nelle cellule del carcinoma indifferenziato rinofaringeo. Più recentemente sono state dimostrate sequenze DNA/RNA dell'EBV in cellule tumorali di un ampio spettro di malattie linfoproliferative (tab. I).

L'EBV (v. EPSTEIN-BARR VIRUS [v.; v.*; v.**]) è un DNA virus della famiglia dei *Gammaherpesviridae*. Infetta i linfociti B (dotati di uno specifico recettore di membrana) e viene trasferito nel nucleo, dove si configura quale molecola circolare extracromosomica (episoma). Il genoma EBV è complesso; codifica per tre gruppi di proteine, ognuno in momenti diversi del suo stato replicativo: sei antigeni nucleari latenti (EBNA 1-6), due *latent membrane proteins* (LMP-1 e 2), *early antigens* (EA), *late antigens* (VCA). La LMP-1 (proteina di membrana associata a vimentina) è la sola proteina codificata dall'EBV di cui sia provata la capacità trasformante. EBNA-2 e LMP-1 inibiscono l'apoptosi (v.***) inducendo l'espressione dell'oncogene *bcl-2*. I geni latenti di EBV interferiscono forse nella deregolazione di *c-myc*. Nei diversi l. infetti da EBV si osserva una diversa espressione di tali proteine.

L'infezione da EBV svolge un ruolo importantissimo nella genesi del l. di Burkitt (Epstein, 1985). Nella totalità dei casi (sempre malarici cronici) del BL endemico africano un elevato titolo di anticorpi sierici anti-EBV precede anche di anni l'esordio clinico del l. Nel BL sporadico occidentale, la pregressa infezione da EBV è invece documentabile in meno del 20% dei casi: raramente si reperiscono in circolo anticorpi contro il capsido (*late antigen* VCA) ed è insolito reperire il genoma EBV nelle cellule tumorali.

Per il BL endemico viene attualmente proposto un modello oncogenetico di tipo *multistep disease*, in cui l'EBV non rappresenterebbe il fattore causale diretto ma sarebbe uno dei cofattori, in quanto in un soggetto già immunodepresso dall'infezione malarica favorirebbe l'insorgenza di una intensa proliferazione policlonale dei linfociti B infetti, nel cui seno sarebbe facilitata l'insorgenza di cloni anormali anche per effetto di traslocazioni cromosomiche quali la t(8;14) (q24;q32) (v. oltre) e in definitiva la formazione di cloni francamente tumorali. Nel BL sporadico la t(8;14) sembra invece non essere costantemente correlata ad una infezione EBV.

L'EBV è stato reperito anche in altri LNH. Espressioni del gene EBV (LMP-1, EBNA2, BZLF1, VCA, MA) sono stati osservate nel 4% di LNH-B altamente maligni e nel 10% di LNH-T periferici. Più frequenti (tab. I) sono i LNH EBV positivi in soggetti affetti da AIDS.

Assai intrigante è il ruolo che l'EBV sembra svolgere nella genesi della malattia di Hodgkin (MH). Un elevato titolo di anticorpi contro antigeni precoci (EA) dell'EBV è stato riscontrato nel siero di soggetti hodgkiniani anni prima dell'esordio clinico della malattia, come per intensificata attivazione del virus (Kahn *et al.*, 1993). In più di 1/3 di tutti i casi di MH è stata dimostrata l'integrazione del genoma EBV nelle cellule di Hodgkin e di Reed-Sternberg (H-RS) (Weiss *et al.*, 1989), tuttavia con diversa frequenza a seconda del sottotipo istologico della MH: 10% nella predominanza linfocitica (LP), 35% nella sclerosi nodulare (NS), 95% nella cellularità mista. Inoltre nel 48% dei casi di MH è stata segnalata nelle cellule H-RS la presenza di LMP-1. L'espressione di questa proteina appare correlata soprattutto con i tipi istologici aggressivi della MH. Si attribuisce inoltre ad una «*lytic cycle protein BZLF1*», presente in casi di infezione da EBV, la capacità di inibire la funzione dell'oncosoppressore *p53*. D'altro canto è stata reperita in alcuni casi di MH (Knecht *et al.*, 1993) una particolare delezione

del gene codificante per LMP-1. Sembra in complesso, che infezione da EBV ed espressione di *bcl-2* e di *p53* rappresentino eventi separati nella patogenesi della MH e che l'EBV sia solo uno dei possibili fattori coinvolti nello sviluppo della MH.

Human Herpesvirus type-6

L'HHV-6 è un herpesvirus isolato per la prima volta da Salahuddin *et al.* (1986) da mononucleati di sangue periferico di soggetti linfomatosi, in parte infetti anche da HIV-1. Ha uno spiccato tropismo per i linfociti T CD4⁺, B e NK, e per i monocito-macrofagi. L'intero genoma HHV-6 è integrato nel braccio corto del cromosoma 17(17p13.3) (Torelli *et al.*, 1995). L'HHV-6 è ubiquitario nella popolazione umana adulta. L'infezione primaria provoca nei bambini l'*exanthema subitum* (v.; v.*) e nell'adulto una epatite e una sindrome simil-mononucleosica; successivamente il virus rimane latente in cellule dell'ospite. L'attività oncogena dell'HHV-6 è provata dalla sua capacità di trasformare *in vitro* alcune linee cellulari (NIH 3T3, cheratinociti dell'uomo) in popolazioni ad elevata proliferazione che danno luogo a tumori metastalizzanti se inoculate nel topino «nude».

Sequenze specifiche di HHV-6 sono state reperite nel 30% dei casi di malattia di Hodgkin (MH), soprattutto di sottotipo NS ed in casi con versamenti pleuropericardici o pleuroperitoneali e/o con localizzazioni mediastiniche bulky. Ci si può chiedere pertanto se l'infezione da HHV-6 abbia parte nell'imprimere caratteristiche cliniche particolari alla MH. La presenza di un fattore proteico replicante il DNA, espresso in fasi precoci del ciclo replicativo di HHV-6, è stata dimostrata in cellule H-RS e non nella componente reattiva della MH (Luppi e Torelli, 1996).

Sequenze HHV-6 sono state raramente documentate in l. non-Hodgkin (LNH), sia di linea linfoide B che T. Nella linfadenopatia angioimmunoblastica (anche nell'ALD-like) sequenze HHV-6 si rinvenivano invece in circa il 50% dei casi.

Si può ritenere non infondato il sospetto che l'infezione da HHV-6 svolga effettivamente un ruolo nella linfomagenesi, forse predisponendo le cellule ad una fase di instabilità genetica.

Human Herpesvirus type-8

L'ubiquitario virus linfotropo HHV-8 è molto simile ad un *gamma-2 herpesvirus* (HVS) associato ad un disordine linfoproliferativo delle cellule T del cristoide, una scimmia dell'America tropicale. L'HHV-8 è probabilmente latente in cellule e in tessuti infetti e viene attivato in soggetti affetti da AIDS o comunque immunodepressi. Le specifiche sequenze DNA sono state dimostrate nel sarcoma di Kaposi (KS) AIDS-associato (Chang *et al.*, 1994) e nella quasi totalità dei casi di KS classico e inoltre in casi di LNH a cellule B delle cavità corporee (BCBL) (v. oltre, col. **3391) (Ansari *et al.*, 1996) e pure in lesioni cutanee (non di tipo KS) di pazienti sottoposti a trapianto d'organo. Sequenze DNA di HHV-8 sono state infine reperite in soggetti con malattia di Castleman multicentrica nonché in qualche caso di linfadenopatia angioimmunoblastica (Luppi e Torelli, 1996), eccezionalmente in alcune forme di LNH e nella MH (Pastore, 1995). Anche nel caso dell'HHV-8 sussiste il dubbio che si tratti di un virus di passaggio, anche se appare ipotizzabile comunque un suo coinvolgimento nella linfomagenesi tramite attivazione della proliferazione linfocitaria e produzione di linfocine (Ford *et al.*, 1995).

Virus dell'epatite C

Un «*oncogenic virus candidate*» potrebbe essere, secondo recentissime indagini, l'HCV, un RNA virus della famiglia dei *Flaviviridae*, linfotropo oltre che epatotropo (v. FRATTI DA VIRUS**). L'infezione da HCV è stata documentata nella maggior parte dei casi di crioglobulinemia mista di tipo II (CM II) ed in LNH a cellule B complicanti una CM II. La presenza in un caso siffatto di una traslocazione di *bcl-2* in una prima fase e dell'oncogene *c-myc* in uno stadio ulteriore, fa sospettare che l'infezione da HCV possa essere implicata in un disordine linfoproliferativo *multistep* (Ellis *et al.*, 1995). Sono stati segnalati reperti sierologici e presenza di markers molecolari di infezione da HCV anche in casi di LNH a cellule B non associati a CM II (Ferri *et al.*, 1995; Cavanna *et al.*, 1995). Tuttavia l'attivazione di una risposta immune contro l'HCV e la presenza di sequenze genomiche specifiche di HCV in tessuti linfonodali riguardano solo determinati sottotipi istologici (Luppi e Torelli, 1996), tra cui possiamo annoverare MALT-linfomi a basso

grado di malignità e i centrollicolari (cb/cc). In definitiva, l'infezione da HCV sembra agire solo con modalità indirette sulla linfomagenesi della linea B. Essendo l'HCV un RNA virus non integrabile nel genoma dell'ospite, è improbabile che svolga un diretto ruolo trasformante; sembra tuttavia che una sua proteina non strutturale (NS3) esplichi *in vitro* attività oncogenica (Sakamuro et al., 1995).

Virus dell'immunodeficienza acquisita dell'uomo (HIV)

Un coinvolgimento solo indiretto nella linfomagenesi è attribuito al virus HIV, che ha comunque un ruolo di spicco nell'insorgenza di molti tipi di LNH e ne condiziona non poche particolari caratteristiche. Si ritiene che l'HIV agisca quale importante fattore di alterata immunosorveglianza, di sregolata produzione di citochine (soprattutto IL-6, IL-10, IFN- γ), di cronica stimolazione antigenica, con spiccata attivazione policlonale del compartimento linfocitario B, le cui cellule in larga parte sono portatrici di antigeni specificamente codificati dall'HIV (Amadori e Chieco-Bianchi, 1990). Gaidano e Dalla-Favera (1996) distinguono nella genesi dei l. non Hodgkin AIDS-correlati (AIDS-LNH) una *prima fase* caratterizzata da iperproliferazione policlonale di linfociti B con il quadro della *linfadenopatia generalizzata persistente* (PGL) e una *seconda fase* contraddistinta dall'insorgenza di *multiple lesioni citogenetiche* nell'ambito di un singolo clone. Attraverso una fase oligoclonale si perviene infine alla *terza fase*, monoclonale, dello sviluppo del l., caratterizzata da attivazione di *c-myc* e da inattivazione o soppressione di *p53* oppure da riarrangiamento di *bcl-6* (quali eventi mutualmente esclusivi); abbastanza spesso si osservano anche mutazioni di *ras* e *delezione di 6q*. Un impatto particolarmente importante sembra scaturire dalla interazione di HIV con i virus HHV-8 e/o EBV, spesso copresenti nei l. primari del S.N.C. e pure in LNH sistemici del sottotipo a grandi cellule. Il sospetto di una possibile interferenza diretta dell'HIV nella linfomagenesi è suggerito dall'esistenza di una interazione HIV clonale in rapporto all'*oncogene cfs/fps* reperita in rari casi di l. a cellule T associati ad AIDS ed in l. ad immunofenotipo misto (Shiromizu et al., 1995).

La diffusione relativamente recente dell'AIDS non ha comportato un aumento significativo della frequenza della *malattia di Hodgkin* (MH). Gli insoliti casi di MH AIDS-correlati presentano spesso il sottotipo a cellularità mista e decorso particolarmente aggressivo.

Bibliografia

- Amadori A., Chieco-Bianchi L., *Immunol. To day*, 1990, **11**, 374-379.
 Ansari M. O., Dawson D. B., Nador R. et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996, **105**, 221-229.
 Bonelli L., Vitale V., Bistolfi F. et al., *Int. J. Cancer*, 1990, **45**, 423-427.
 Cavanna L., Sbolli G., Tanzi F. et al., *Haematologica*, 1995, **80**, 486-487.
 Chang Y., Cesarman E., Pessin M. S., *Science*, 1994, **266**, 1865-1869.
 Ellis M., Rathaus M., Amiel A. et al., *Europ. J. Clin. Invest.*, 1995, **24**, 781-784.
 Epstein M. A., *Historical background. Burkitt's lymphoma and Epstein-Barr virus*, in Lenoir G. M., O'Connor G. T., Olweny C. L. M. eds., *Burkitt's lymphoma: a human cancer model*, 1985, **60**, 17-27, IARC Scientific Publ. IARC, Lyon.
 Epstein M. A., Achong B. G., Barr Y. M., *Lancet*, 1964, **1**, 702-703.
 Frizzera G., *Atypical lymphoproliferative disorders*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 245-261.
 Ford R., Tamayo A., Martin B. et al., *Blood*, 1995, **96**, 283-293.
 Gaidano G. L., Dalla-Favera R., *Molecular biology of lymphomas*, in DeVita jr., Hellmann S., Rosenberg S. A. eds., *Cancer: Principles and practice of oncology*, 1997, Lippincott, Philadelphia, 2131-2142.
 Gaidano G. L., Pastore C., Gloghini A. et al., *Leuk. Lymphoma*, 1997, **24**, 257-266.
 Gaidano G. L., Pastore C., Lanza C. et al., *Ann. Hematol.*, 1994, **69**, 281-290.
 Hall W. W., *J. Exper. Med.*, 1994, **180**, 1581-1585.
 Kimm G., Gupta R. K., Coates P. J., Slavin G., *Am. J. Pathol.*, 1993, **143**, 777-780.
 Klein G., *Blood*, 1997, **80**, 299.
 Knecht H., Fournier F., Broust P. et al., *Blood*, 1993, **82**, 2937.
 Lippman M., Torrelli G., *Haematologica*, 1996, **81**, 265-281.
 Moller M., Gaidano G., Sica D. K. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 117-124.
 Moller M., Puccini E., Gelmi M. et al., *J. Exper. Med.*, 1994, **180**, 193-202.

- Pankade B. A., Zucker-Franklin D., Coutavas E. E., *J. Clin. Invest.*, 1995, **95**, 547-554.
 Pastore C., Gloghini A., Volpe C. et al., *Br. J. Haematol.*, 1995, **91**, 918-920.
 Sakamuro D., Furukawa T., Takagami T., *J. Virol.*, 1995, **69**, 3893-3896.
 Salahuddin S. Z. et al., *Science*, 1986, **234**, 596.
 Shiromizu B., Herndier B. G., McGrath M. S., *Cancer Res.*, 1995, **54**, 2069-2072.
 Silingardi V., Venezia L., Tampieri A., Gramolini C., *Scand. J. Haematol.*, 1982, **28**, 59-64.
 Soulier J., Grollett L., Oksenhendler E. et al., *Blood*, 1995, **86**, 1276-1280.
 Torelli G., Barozzi P., Marasca R. et al., *J. Med. Virol.*, 1995, **46**, 178-188.
 Vianna N. J., Davies J. N. P., Harris S. et al., *Lancet*, 1980, **2**, 338-340.
 Waterhouse D., Carman W. Y., Schottenfield D. et al., *Cancer*, 1996, **77**, 763.
 Weiss L. M., Mohaved L. A., Warnke R. A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 502-506.
 Whittaker A. C., Luzzatto L., *Science*, 1993, **259**, 1470.
 Wotherspoon A. C., Dogliani C., Diss T. C. et al., *Lancet*, 1993, **342**, 575-577.
 Yoshida M., Seiki M., Yamaguchi K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 2534-2537.

CARLO MAURI

REPERTI ISTOCITOLOGICI⁽¹⁾ DELLA MALATTIA DI HODGKIN. CLASSIFICAZIONE DEGLI ISTOTIPI

SOMMARIO

Componenti citologiche (col. 3212): *Componente neoplastica*. - *Componente reattiva*. - **Classificazioni istopatologiche** (col. 3215). - **Caratteristiche dei sottotipi istologici della malattia di Hodgkin (MH)** (col. 3216): *Predominanza linfocitica (LP)*. - *Sclerosi nodulare (NS)*. - *Cellularità mista (MC)*. - *Deplezione linfocitica (LD)*. *Malattia di Hodgkin classica ricca di linfociti*. - **Reperti istopatologici delle localizzazioni hodgkiniane in sedi extralinfonodali** (col. 3221). - **Linfoma composito** (col. 3223).

Componenti citologiche

Caratteristica essenziale del quadro morfologico della malattia di Hodgkin (MH) è il sovvertimento, subtotale o totale, della normale struttura linfonodale ad opera di un processo simil-granulomatoso, in cui si ravvisano una «componente cellulare neoplastica» ed una «reattiva», intimamente commiste.

Componente neoplastica

La *componente neoplastica* («oncotipo hodgkiniano») è costituita dalle cosiddette cellule di Hodgkin e cellule di Reed-Sternberg (cellule H-RS) (figg. 1, A e B; 2 e 5, B). Le cellule di Hodgkin (H) sono mononucleati con citoplasma intensamente basofilo e grande nucleo rotondo, fornito di uno o più grossi nucleoli. Le cellule di Reed-Sternberg (RS) sono grandi cellule dall'ampio citoplasma più o meno intensamente basofilo, con più nuclei o con cospicua lobulazione nucleare e nucleoli spesso grandi, a contorni irregolari: sono le cosiddette «cellule diagnostiche» della MH (fig. 5, B). Il fenotipo più frequente è di linea T, CD30+, CD15+, CD45-, EMA-, ma in non pochi casi sono invece espressi antigeni B-associati (v. anche in *Patogenesi*).

Dell'oncotipo hodgkiniano si conoscono più varianti morfologiche.

a) *Cellule giganti con nucleo ad immagine speculare* (o con aspetto ad occhiali) («mirror image giant cells»): sono caratterizzate da presenza di due nuclei disposti simmetricamente, contenenti uno o più grossi nucleoli (fig. 1, C).

⁽¹⁾ L'iconografia istocitologica di questo e del successivo capitolo è stata allestita dal prof. Tullio Artusi (Istituto di Ematologia, Università di Modena), che me ne ha consentito la riproduzione. Lo ringrazio vivamente della cortesia.

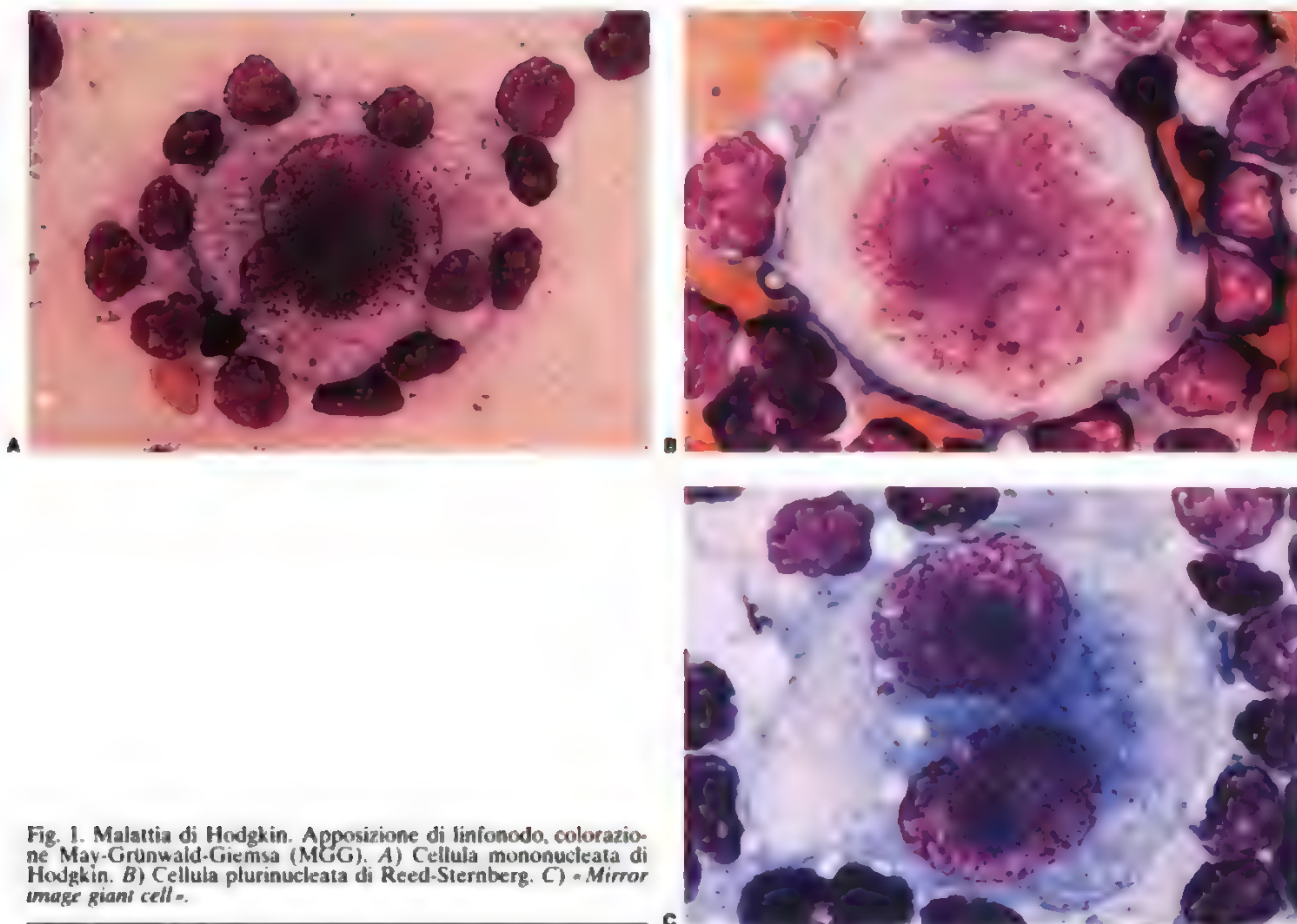


Fig. 1. Malattia di Hodgkin. Apposizione di linfonodo, colorazione May-Grünwald-Giemsa (MGG). A) Cellula mononucleata di Hodgkin. B) Cellula plurinucleata di Reed-Sternberg. C) «Mirror image giant cell».

b) *Variante L&H delle cellule sternberghiane* (il nome deriva dalle iniziali delle cellule dominanti nel sottotipo a predominanza linfocitica, «lymphocytes» e «histiocytes»): sono cellule con ampio citoplasma festonato debolmente basofilo, nucleo lobato o multilobulato polipoido con cromatina finemente dispersa, sottile membrana nucleare, nucleoli piccoli. Per la loro morfologia le cellule L&H possono ricordare i chicchi «soffiati» di granoturco (*popcorn cells*). Si osservano nel sottotipo a predominanza linfocitica (LP), specie nella variante nodulare (fig. 3, B). Presentano costantemente antigeni B-associati (CD19, CD20, CD22, CDw75), CD45+, catene J, debole positività CD30, CD25 negativo (Mason *et al.*, 1994) (v. anche in *Patogenesi*).

c) *Cellule lacunari*: hanno abbondante citoplasma chiaro, debolmente eosinofilo, a margini nettamente definiti, e nucleo polilobato con rete cromatinica delicata o due o più piccoli nuclei, forniti di nucleoli poco evidenti. Gli spazi simil-lacunari in cui le cellule nelle sezioni istologiche appaiono spesso situate, sono artefatti dovuti al fissativo (formolo). Sono peculiari del sottotipo sclero-nodulare (NS) (fig. 4, E e F).

d) *Cellule pleomorfe*: sono elementi multiformi con ampio citoplasma basofilo e nuclei bizzarri. Si osservano soprattutto nel sottotipo istologico a deplezione linfocitica (LD) (fig. 4, D e 6, B).

e) *Cellule nane* e cellule «mummificate»: rappresentano forme displastiche o aspetti degenerativi o senescenti delle cellule H-RS.

Per quanto attiene alle *caratteristiche citochimiche*, nel citoplasma sia delle cellule H che delle RS sono talora reperibili granuli o anche blocchi grossolani di materiale PAS+, in parte diastasi-sensibile (glicogeno) ed in parte di natura mucoproteica, forse espressione di fagocitosi. La reattività delle cellule H-RS e varianti ai test per le esterasi non specifiche e le fosfatasi acide è spesso nulla (Quaglini *et al.*, 1978).

Circa l'*attività proliferativa* delle cellule H-RS, v. sotto *Patogenesi*, col. **3303, e fig. 42. Si può qui notare che esiste una correlazione tra valori di elevata attività proliferativa delle cellule H-RS e presentazione della malattia in forma *bulky* (Abele *et al.*, 1997).

Componente reattiva

Ne fanno parte elementi cellulari di natura diversa: piccoli linfociti con nucleo rotondo a contorni regolari o con minime irregolarità della membrana nucleare, plasmacellule, grandi mononucleati a morfologia simil-immunoblastica, granulociti neutrofili ed eosinofili, monociti/macrofagi (cellule epitelioidi), fibroblasti. Le cellule linfoidi sono in parte linfociti T attivati, specie quelle che circondano («peripole» le cellule H-RS (fig. 2), ed altre mostrano morfologia monocitoide simil-blastica (cellule «transizionali»). Le une e le altre sono in ciclo (MLB1+) e spesso in fase S (³H-timidina+). Il loro significato potrebbe essere diverso: sono chiaramente reattivi i piccoli linfociti attivati, di dubbia interpretazione le grandi cellule «blastiche».

Oltre alle suddette popolazioni cellulari sono spesso presenti fibroblasti nonché una *componente fibrillare*, argento-fila o collagene, che può addensarsi in aree di vera e propria sclerosi: è in genere distribuita irregolarmente ma talora ap-

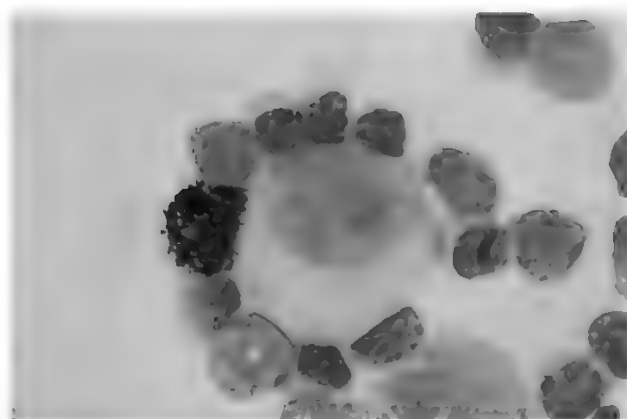


Fig. 2. Malattia di Hodgkin. Cellule linfonodali sopravvissute in coltura a breve termine, marcatura con ^3H -timidina e colorazione con Giemsa. Fenomeno della peripolarità: la cellula di Hodgkin è circondata da linfociti T, uno dei quali è in fase S (marcato con ^3H -timidina).

pare estesa a tutto il linfonodo. Caratteristiche particolari presenta la sclerosi nel sottotipo NS (v. oltre).

La capsula del linfonodo ed il tessuto adiposo circostante non sono di solito infiltrati da cellule linfoidi o H-RS, almeno nelle fasi iniziali di malattia. Nel sottotipo NS la capsula è costantemente ispessita e sclerotica.

Classificazioni istopatologiche

Il reperto delle cellule H-RS è certamente caratteristico ma non del tutto patognomonico della MH: singole cellule a morfologia simile si trovano infatti talvolta anche in LNH, in alcune istiocitosi maligne, in linfadenopatie «reattive» (mononucleosi infettiva, rosolia, reticolosi benigna da inoculazione, etc.); tali cellule presentano però caratteristiche immunofenotipiche non del tutto identiche a quelle proprie delle cellule H-RS della MH. *Peculiare del processo hodgkiniano è l'associazione delle sue diverse componenti, neoplas-*

tiche e «reattive», e solo in presenza di questo reperto è lecito porre diagnosi istologica di malattia di Hodgkin.

L'associazione delle componenti cellulari della MH può presentarsi in rapporti quantitativi diversi. Ne derivano quadri istopatologici notevolmente differenti, oggetto di numerose classificazioni istopatologiche, proposte anche con l'intento di correlare i diversi sottotipi morfologici della malattia con la sua evoluzione clinica, con la responsività alle terapie e con la prognosi. Per molti anni è stata seguita la classificazione di Jackson e Parker (1944-47), i quali distinsero un «paragranuloma», un «granuloma» ed un «sarcoma» di Hodgkin, attribuendo solo a quest'ultimo natura sicuramente neoplastica. Tale classificazione è stata in seguito sostituita da quella di Lukes e Butler (1963-66), semplificata dalla Rye Conference (Lukes *et al.*, 1966) ma da molti ancora preferita a quest'ultima. La classificazione di Rye è tuttora vigente (si veda la tab. II, che riporta anche dati circa la frequenza dei diversi sottotipi).

È da notare che successivamente alla Rye Conference sono state descritte o meglio valorizzate non poche varianti nell'ambito di ciascun sottotipo istologico, cui però non è stata ancora conferita dignità di forme a sé stanti. Anche nella recente REAL classification dei linfomi (Harris *et al.*, 1994) una sola variante istologica è stata considerata sottotipo da aggiungere ai 4 precedenti, la «*lymphocytic rich classical Hodgkin's disease*», ma proposta come «provisional entity».

Caratteristiche dei sottotipi istologici della malattia di Hodgkin (MH)

Predominanza linfocitica (LP)

Tale sottotipo rappresenta circa il 10% dei casi di MH. Comprende una variante a proliferazione di tipo diffuso (tipo diffuso L&H di Lukes e Butler), che copre circa 2/3 della casistica LP, e una variante nodulare. In ambedue le tipiche cellule H-RS sono rare, mentre più numerose (fino al 10% della totale popolazione cellulare presente) sono le cosiddette *popcorn cells* (variante L&H dell'oncotipo hodgkiniano) già descritte. Repetere un numero elevato di cellule H-RS tipiche e della loro variante L&H deve fare prospettare la diagnosi di MH a cellularità mista piuttosto che quella di sottotipo LP.

Nella variante LP diffusa la normale architettura linfonodale è di solito completamente cancellata per la larga infiltrazione del parenchima da parte di piccoli linfociti, congiunta ad iperplasia monocito/macrofagica («istiocitica») di variabile entità e talora predominante sulla stessa popolazione linfocitica (fig. 3, C); frequentemente si nota eosinofilia tessutale. Le cellule monocitoidi («epitelioidi») appaiono isolate o raggruppate in nidi; il loro numero varia notevolmente da caso a caso, e può essere cospicuo.

Nella variante LP nodulare («paragranuloma nodulare») si osservano strutture nodulari costituite prevalentemente da linfociti piccoli di linea B, tranne gli elementi a stretto contatto con le *popcorn cells*, che sono di linea T, CD57+ (Mason *et al.*, 1994). I linfociti sono commisti a cellule epitelioidi in misura di solito inferiore a quella apprezzabile nella variante diffusa (fig. 3, A). I noduli hanno varia grandezza, margini spesso mal definiti (meglio delimitabili se si procede all'impregnazione argentea del reticolo). Nei noduli è presente una larga trama di cellule dendritiche follicolari, che mancano invece abitualmente nella varietà diffusa. La forma nodulare di LP è spesso associata, nello stesso linfonodo o in altri linfonodi dello stesso paziente, ad una particolare forma follicolare iperplastica, denominata «centri germinativi progressivamente trasformati» (PTGC), mancanti quasi completamente di centro germinativo (Hansmann *et al.*, 1984). Del significato patogenetico di tale struttura si dirà più oltre (v. *Patogenesi*).

La diagnosi differenziale istopatologica (DD) del sottotipo LP deve tenere presenti le comuni iperplasie reattive «non specifiche», la varietà «cellulare» del sottotipo MH sclero-nodulare e il sottotipo a cellularità mista (v. oltre), talora i LNH follicolari ed i L. linfocitici con aspetti pseudofollicolari (grandi centri proliferativi, v. oltre).

TAB. II. MALATTIA DI HODGKIN. CLASSIFICAZIONE DEI SOTTOTIPI ISTOLOGICI

Lukes e Butler (1966)	Rye Conference (1966) REAL classification (1994)	Frequenza (%) all'esordio
1. Tipo linfocitico c/o istiocitico (L&H) a) nodulare b) diffuso	1. Predominanza linfocitica (LP)	5-12,6
2. Sclerosi nodulare (NS)	2. Sclerosi nodulare (NS)	45,2-60
3. Cellularità mista (MC)	3. Cellularità mista (MC)	35,2
4. Tipo con fibrosi diffusa	4. Deplezione linfocitica (LD)	5,0-7,0
5. Tipo «reattivo»	MH classica ricca di linfociti	?

«Provisional entity» contemplata dalla REAL (Harris *et al.*, 1994).
NB: il sottotipo istologico «inclassificabile», se non è associato a sclerosi, va considerato come un sottotipo ad alta malignità.

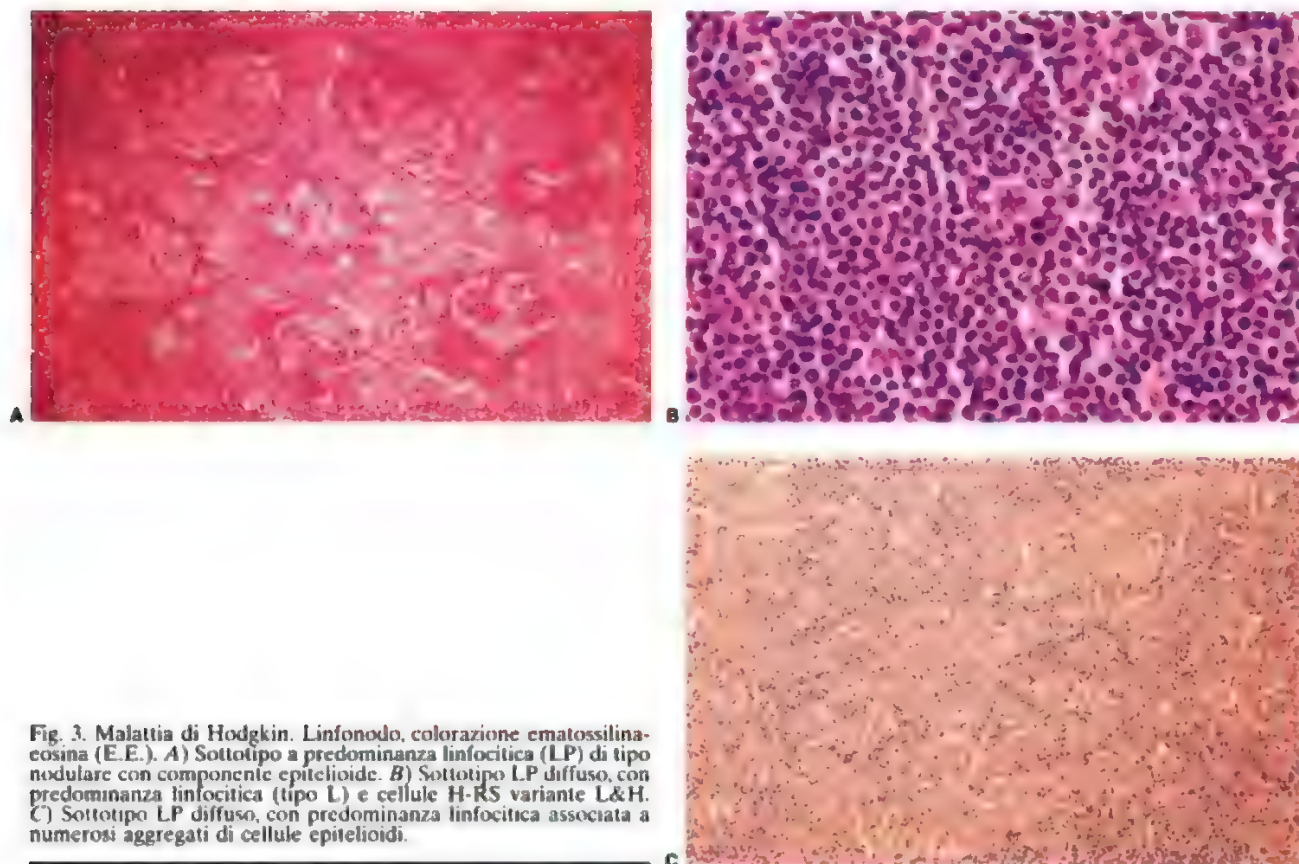


Fig. 3. Malattia di Hodgkin. Linfonodo, colorazione ematossilina-eosina (E.E.). A) Sottotipo a predominanza linfocitica (LP) di tipo nodulare con componente epitelioida. B) Sottotipo LP diffuso, con predominanza linfocitica (tipo L) e cellule H-RS variante L&H. C) Sottotipo LP diffuso, con predominanza linfocitica associata a numerosi aggregati di cellule epitelioidi.

Particolare attenzione dev'essere rivolta anche al cosiddetto *Histiocyte-rich B-cell lymphoma* (Delabie *et al.*, 1992). Tale l. è caratterizzato da due aspetti fondamentali: a) scarsa quantità delle cellule neoplastiche, costituite da elementi linfoidi simili alla variante L&H delle cellule H-RS; la proliferazione ha aspetto nodulare/diffuso; i linfociti B neoplastici infiltrano la capsula e il tessuto lasso perilinfonodale (evento solitamente estraneo alla MH); b) cospicuo infiltrato reattivo, composto da istiociti morfologicamente e biologicamente normali (privi di aspetto epitelioida) e da piccoli linfociti T non neoplastici. Tale l. dev'essere a sua volta differenziato dal cosiddetto *T-cell-rich large B-cell lymphoma* (v. col. **3265).

Sclerosi nodulare (NS)

Il sottotipo NS della MH viene reperito nel 45% della casistica hodgkiniana (v. sopra *Epidemiologia*). È tipicamente caratterizzato (fig. 4, A) dalla presenza nei linfonodi di grosse bande di tessuto fibroso denso (birifrangente al microscopio polarizzatore) che circondano e intersecano aree di processo hodgkiniano. Nelle aree nodulari ampiamente variabile da caso a caso è la frequenza delle diverse componenti cellulari del processo hodgkiniano; inoltre l'oncotipo hodgkiniano è presente nella sua variante di «cellula lacunare» più che in forma di tipiche cellule H-RS. Prevale di solito i quadri di cellularità mista, ma è possibile rinvenire aspetti del tipo a prevalenza linfocitica (LP) oppure a deplezione linfocitica (LD). Molto spesso abbondano i granulociti eosinofili.

Sono state individuate varianti isto-citologiche del sottotipo NS. a) La più frequente è la «forma nodulare pura» (o «fase cellulata» della NS); presenta minima od anche nulla fibrosi, raggruppamento delle cellule lacunari in grossi nidi non circoscritti da trave connettivale (è però sempre presente cospicua sclerosi della capsula). b) Non è rara la «variante fibroblastica» della NS (Suster, 1986), caratterizzata da spiccata iperplasia di fibroblasti fusiformi, talora così intensa da ricordare il quadro istologico dell'istiocitoma fibroso maligno. c) I casi di NS con forte compo-

nente di aggregati e colate di cellule lacunari pleomorfe e di cellule mononucleate di Hodgkin vengono indicati come «variante siniziale» della NS (Ben-Yelmda-Salz *et al.*, 1990). In casi siffatti perplessità diagnostiche possono insorgere nei confronti di LNH a grandi cellule, di carcinomi metastatici, del seminoma, del melanoma (Burke, 1992). d) Per la «variante interfollicolare» v. oltre.

La variabilità delle componenti cellulari nel sottotipo NS ha indotto vari AA. a subclassificare la NS in varianti NS/LP, NS/MC1 e 2, NS/LD, aventi prognosi diversa. Bennett *et al.* (1985) hanno successivamente riunito le varianti NS/LP e NS/MC1 in NS grado 1 e le varianti NS/MC2 e NS/LD in NS grado 2, a prognosi più severa.

Cellularità mista (MC)

È notevolmente frequente (35% dei casi; v. sopra *Epidemiologia*). Istologicamente presenta tutta la classica eterogeneità cellulare del processo hodgkiniano (fig. 5). Le cellule H-RS hanno morfologia tipica, sono spesso numerose e sempre facilmente identificabili. L'architettura del linfonodo è quasi sempre completamente sovvertita ma il processo hodgkiniano può talora risparmiare alcune aree del parenchima ed in tal caso appare predominante nelle aree paracorticali, in sede perifollicolare, da dove si diffonde fino a circoscrivere progressivamente i follicoli (Fiore Donati *et al.*, 1985). Se in tali casi di interessamento parziale del parenchima linfonodale esiste un quadro di iperplasia follicolare reattiva di tipo antigenicamente stimolato, si può parlare di «MH di tipo interfollicolare» (Doggett *et al.*, 1983). Analoghe espressioni morfologiche si possono rinvenire anche nel sottotipo NS.

La diagnosi differenziale del sottotipo MC può talvolta offrire difficoltà. Infatti il sottotipo MC della MH occupa una posizione centrale tra il sottotipo PL e quello LD, per cui vi possono essere casi di confine con l'uno o con l'altro tipo. Incertezze diagnostiche possono insorgere anche nei confronti della cosiddetta «forma cellulata» del sottotipo NS, della linfadenopatia angioimmunoblastica, di LNH a cellule T periferiche a proliferazione dif-

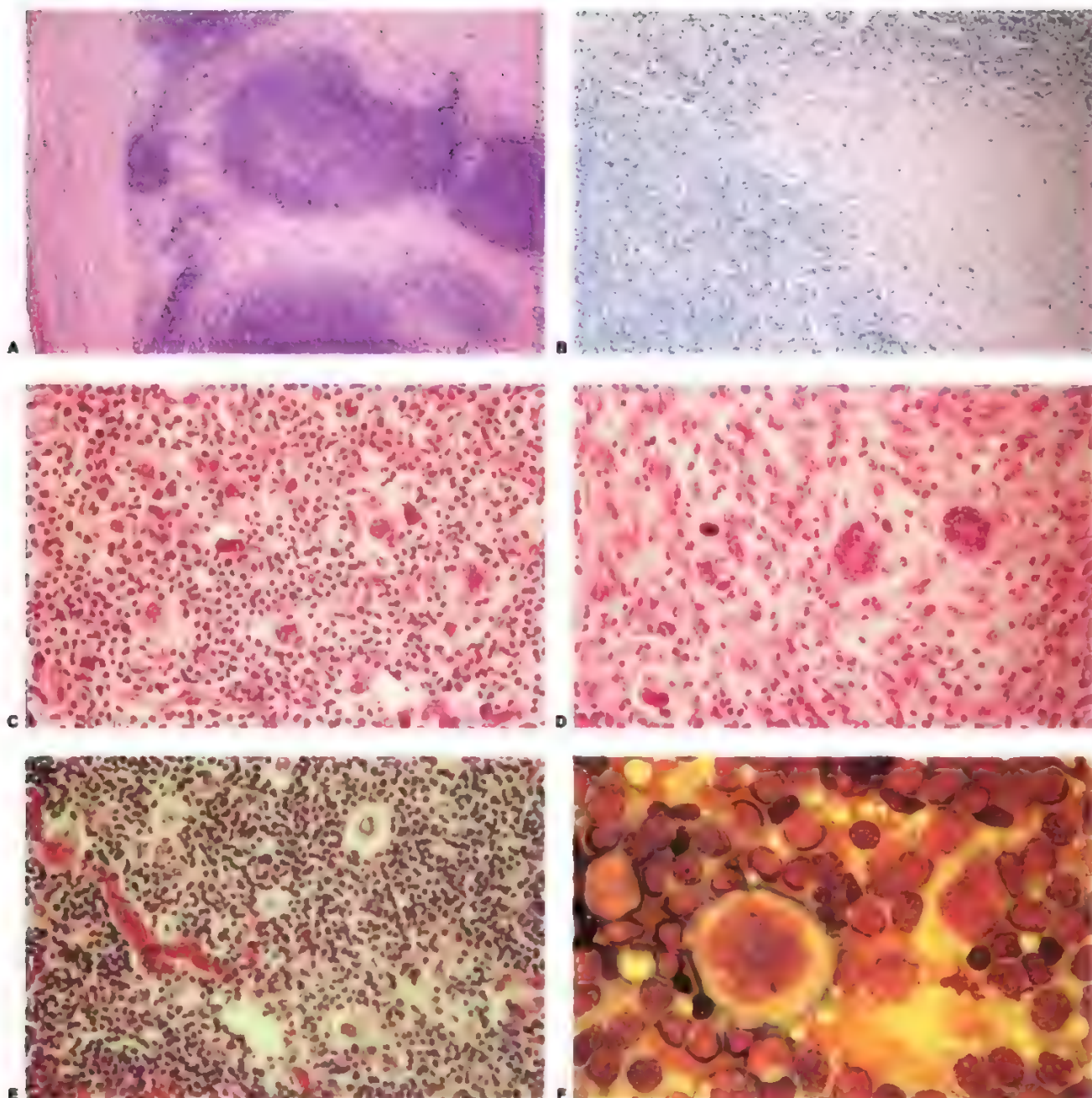


Fig. 4. Malattia di Hodgkin. Linfonodo, colorazione E.E. A) Sottotipo sclero-nodulare (NS). B) Sottotipo NS con aree cellulari LP. C) Sottotipo NS con aree cellulari MC. D) Sottotipo NS con aree cellulari LD e cellule H-RS pleomorfe. E) Sottotipo NS con tipiche cellule lacunari. F) Sottotipo NS (apposizione di linfonodo, colorazione MGG), cellule lacunari.

fusa con cellule miste grandi e piccole, e del I. di Lennert (v. sotto col. **3277).

Diagnosi differenziale (LPH)

È un sottotipo non classico (NS-L) dei casi di MH. Raggruppa espressioni eterogenee di noduli nodulari parzialmente o completamente deplezione linfocitica (fig. 6). Disinquiniamo a) quadri di fibrosi con iperplasia fibrillare e presenza di fibroblasti e di «cellule reticolari»; sono spesso presenti ampie aree irregolarmente distribuite di connettivo amorfo non collagene (non birifrangente) contenente molte loro maglie scarse cellule linfoidi e/o tipiche cellule H-RS, assai variabile da caso a caso è il numero dei granulociti eosinofili, b) qua-

dro di tipo «reticolare», caratterizzato da predominante presenza di classiche cellule H-RS in un contesto cellulare misto che può ricordare il sottotipo MC ma è povero di linfociti, oppure è contrassegnato da forte componente di cellule H-RS di tipo pleomorfo. Le fibre reticolari sono iperplastiche. Usualmente sono presenti piccole aree di necrosi fibrinoide, infiltrate da granulociti neutrofili.

La diagnosi differenziale va posta talora nei confronti di altri sottotipi della MH (variante sinciziale della NS, MC con spiccata iperplasia di grandi cellule mononucleate più che di classiche cellule H-RS) e nei riguardi dei LNH a grandi cellule di tipo immunoblastico, ma soprattutto dei LNH a grandi cellule anaplastiche (CD30 (Ki-1) positive (v. col. **3402).

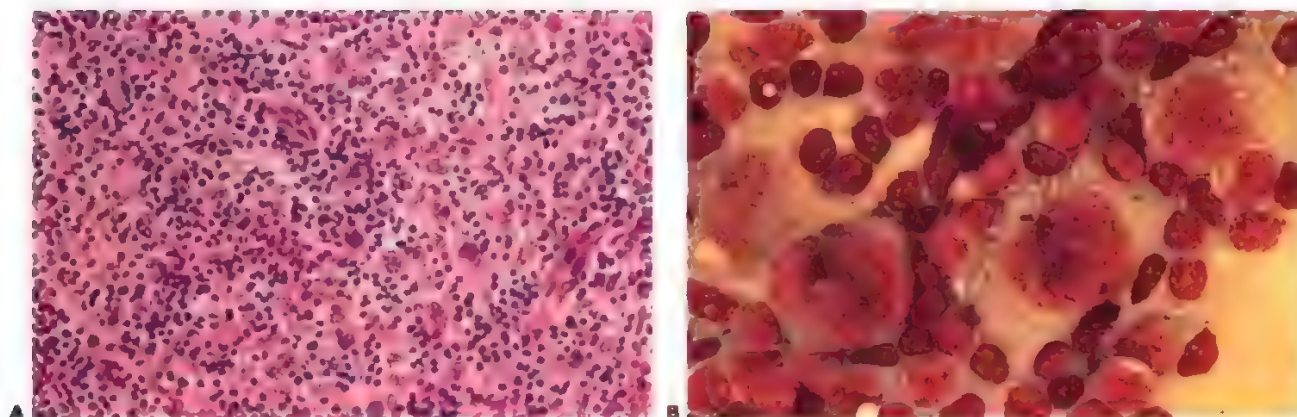


Fig. 5. Malattia di Hodgkin. Linfonodo. A) Sottotipo a cellularità mista (MC), colorazione E.E. B) Sottotipo MC (apposizione, colorazione MGG), cellule H-RS «diagnostiche».

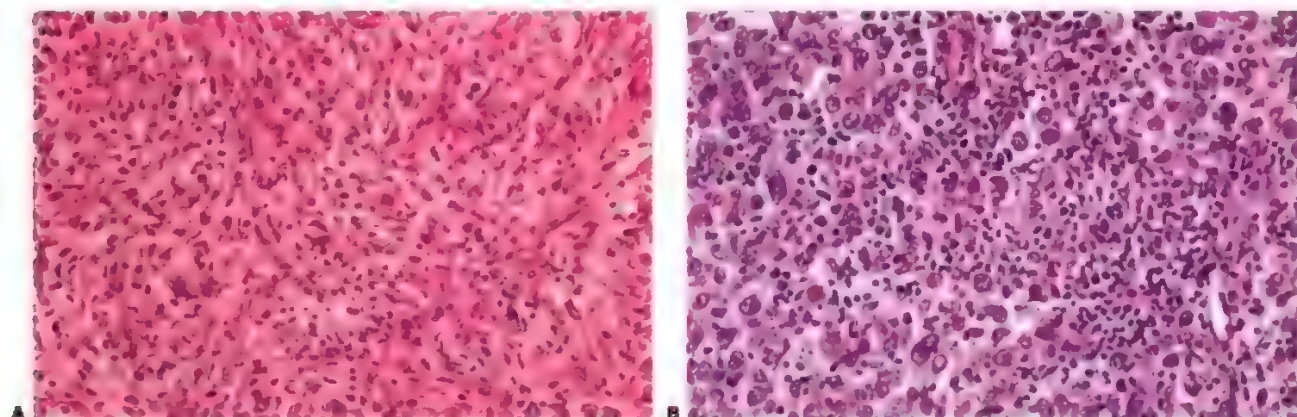


Fig. 6. Malattia di Hodgkin. Linfonodo, colorazione E.E. A) Sottotipo a deplezione linfocitica (LD) con fibrosi interstiziale. B) Sottotipo DL, variante «reticular predominance», con numerosissime cellule H-RS.

Malattia di Hodgkin classica ricca di linfociti

Il raro quadro morfologico di linfoma che va sotto il nome di «*lymphocyte-rich classical HD*» è stato incluso — con riserva — nella recente classificazione REAL (Harris *et al.*, 1994). È una variante delle forme di MH a prevalenza linfocitica, caratterizzata da una diffusa proliferazione di piccoli linfociti per lo più di linea T, commista a numerose cellule H-RS a tipica morfologia. Queste peculiarità non consentono di ascrivere tale forma al classico sottotipo LP diffuso, e piuttosto esistono aspetti *borderline* con la NS di tipo «cellulare» e con il sottotipo MC. La DD dovrà tenere presente pure il «*T-cell rich large B-cell lymphoma*», che talora mostra notevoli affinità istologiche (ma non fenotipiche) con la «MH-classica ricca di linfociti» (v. sotto, col. **3265).

Reperti istopatologici delle localizzazioni hodgkiniane in sedi extralinfonodali

Nelle localizzazioni extralinfonodali la MH può offrire talora reperti istopatologici alquanto dissimili da quelli descritti nei linfonodi, ed è opportuno segnalarli per le difficoltà interpretative che talora pongono, specie se si tratta di localizzazione primaria (peraltro rara). Di solito tuttavia il quadro morfologico e immunofenotipico della MH è mantenuto anche in sede extralinfonodale (Chang *et al.*, 1995).

La milza può presentare grosse masse hodgkiniane ma anche noduli solitari di soli 1-3 mm di diametro, spesso circoscritti alle aree T dei manicotti linfoidi periarteriolari e/o situati nelle zone marginali dei follicoli; più frequenti sono però i noduli multipli,

sparsi. Le localizzazioni hodgkiniane minime devono essere distinte dalle piccole formazioni granulomatoze simil-sarcoidi, visibili sulla superficie di taglio dello splene in più del 9% dei casi di MH; vanno interpretate come iperplasie linfoidi reattive (Burke *et al.*, 1992) e non possono essere addotte come prova di un coinvolgimento della milza nella malattia hodgkiniana.

La diagnosi di localizzazione del processo hodgkiniano nel midollo osseo e nel fegato è spesso difficile, perché le piccole dimensioni del materiale biopsiato possono rendere vana la ricerca di aree con chiara presenza di cellule H-RS. A sospettare la presenza nel midollo osseo di aree hodgkiniane è talora sufficiente reperire in zone di fibrosi circoscritte anche una sola cellula mononucleata con grosso nucleolo (v. anche sotto, col. **3361). La localizzazione epatica può essere arguita dall'osservazione negli spazi portali di una infiltrazione di linfociti atipici, sempre che la diagnosi di MH sia già stata documentata in una biopsia linfonodale. Sia nel midollo osseo che nel fegato di pazienti hodgkiniani non è raro reperire reazioni aspecifiche (piccoli granulomi epiteloidi, noduli linfoidi benigni, edema) (Dich *et al.*, 1989).

Nelle localizzazioni hodgkiniane al polmone prevale il sottotipo istologico NS, nella cui diagnosi differenziale (specie se si tratta di localizzazione primaria) si devono tenere presenti anche la granulomatosi di Wegener, la granulomatosi linfomatoide ed i LNH a cellule miste o grandi, del tipo immunoblastico T polimorfo.

Pure nelle rare localizzazioni intracraniali della MH predomina l'istotipo NS.

LINFOMI

Le insolite localizzazioni cutanee della MH (papule, noduli) sono in genere dovute a diffusione per via linfatica retrograda da linfonodi regionali interessati al processo. La maggior parte dei casi considerati quali localizzazioni cutanee primitive della MH sono in realtà casi di papulosi linfomatoide o di LNH a grandi cellule anaplastiche CD30 positive.

Anche le osservazioni di MH a primitiva sede gastro-intestinale, nell'anello di Waldeyer (tonsille palatine e linguale), al rinofaringe, alle ghiandole salivari (parotidi, sottomandibolari) e alla laringe sono sempre da considerare con sospetto e devono essere convalidate da rigorosi esami citoimmunologici.

Linfoma composito

Ogni sottotipo istologico della MH può talora coesistere con un LNH, per lo più del tipo a grandi cellule, di linea B o — meno frequentemente — T («linfoma composito»). Topograficamente i due processi possono essere commisti oppure appaiono separati da un'area di demarcazione abbastanza netta; talora sono situati in linfonodi diversi, contigui o in stazioni diverse (Gonzales *et al.*, 1991). Dal punto di vista cronologico, i due L possono insorgere in modo sincrono o metacrono. Un LNH a cellule B, sincrono o metacrono ad una MH-LP nodulare, può essere interpretato quale derivazione (o trasformazione) del processo hodgkiniano, che in tale sottotipo di MH è di linea linfocitaria B. Più insolito è rinvenire in seno alla MH-LP nodulare l'evoluzione simultanea di un LNH-T (Delabie *et al.*, 1996). Si imputa tale evento ai difetti immunoregolatori propri della MH oppure alla cronica stimolazione della componente T-linfocitaria reattiva da parte delle cellule hodgkiniane. Verosimilmente diversa è la patogenesi dei LNH B e dei LNH T-periferici insorgenti tardivamente in casi di MH, interpretabili quali processi secondari, terapia correlati (Rysenga *et al.*, 1995).

Bibliografia

- Abele M. C., Valente G., Kerim S. *et al.*, *Haematologica*, 1997, **82**, 281-285.
- Ashton-Key M., Thorpe P. A., Allen J. P., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 1294-1299.
- Bennett M. H., MacLennan K. A., Easterling M. J. *et al.*, in Quaglino D., Hayhoe F. G. J. eds., *The cytobiology of leukaemias and lymphomas*, 1985, Raven Press, New York, pp. 15-32.
- Ben-Yelmda-Salz D., Ben-Yelmda A., Poliak A. *et al.*, *Cancer*, 1990, **65**, 1167-1172.
- Burke J. S., *Hodkin's disease: Histopathology and differential diagnosis*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 497-533.
- Chang K. L., Kamel O. W., Arber D. A. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 1313-1324.
- Delabie J., Greiner T. C., Chan W. C., Weisenburger D. D., *Amer. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 355-362.
- Delabie J., Vandenberghe E., Kennes C. *et al.*, *Amer. J. Surg. Pathol.*, 1992, **16**, 37-48.
- Dich N. H., Goodman Z. D., Klein M. A., *Cancer*, 1989, **64**, 2121-2126.
- Doggett R. S., Colby T. V., Dorfmann R. F., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1983, **7**, 145-149.
- Fiore Donati L., Menestrina F., Chilosi M., in Quaglino D., Hayhoe F. G. J. eds., *The cytobiology of leukaemias and lymphomas*, 1985, Raven Press, New York, pp. 1-14.
- Gonzales C. L., Medeiros L. J., Jaffe E. S., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1991, **96**, 81-89.
- Hansmann M. L., Swingers T., Boeske A. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1984, **108**, 321-330.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 1361-1392.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H. *et al.*, *Hodgkin's disease and allied disorders*, 1994, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Kaplan H. S., *The Hodgkin's disease*, 2 ed., 1980, Harvard Univ. Press, Cambridge (Mass).
- Lukes R. J., Butler J. J., *Cancer Res.*, 1966, **26**, 1063-1081.
- Lukes H. J., Butler J. J., Hicks F. W., *Cancer*, 1966, **19**, 317-344.
- MacLennan K. A., Bennett M. H., *Cancer*, 1986, **64**, 1686.
- Mason D. Y., Banks P. M., Chan J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1994, **18**, 576-580.
- Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La Malattia di Hodgkin*, 1986, Mucchi Ed., Modena.

- Quaglino D., De Pasquale A., Artusi T. *et al.*, *Haematologica*, 1978, **63**, 241-264.
- Rysenga E., Linden M. D., Carey J. L. *et al.*, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1995, **119**, 88-91.
- Suster S., *Cancer*, 1986, **57**, 264.

CARLO MAURI

REPERTI ISTOCITOLOGICI DEI LINFOMI NON-HODGKIN. CLASSIFICAZIONE DEGLI ISTOTIPI

SOMMARIO

CLASSIFICAZIONI	col. 3228
1. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B	col. 3231
1.1. LINFOMI DERIVATI DA PRECURSORI CELLULARI B	col. 3231
1.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA B-LINFOBLASTICO	col. 3233
Denominazioni equivalenti (col. 3233). - Reperti istocitologici (col. 3233). - Immunofenotipo e genetica molecolare (col. 3234). - Anomalie cariotipiche (col. 3235).	
1.2. LINFOMI DERIVATI DA CELLULE B PERIFERICHE	col. 3235
1.2.1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE B. LEUCEMIA PROLINFOCITICA B. LINFOMA LINFOCITICO A PICCOLE CELLULE	col. 3235
Denominazioni equivalenti (col. 3235). - Introduzione (col. 3236). - Reperti istocitologici (col. 3236). - Leucemia linfatica cronica (B-CLL). - Leucemia prolinfocitica B (B-PLL). - Linfoma a piccoli linfociti (SLL). - Immunofenotipo (col. 3239). - Citogenetica (col. 3240).	
1.2.2. LINFOMA LINFOPLASMACITOIDE (IMMUNOCITOMA)	col. 3240
Denominazioni equivalenti (col. 3240). - Definizione (col. 3240). - Reperti citologici (col. 3240). - Immunofenotipo e genetica molecolare (col. 3241). - Reperti istologici (col. 3241).	
1.2.3. LINFOMA DELLE CELLULE MANTELLARI	col. 3241
Denominazioni equivalenti (col. 3241). - Definizione (col. 3242). - Reperti istologici e citologici (col. 3242). - Reperti citochimici (col. 3244). - Immunofenotipo (col. 3244). - Anomalie citogenetiche e genetica molecolare (col. 3244).	
1.2.4. LINFOMI DEL CENTRO FOLLICOLARE	col. 3245
Denominazioni equivalenti (col. 3245). - Definizione (col. 3245). - Reperti citologici (col. 3245). - Immunofenotipo e anomalie cromosomiche (col. 3245). - Reperti istologici (col. 3246).	
1.2.5. LINFOMA A CELLULE B DELLA ZONA MARGINALE (LINFOMA A CELLULE B MONOCITOIDI, MALT-LINFOMI A BASSA MALIGNITÀ)	col. 3247
Denominazioni equivalenti (col. 3247). - Premessa (col. 3248): Tessuto linfoide associato alle mucose (MALT). - Linfoma della zona marginale (MZBL) (con cellule B monocitoidi MBC) (col. 3250): Reperti citologici. - Reperti istologici. - MALT-linfomi non-Hodgkin (col. 3251): Quadro istocitologico. - Linfoma splenico primario della zona marginale (col. 3254).	
1.2.6. TRICOLEUCEMIA	col. 3255
Denominazioni equivalenti (col. 3255). - Premessa (col. 3256). - Reperti citologici (col. 3256). - Reperti ultrastrutturali (col. 3256). - Reperti citochimici (col. 3256). - Attività proliferativa (col. 3256). - Fenotipo (col. 3256). - Citogenetica e genetica molecolare (col. 3256). - Reperti istopatologici (col. 3257). - Hairy cell leukemia variant (HCL-v) (col. 3258).	
1.2.7. PLASMACITOMA	col. 3258
Plasmacitoma primario extramidollare (col. 3258).	
1.2.8. LINFOMA A GRANDI CELLULE B (A CRESCITA DIFFUSA)	col. 3259
Denominazioni equivalenti (col. 3259). - Premessa (col. 3259). - Reperti istocitologici (col. 3260): Centroblasto neoplastico. - Immunoblasto B neoplastico. - Linfoma a grandi cellule anaplastiche. - Immunofenotipo (col. 3263). - Genetica molecolare e citogenetica. - Forme particolari dei linfomi a grandi cellule B (col. 3265): Linfoma a grandi cellule B ricco di linfociti T. - Linfoma a grandi cellule B a crescita nodulare medullare (tumore).	

1.2.9. LINFOMA DI BURKITT col. 3267

Denominazioni equivalenti (col. 3267). - Premessa (col. 3268). - Reperti citologici (col. 3268). - Reperti citochimici (col. 3268). - Fenotipo (col. 3269). - Citogenetica e genetica molecolare (col. 3269). - Proliferazione (col. 3269). - Reperti istologici (col. 3269). - Linfoma a cellule B ad alta malignità, Burkitt-simile (col. 3269).

2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE T (E NK) col. 3271

2.1. NEOPLASIE DERIVATE DA PRECURSORI CELLULARI T col. 3271

2.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA T-LINFOBLASTICO col. 3271

Denominazioni equivalenti (col. 3271). - Reperti istocitologici (col. 3271). - Immunofenotipo (col. 3272). - Clonogenetica e genetica molecolare (col. 3272).

2.2. NEOPLASIE DERIVATE DA CELLULE LINFODI T-PERIFERICHE col. 3273

2.2.1. LINFOMI A CELLULE T-PERIFERICHE NON ALTREMENTI SPECIFICABILI (T-DPL) col. 3275

Denominazioni equivalenti (col. 3275). - Caratteristiche istocitolo-

TAB. III. ENTITÀ LINFOMATOSE DELLA WORKING FORMULATION E SUOI EQUIVALENTI NELLA CLASSIFICAZIONE DI KIEL

Working Formulation		Kiel equivalenti
Low grade		
A. Malignant lymphoma Small lymphocytic consistent with CLL plasmacytoid		ML lymphocytic, CLL ML lymphoplasmacytic/-cytoid
B. Malignant lymphoma, follicular Predominantly small cleaved cell diffuse areas sclerosis	}	ML centroblastic-centrocytic (small cell) follicular ± diffuse
C. Malignant lymphoma, follicular Mixed, small cleaved and large cell diffuse areas sclerosis		
Intermediate grade		
D. Malignant lymphoma, follicular Predominantly large cell diffuse areas sclerosis		ML centroblastic-centrocytic (large cell), follicular ML centroblastic, follicular
E. Malignant lymphoma, diffuse Small cleaved cell sclerosis		ML centrocytic, small cell?
F. Malignant lymphoma, diffuse Mixed, small and large cell sclerosis epithelioid cell component	}	ML centroblastic-centrocytic small cell, diffuse ML lymphoplasmacytic/-cytoid, polymorphic
G. Malignant lymphoma, diffuse Large cell cleaved cell noncleaved cell sclerosis		
High grade		
H. Malignant lymphoma Large cell, immunoblastic plasmacytoid clear cell polymorphous epithelioid cell component		ML immunoblastic Peripheral T-cell lymphoma (T-zone lymphoma) Lymphoepithelioid lymphoma
I. Malignant lymphoma Lymphoblastic convoluted cell nonconvoluted cell		ML lymphoblastic, convoluted cell type ML lymphoblastic, unclassified
J. Malignant lymphoma Small noncleaved cell Burkitt's follicular areas		Burkitt's lymphoma and other B-lymphoblastic
Miscellaneous		
Composite Mycosis fungoides Histiocytic Extramedullary plasmacytoma Unclassifiable Others		Mycosis fungoides ML plasmacytic

LINFOMI

giche (col. 3275). - Immunofenotipo e genetica molecolare (col. 3277). - Citogenetica (col. 3277). - Linfoma a cellule linfo-epiteloidi (col. 3277): *Reperti citologici*. - *Reperti istologici*. - *Diagnosi differenziale*.

2.2.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE T. LEUCEMIA PROLINFOCITICA T col. 3279

Denominazioni equivalenti (col. 3279). - *Reperti citologici* (col. 3279). - *Reperti citochimici* (col. 3280). - *Immunofenotipo* (col. 3280). - *Anomalie cromosomiche* (col. 3280). - *Reperti istologici* (col. 3280).

2.2.3. LEUCEMIE A GRANDI LINFOCITI GRANULATI col. 3281

Denominazioni equivalenti (col. 3281). - *Reperti citologici* (col. 3281). - *Reperti istopatologici* (col. 3282). - *Conclusioni* (col. 3282).

2.2.4. MICOSI FUNGOIDE E SINDROME DI SÉZARY col. 3282

Denominazioni equivalenti (col. 3282). - *Introduzione* (col. 3282). - *Reperti citologici* (col. 3283). - *Immunofenotipo* (col. 3283). - *Genetica molecolare e citogenetica* (col. 3284). - *Reperti istologici* (col. 3284).

2.2.5. LINFOMA EPATOSPLENICO A CELLULE T GAMMA-DELTA col. 3287

Reperti citologici (col. 3287). - *Reperti istologici* (col. 3287).

2.2.6. LINFOMA SOTTOCUTANEO DI TIPO PANNICULITICO A CELLULE T col. 3287

Istocitologia (col. 3287). - *Genetica* (col. 3288).

2.2.7. LINFOMA ANGIOIMMUNOBLASTICO col. 3288

Denominazioni equivalenti (col. 3288). - *Introduzione* (col. 3288). - *Reperti istocitologici all'esordio* (col. 3289). - *Etiologia* (col. 3291). - *Progressione linfomatosa* (col. 3291).

2.2.8. LINFOMA ANGIOCENTRICO col. 3291

Denominazioni equivalenti (col. 3291). - *Introduzione* (col. 3292). - *Reperti istocitologici* (col. 3292). - *Fenotipo e genetica molecolare* (col. 3295). - *Conclusioni* (col. 3295).

2.2.9. LINFOMA PRIMITIVO INTESTINALE A CELLULE T, ASSOCIATO AD ENTEROPATIA col. 3296

Denominazioni equivalenti (col. 3296). - *Introduzione* (col. 3296).

- *Reperti istocitologici* (col. 3296). - *Fenotipo e genetica molecolare* (col. 3297).

2.2.10. LINFOMA/LEUCEMIA DELL'ADULTO A CELLULE T col. 3297

Denominazioni equivalenti (col. 3297). - *Reperti istocitologici* (col. 3297). - *Citogenetica* (col. 3298). - *Immunofenotipo e genetica molecolare* (col. 3298).

2.2.11. LINFOMA A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE (CD30+) (A CELLULE T O NULL) col. 3299

Denominazioni equivalenti (col. 3299). - *Introduzione* (col. 3299). - *Reperti citologici* (col. 3299). - *Reperti citochimici* (col. 3300). - *Fenotipo* (col. 3300). - *Genetica molecolare* (col. 3300). - *Citogenetica* (col. 3301). - *Varianti istocitologiche* (col. 3301).

CLASSIFICAZIONI

La pluralità dei quadri istocitologici, le multiformi espressioni cliniche, la diversità del decorso e della prognosi hanno reso oltremodo difficile, per decenni, un razionale inquadramento classificatorio dei l. non-Hodgkin (LNH), che fosse biologicamente corretto, applicabile alla diagnostica istopatologica routinaria ed avesse pure un significativo risvolto clinico e prognostico.

Una classificazione su basi puramente morfologiche, proposta da Rappaport (1966), fu bene accolta ma ben presto apparve inadeguata di fronte ai profondi mutamenti delle conoscenze circa il sistema linfocitario ed i suoi processi neoplastici, maturate dopo gli anni sessanta. Da qui un fiorire di numerose classificazioni dei LNH, di cui alcune divennero rapidamente obsolete o non furono mai universalmente impiegate e solo quattro ebbero seguito: la classificazione di Lukes e Collins (1974), largamente accettata negli USA e seguita anche dagli AA. della voce LINFOMA nell'edizione 1980 di questa stessa *Enciclopedia Medica Italiana*; la classificazione di Kiel (Lennert 1975-78), estesamente adottata in Europa e più volte emendata, fino alla « Updated Kiel Classification » (UKC) (Stansfeld *et al.*, 1988; Lennert e Feller, 1992); la classificazione elaborata per ini-

TAB. IV. CLASSIFICAZIONE DI KIEL AGGIORNATA 1988 (UKC), CON AGGIUNTE (1992)

LNH di linea B	LNH di linea T
<i>Low-grade malignant lymphomas</i>	
Lymphocytic	Lymphocytic
Chronic lymphocytic leukaemia	Chronic lymphocytic leukaemia
Prolymphocytic leukaemia	Prolymphocytic leukaemia
Hairy-cell leukaemia	
Lymphoplasmacytic/cytoid (immunocytoma)	Small cell, cerebriform
Plasmacytic	Mycosis fungoides, Sézary's syndrome
Centroblastic-centrocytic	Lymphoepithelioid (Lennert's lymphoma)
follicular ± diffuse	Angioimmunoblastic (AILD, LgX)
diffuse	T-zone lymphoma
Centrocytic (mantle cell)	Pleomorphic, small cell (HTLV-I ±)
Marginal zone including marginal zone cell	
<i>High-grade malignant lymphomas</i>	
Centroblastic	Pleomorphic, medium-sized and large cell (HTLV-I ±)
Immunoblastic	Immunoblastic (HTLV-I ±)
Burkitt's lymphoma	
Large cell anaplastic (Ki-I +)	Large cell anaplastic (Ki-I +)
Lymphoblastic	Lymphoblastic
<i>Rare types</i>	<i>Rare types</i>

ziativa del National Cancer Institute (1982) come «Working formulation for clinical usage» (WF) e la recente «Revised European - American Classification of lymphoid neoplasms» (REALC) (Harris *et al.*, 1994), ispirata a criteri generali già seguiti dalla UKC.

Ognuna di tali classificazioni ha pregi e difetti. La *classificazione di Lukes e Collins* segue criteri notevolmente affini a quelli della Scuola di Kiel, ma impiega una terminologia diversa e propone schemi di sviluppo ontogenetico della linea linfocitaria che sono stati a vario titolo criticati: in Europa non è entrata nell'uso routinario. La *classificazione di Kiel (Lennert)* è formulata su criteri morfologici (sia citologici che istologici) e su criteri biologici (distinzione tra linfomi originati negli organi linfoidi centrali o periferici, di linea linfocitaria B o T; caratteristiche fenotipiche delle cellule linfomatose) ed anche su criteri clinico-prognostici (forme a malignità bassa, intermedia, alta). La diagnosi di alcuni quadri appare tuttavia difficilmente riproducibile da osservatori diversi, e inoltre la classificazione non prende in considerazione forme di individuazione recente. La WF è imperniata su criteri morfologici elementari (dimensioni cellulari, forma del nucleo, strutturazione diffusa o nodulare della proliferazione linfomatosa) e ciò la rende facilmente applicabile ma d'altro canto non le

consente di interpretare la complessità delle espressioni morfo-biologiche dei processi linfomatosi. La REALC rappresenta un tentativo di interpretare criticamente i quadri linfomatosi in base a tutte le informazioni che oggi possediamo sul processo linfomatoso, e altresì distinguendo le forme ormai ben definite e le forme ancora imperfettamente note (presentate «in via provvisoria»). Su alcuni punti della REALC si è elevata qualche critica e riserva, anche ad opera dello stesso Lennert (1995), ma si tratta soprattutto di questioni di dettaglio, che potranno essere emendate quando la classificazione REALC sarà sottoposta al vaglio dell'applicazione routinaria. Alcuni ritocchi figureranno nella classificazione dei L. in via di elaborazione per iniziativa della WHO (1997).

Nella trattazione istopatologica dei LNH e successivamente nella descrizione dei quadri clinici seguiremo la classificazione REALC, tenendo tuttavia presenti gli opportuni riferimenti alle classificazioni WF e UKC, giacché sono ancora largamente applicate e per facilitare l'interpretazione dei reperti riportati nella letteratura.

La tab. III riporta la classificazione WF e le equivalenti entità contemplate dalla classificazione di Kiel. Nella tab. IV figura la UKC; la tab. V riproduce la REALC.

TAB. V. REVISED EUROPEAN-AMERICAN CLASSIFICATION DEI LINFOMI (REALC) (1994)

B-Cell Neoplasms

- I. Precursor B-cell neoplasm: Precursor B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma
- II. Peripheral B-cell neoplasms
 1. B-cell chronic lymphocytic leukaemia/prolymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma
 2. Lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma
 3. Mantle cell lymphoma
 4. Follicle center lymphoma, follicular
Provisional cytological grades: I (small cells), II (mixed small and large cells), III (large cells)
Provisional subtype: diffuse, predominantly small cell type
 5. Marginal zone lymphoma
Extranodal (MALT type $\pm$ monocytoid B cells)
Provisional subtype: Nodal ($\pm$ monocytoid B cells)
 6. Provisional entity: Splenic marginal zone lymphoma ($\pm$ villous lymphocytes)
 7. Hairy cell leukaemia
 8. Plasmacytoma/plasma cell myeloma
 9. Diffuse large B-cell lymphoma*
Subtype: Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma
 10. Burkitt's lymphoma
 11. Provisional entity: High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like.

T-Cell and Putative NK-Cell Neoplasms

- I. Precursor T-cell neoplasm: Precursor T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma
- II. Peripheral T-cell and NK-cell neoplasms
 1. T-cell chronic lymphocytic leukaemia/prolymphocytic leukaemia
 2. Large granular lymphocyte leukaemia
T-cell type
NK-cell type
 3. Mycosis fungoides/Sézary syndrome
 4. Peripheral T-cell lymphomas, unspecified*
Provisional cytological categories: medium-sized cell, mixed medium and large cell, large cell, lymphoepithelioid
Provisional subtype: Hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
Provisional subtype: Subcutaneous panniculitis T-cell lymphoma
 5. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AILD)
 6. Angiocentric lymphoma
 7. Intestinal T-cell lymphoma ($\pm$ enteropathy associated)
 8. Adult T-cell lymphoma/leukaemia (ATL/L)
 9. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), CD30+, T- and null-cell types
 10. Provisional entity: Anaplastic large-cell lymphoma, Hodgkin's-like

Hodgkin's Disease

- I. Lymphocyte predominance
- II. Nodular sclerosis
- III. Mixed Cellularity
- IV. Lymphocyte depletion
- V. Provisional entity: Lymphocyte-rich classical HD

* È probabile che queste categorie includano più di una entità morbosa

LINFOMI

Bibliografia

- Harris N., Jaffe E., Stein H. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 1361-1392.
 Lennert K., *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*, 1978, Springer, Berlin.
 Lennert K., *Histopathology*, 1995, **26**, 481-483.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's lymphomas*, 2 ed., 1992, Springer, Berlin.
 Lennert K., Mohri N., Stein H., Kaiserling E., *Br. J. Haematol.*, 1975, **31** (Suppl.), 193-203.
 Lukes R. J., Collins R. D., *Cancer*, 1974, **34**, 1488-1503.
 National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project*, *Cancer*, 1982, **49**, 2112-2135.
 Rappaport H., *Tumors of the hematopoietic system*, in *Atlas of Tumor Pathology*, 1966, III, 8, Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology, pp. 97-161.
 Stansfeld A., Diebold J., Kapanci Y. *et al.*, *Lancet*, 1988, **1**, 292-293.
 World Health Organization (WHO), *Am. J. Surg. Pathol.*, 1997, **21**, 114.

1. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B

1.1. LINFOMI DERIVATI DA PRECURSORI CELLULARI B

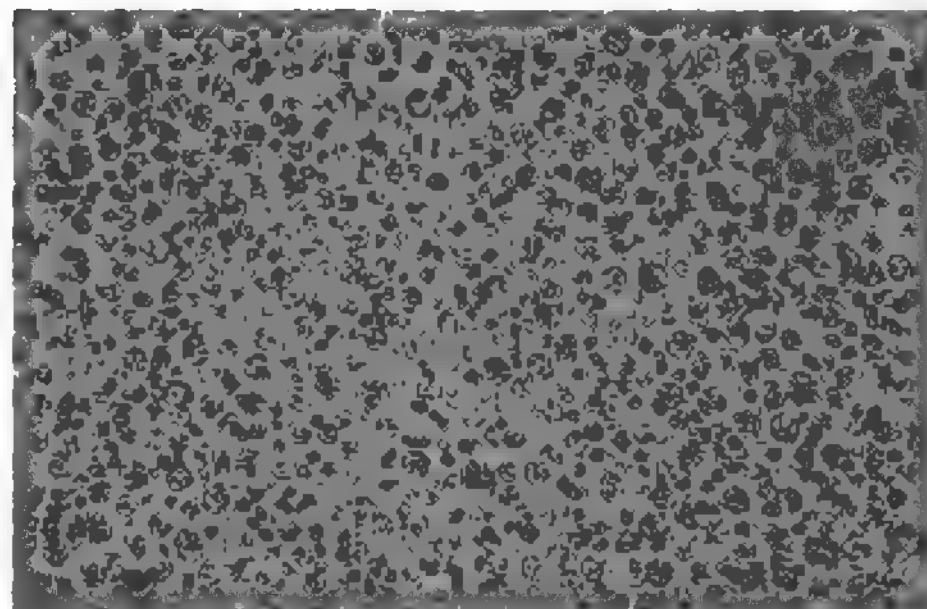


Fig. 7 Linfoma linfoblastico B (B-LbL). Linfonodo, colorazione ematossilina-eosina (E.E.). Diffusa infiltrazione monomorfa di cellule con nucleo rotondo o irregolare, a fine rete cromatinica, pluri-nucleolato.

TAB. VI. PROFILO CITOCHIMICO DEI LINFOCITI IN ALCUNI LINFOMI DI LINEA B E T

Linfoma	ANAE	Fosfatasi acida	β -gluco- ronidasi	β -glucosa- minidasi	ATP asi	5-nucleo- tidasi	DAP IV	PAS	Note
B-LbL	-	-	-	-	+	+	-	+	
B-CLL	-	-	+	-	-	-	-	-	PAS + nei linfociti del s.p. (corona granulare perinucleare)
B-PLL	-	-/+ ^h	-	-	-	-	-	-	
LPL	+	+	+	+	-	-	-	+	Nelle cellule linfoplasmacitoidi e nelle plasmacellule le inclusioni PAS + sono di natura glicoproteica
HCL	++	+++ ^h	-/+	-	+	-	-	+/-	
MCL	-/+	±	±	+	-	-	±	±	Intensa positività di attività fosfatasi alcalina di membrana
MZBL/MBCL	±	-	-	-	-	-	-	+/-	
DLCL-B	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
BL	++	++	-/+	++	-	-	-	-	Positività di membrana per la fosfatasi alcalina. Vacuoli Sudan rosso +
T-LbL	++	++	+	+	-	-	++	+/-	Le idrolasi acide danno solitamente reazione + focale in tutti i linfomi T DAP negativa in casi CD8+
T-LGCL	-/+	++	++	++	-	-	-/+	-/+	
T-PLL	++	++	++	++	-	-	++	-	
ATLI	+	+	++	++	-	-	-	-	Reazione per le idrolasi acide di tipo finemente granulare Le «flower cells» leucemiche sono PAS +
CTCL	-	-	++	++	-	-	-/+	+	
T-ALCL	-	++	-	-	-	-	-	-/+	
T-zone	+	++	++	-	-	-	-	+/-	

a: fluoro resistente; b: tartrato resistente; +: 90% + ve, ++: 50% + ve, +++: 50% + ve, -/+ : < 10% + ve; ±: debole

B-LbL: l. linfoblastico; B-CLL: l. linfatica cronica B; B-PLL: l. plasmocitoma B; LPL: l. linfoplasmacitoidi; HCL: tricoleucemia; MCL: l. a cellule del mantello; MZBL: l. a cellule B della zona marginale; MBCL: l. a cellule B linfocentriche; DLCL-B: l. a grandi cellule B. diffusi; BL: l. di Burkitt; T-LbL: l. linfoblastico T; T-LGCL: l. a grandi linfociti granulati; T-PLL: l. plasmocitoma T; ATLI: leucemia linfona dell'adulto a cellule T; CTCL: l. cutaneo a cellule T; T-ALCL: l. a grandi cellule anaplastiche; T-zone: l. a cellule T della zona.

1.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA B-LINFOBLASTICO

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Lymphoblastic lymphoma* (precedentemente: *Diffuse poor differentiated lymphocytic*). Lukes-Collins: *Undefined cells*. UKC: *Lymphoblastic, B-cell type*. WF: *Lymphoblastic (classe I)*. REALC: *Precursor B-Lymphoblastic leukemia/lymphoma (I bL)*.

Reperti istocitologici

Nel raro l. linfoblastico B (B-LbL) i linfoblasti hanno grandezza media, sottile orletto citoplasmatico debolmente basofilo, nucleo rotondo oppure convoluto, a rete cromatinica fine e con distinta membrana; i nucleoli sono piccoli e poco appariscenti. I fini caratteri morfologici sono meglio apprezzabili sulle apposizioni che sulle sezioni. Numerose sono le figure cariocinetiche. Nel 10% dei casi i linfoblasti presentano nuclei più grandi, spesso convoluti, nucleoli prominenti, simili a quelli delle ALL di tipo L2: la presenza di una struttura cromatinica finemente dispersa è l'unico reperto morfologico che consenta di distinguere i linfoblasti di LbL dalle

cellule dei linfomi indifferenziati non-Burkitt e da alcuni linfomi a grandi cellule. La subclassificazione morfologica dei l. linfoblastici in sottotipi a nucleo convoluto, non convoluto, pleomorfo, non ha valore clinico (Knowles, 1992).

Negli organi infiltrati i linfoblasti appaiono uniformemente stipati. La *struttura linfonodale* è del tutto cancellata (fig. 7). Capsula e tessuti perilinfonodali sono infiltrati. La presenza di macrofagi può talora dar luogo ad immagini «a cielo stellato».

Nei linfoblasti si osserva intensa positività citoplasmatica granulare alle *reazioni citochimiche* per il PAS (diastasi sensibile), l'ATPasi e la 5-nucleotidasi. Le reazioni per la fosfatasi acida e per le esterasi non specifiche sono quasi sempre negative, mai di tipo focale (tab. VI).

Immunofenotipo e genetica molecolare

È affine a quello proprio delle leucemie linfoblastiche acute pre-B («null») o pre-B (tab. VII).

Le indagini dimostrano abitualmente riarrangiamento di un locus IgH, talora di IgL.

TAB. VII. IMMUNOFENOTIPO DEI LINFOMI DI LINEA CELLULARE B

Linfoma	slg	clg	HLA-DR	CD 2	CD 3	CD 5	CD 10	CD 11c	CD 19	CD 20	DC 21	CD 22	CD 23	CD 24	CD 25	Altri
Linfoblastico B (B-LbL)		+ (10)	+				+/-		+	++		+	-			TdT+; CD34+; CD30a+
L. linfatica cronica B (B-CLL)	++				+											TdT-; CD79a+; CD103-; EMC7-; PCA-1-; HC2-; CD43+
L. protinfoblastico B (B-PLL)						+/-										CD43-; CD103-; CD79a+; PCA-1-; HC2-; EMC7+
L. linfocitico a piccole cellule (SLL)	+	++						++ (11a)				+				CD79a-; PCA-1-; HC2-; CD18+; CD1-; EMC7-; CD38-
L. plasmacitoides immunocitoma (LPL)		+						++		+					+	CD79a-; CD103-; EMC7+/-; PCA-1+/-; HC2-; CD43-
L. centrolinfocolare (FCL)			+++							+	+++					CD45R+; CD103-; EMC7+/-; HC2-; CD43-; CDw32-; CDw38-; KiB3+
L. mantellare (MCL)												+				CD43+; CD103-; EMC7+; PCA-1-; CD35+; CDw32+; KiB3-
L. zona marginale B-cellule monocitoidi (MZBL; MBCL)	+	-/+ (+40%)	++					++	+/-		+		-/+	+		CD35-/+; CD43-/+; CDw38-; PCA-1-; KiB3-; CD103-; Ki-M1p-; CD32-; CDw32-
MAI-Linfoma	+	+	++							+						CD35-/+; CD43-; PCA-1-; KiB3-; CDw32-
Tricoleucemia (TCL)			+							+				+/-		CD43+; CD45+; CD32-; CD103-; EMC7-; PCA-1-
L. grandi cellule B, diffuso (DLBCL)	++			-						+	++			++		CD30-; CD45RO-; PCA-1-; CD30a+
L. Burkitt (BL)	+						+/-					+				TdT-

+: 90% positive; +/-: > 50% pos.; -/+ : < 50% pos.; -: < 10% pos.; ±: dubbio

LINFOMI

Anormalità cariotipiche

Sono variabili da caso a caso: t(1;19), t(9;22), t(4;11); frequente è l'iperploidia.

Bibliografia

Knowles D. M., *Lymphoblastic lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, 715-747.

1.2. LINFOMI DERIVATI DA CELLULE B PERIFERICHE

1.2.1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE B. LEUCEMIA PROLINFOCITICA B. LINFOMA LINFOCITICO A PICCOLE CELLULE

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Well-differentiated lymphocytic, diffuse*, Lukes-Collins: *Small lymphocyte B, B-chronic lymphocytic leukemia*. UKC: *B-chronic lymphocytic leukemia, B-prolymphocytic leukemia; Immunocytoma, lymphoblastoid type*. WF: *Small lymphocytic, consistent with CLL (classe A)*. REALC: *B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), B-prolymphocytic leukemia (B-PLL), Small lymphocytic lymphoma (SLL)*.

Introduzione

Tre forme di l. a cellule B periferiche (B-CLL, B-PLL, SLL), che nella UKC figurano quali distinte entità anatomo-cliniche, sono state comprese dalla REALC in un unico gruppo di l. linfocitici ben differenziati, per sottolinearne le notevoli affinità citomorfologiche, fenotipiche, ontogenetiche, i frequenti casi *borderline* e il non raro trapasso dall'una all'altra forma.

Tra le forme tipiche dei linfomi/leucemie qui trattati, sono evidenti tuttavia alcune diversità del quadro istologico e in parte (B-PLL) del citologico.

Reperti istocitologici

Leucemia linfatica cronica (B-CLL)

È un processo di espansione clonale di B-linfociti a bassa attività proliferativa ma con prolungata sopravvivenza cellulare. La cellula caratterizzante è un piccolo linfocito (diametro 6-12 µm) di aspetto maturo, con scarso citoplasma basofilo agranulato, nucleo unico con cromatina addensata in zolle, occasionalmente fornito di un piccolo nucleolo (fig. 8, A). Nelle apposizioni di midollo osseo e di linfonodi e negli strisci di sangue periferico la *reazione PAS*

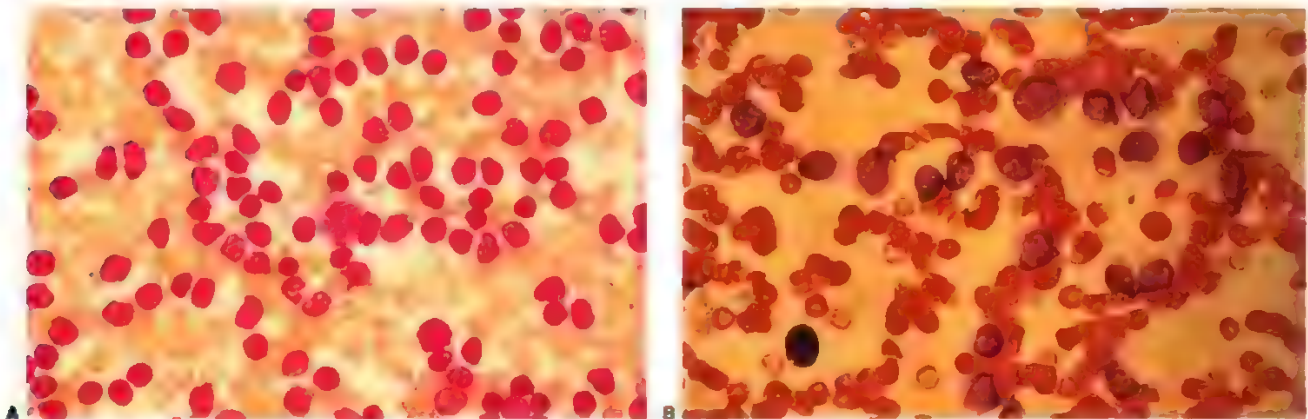


Fig. 8. Leucemia cronica linfocitica B (B-CLL). Sangue periferico, colorazione MGG. A) Spiccata linfocitosi, prevalentemente a piccole cellule mature con singoli elementi più grandi (=trasformati). B) Reperti morfologici in corso di trasformazione prolinfocitoide della B-CLL.

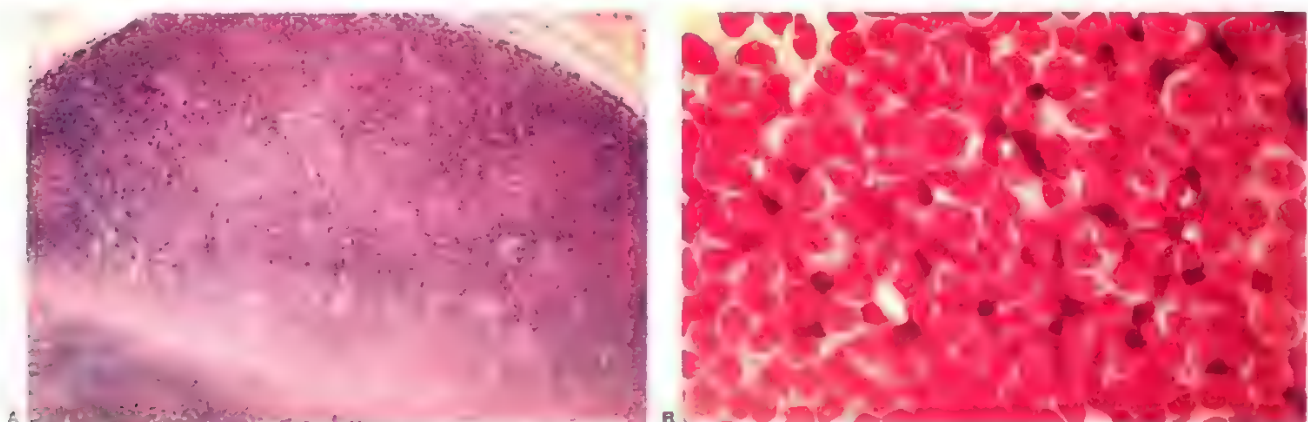


Fig. 9. B-CLL. Linfonodo, colorazione E-H. A) Diffusa proliferazione di piccoli linfociti e presenza di zone più chiare di linfociti «trasformati» (centri più grandi). B) Reperti morfologici delle cellule linfoidi è meglio apprezzabile su apposizioni (colorazione MGG).

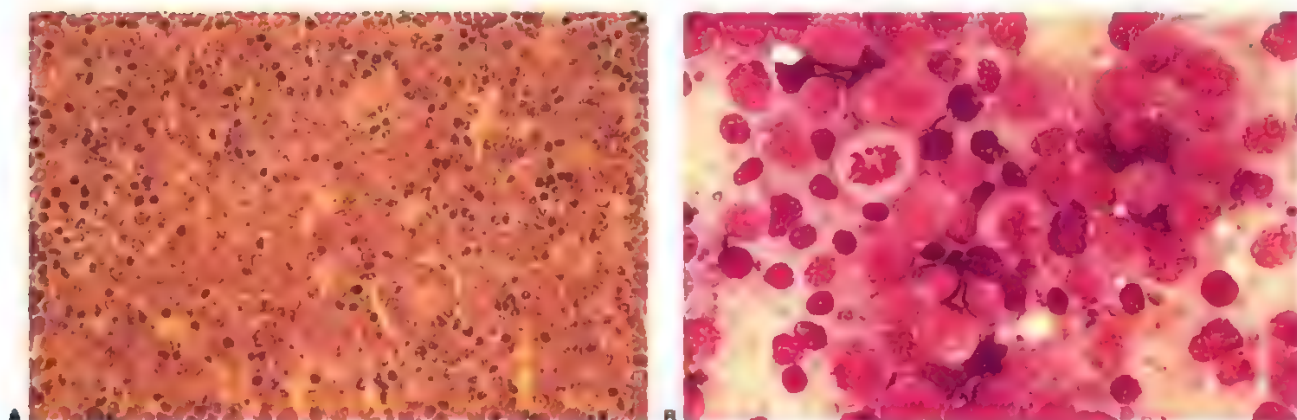


Fig. 10. B-CLL in trasformazione immunoblastica (sindrome di Richter). Linfonodo. A) Sezione istologica, colorazione Giemsa. Iperplasia di grandi cellule basofile di tipo para-immunoblastico e immunoblastico. B) Le caratteristiche morfologiche delle cellule sono meglio apprezzabili nelle apposizioni (colorazione MGG).

mostra nei linfociti numerosi e grossolani granuli PAS-positivi disposti nel citoplasma a corona perinucleare (v. LEUCEMIE, VIII, 1602, fig. 50, a sinistra).

All'esame istologico i linfonodi (fig. 9) appaiono diffusamente e fittamente infiltrati da elementi linfoidi. Le cellule proliferanti Ki-67 positive sono rare tra i piccoli linfociti, più numerose in elementi ad abito prolinfocitico o para-immunoblastico, che in parte sono disseminati in tutto il parenchima linfonodale e in parte si addensano in aree pseudofollicolari (*centri di proliferazione*) (Dick e Maca,

1978) (fig. 9, A). Analoghi sono i reperti osservabili nella milza, dove le cellule neoplastiche infiltrano diffusamente la polpa rossa e bianca con formazione di centri di proliferazione, che si ingrandiscono e tendono a confluire in corso di *trasformazione prolinfocitoide* (fig. 8, B), un evento che è ben apprezzabile nel sangue periferico oltre che nei vari organi. Nel fegato l'infiltrato linfoide interessa gli spazi di Kiernan. Il midollo osseo mostra ipercellularità, con linfocitosi superiore al 30%; si notano spesso, oltre ai piccoli linfociti, linfociti plasmacitoidi, plasmacellule e mastcel-

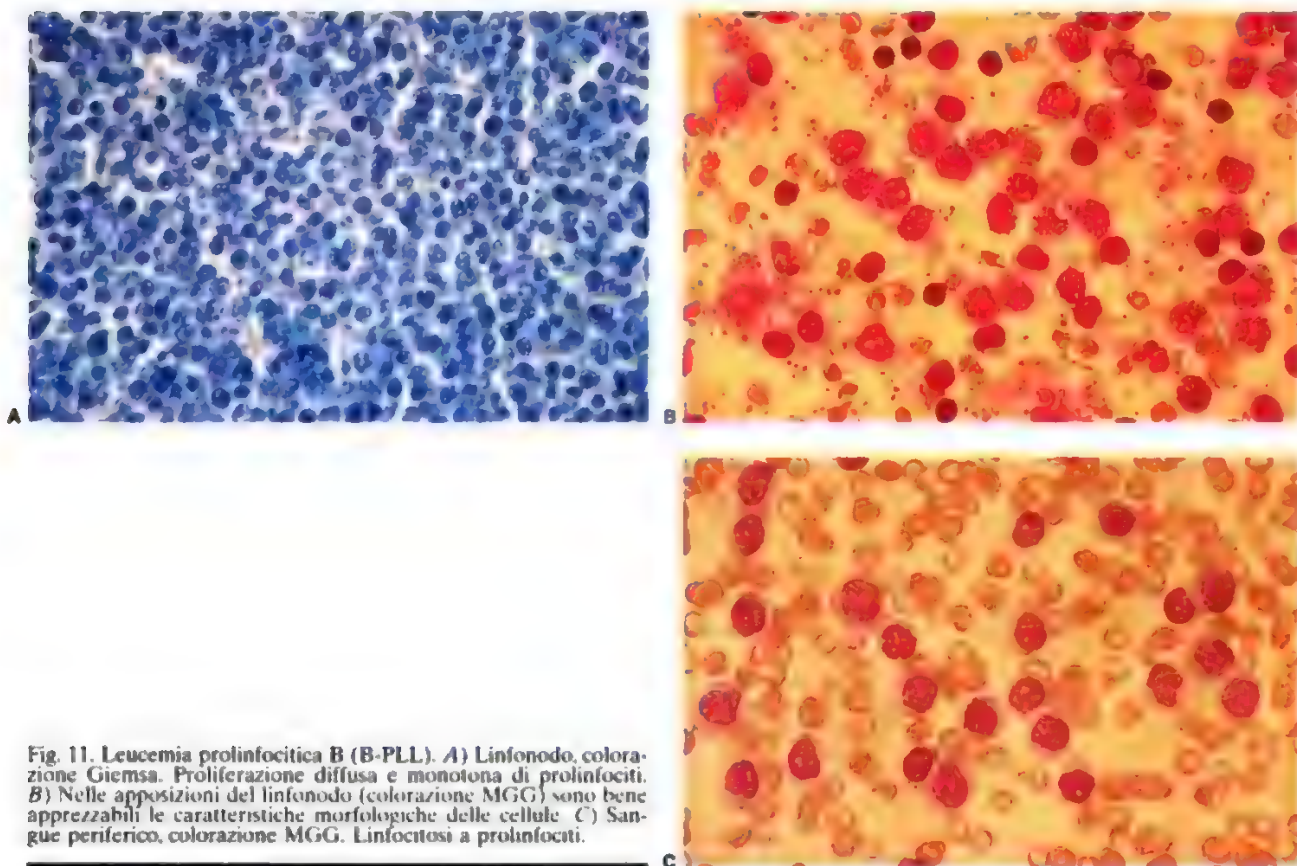


Fig. 11. Leucemia prolinfocitica B (B-PLL). A) Linfonodo, colorazione Giemsa. Proliferazione diffusa e monotona di prolinfociti. B) Nelle apposizioni del linfonodo (colorazione MGG) sono bene apprezzabili le caratteristiche morfologiche delle cellule. C) Sangue periferico, colorazione MGG. Linfocitosi a prolinfociti.

lule. In base alla topografia ed al grado di infiltrazione linfoide, si distinguono 5 classi di reperti midollari: 1) infiltrazione linfoide interstiziale tra le cellule mielopoietiche e gli adipociti; 2) infiltrati linfoidi nodulari; 3) infiltrazione diffusa con riduzione cospicua della componente cellulare mieloide e scomparsa delle areole adipose; 4) quadri misti interstiziali e nodulari; 5) quadri misti nodulari e diffusi. Per i reperti citologici del sangue periferico, v. sotto *Quadri clinici* (col. **3365).

La morfologia istocitologica della CLL-B si modifica radicalmente nel corso della sua trasformazione in l. a grandi cellule di tipo immunoblastico, realizzando la cosiddetta *sindrome di Richter*. I reperti sono illustrati nella fig. 10.

Leucemia prolinfocitica B (B-PLL)

È caratterizzata dalla cospicua presenza di linfociti di media grandezza, a cromatina addensata, con singolo prominente nucleolo e citoplasma più abbondante, debolmente basofilo, in genere privo di granuli PAS-positivi (Galton *et al.*, 1974). Nei linfonodi e nella milza l'infiltrato prolinfocitico è diffuso e monotono, privo di centri di proliferazione (fig. 11).

Linfoma a piccoli linfociti (SLL)

Quadri istologici e citologici analoghi a quelli descritti per la CLL classica sono sostanzialmente presenti anche nello SLL, salvo una maggiore eterogeneità delle dimensioni cellulari e la più frequente presenza di cellule nucleolate. Lo SLL ha esordio aleucemico (e per tale si è convenzionalmente fissata la concentrazione di linfociti neoplastici nel sangue periferico a valori inferiori a $5 \times 10^9/L$). Il carattere aleucemico in non pochi casi permane tale fino al decesso, ma si può anche osservare leucemizzazione più o meno precoce. Si è proposto (Tosi *et al.*, 1990) di distinguere nello SLL un *gruppo 1* a cellule con citoplasma scarso, e un *gruppo 2* a cellule più grandi e citoplasma pallido, talora commiste a «paraimmunoblasti» (*variante paraimmunoblastica dello SLL*). Non raramente si osserva una differenziazione più o meno cospicua di linfociti in elementi simil-linfoplasmacitoidi (*variante plasmacitica dello SLL*). Una rilevante differenza rispetto alla CLL è l'assenza o la scarsità dell'*infiltrazione midollare*, che nello SLL è di tipo nodulare a sede non paratrabecolare. La milza è spesso molto ingrandita nello SLL: è predominante il coinvolgimento della polpa bianca in forma di noduli che tendono a fondersi. La proliferazione linfomatosa può interessare anche altri organi (orbita, polmoni, cute, stomaco in primo luogo).

Immunofenotipo

L'immunofenotipo delle cellule linfoidi di questa classe di l. è simile ma non identico nelle sue tre componenti (tab. VII).

Nella B-CLL è tipica la positività degli antigeni T-correlati CD5 e CD43 e assai spesso si rinviene positività di CD25, HLA-DR, CD11c, antigeni tutti non specifici della linea B. La positività di CD23 in CLL può essere valorizzata nella DD rispetto al l. a cellule mantellari.

Una minoranza di casi di CLL (probabilmente circa il 10-20%), citologicamente identici alla forma classica ma con più massiccia infiltrazione midollare, presentazione in stadio più avanzato e decorso clinico più aggressivo, mostrano *fenotipo CD5 negativo* (Kurec *et al.*, 1992) e/o positività di uno o più marcatori mielomonocitici (CD13, CD33, CD14, CD15) ed anche di CD11c (Ikematsu *et al.*, 1994).

Alcuni casi di CLL sono caratterizzati a produzione di IL-1, IL-8, GM-CSF e ad espressione di recettori per IL-3, G-CSF e GM-CSF (Trentin *et al.*, 1994). I linfociti della *subclasse CLL My+* sembrano configurare una *variante biologico-fenotipica e clinica della CLL*.

L'immunofenotipo della B-PLL comporta maggiore espressione di sIgM rispetto alla CLL, variabile positività di CD5 e perdita di

CD23. Inoltre FMC7 e RFA4, negativi in CLL, sono positivi in B-PLL in più del 40% dei casi.

Gli immunofenotipi di CLL e di SLL si differenziano solo per la presenza nel secondo delle catene alfa (CD11a) e beta (CD18) della molecola di adesione LFA-1 (Inghirami *et al.*, 1988). Nello SLL con elementi plasmacitoidi possono essere espressi CD25, CD71, FMC7 e CD38 (Martinsson *et al.*, 1989).

Citogenetica

I linfociti neoplastici sono diploidi nel 90% dei casi e solo il 5% è in fase S. Il cariotipo è alterato in circa il 60% dei casi (Juliusson *et al.*, 1990): la trisomia del cromosoma 12 è presente nel 30% dei casi di B-CLL e di SLL; spesso si osservano anomalie dei cromosomi 11 e 14, del (14)(q22), delezioni e traslocazioni della regione 13q14 (locus dell'oncogene del retinoblastoma), riarrangiamento della regione 5' del gene *bcl-2* ed elevate espressioni di *bcl-2* mRNA (Mariano *et al.*, 1992). Nella forma francamente prolinfocitica si può notare del (3)(p13). Frequente è il riarrangiamento clonale di loci IgH e IgL. Frequenti (43% dei casi) sono le mutazioni di *p53* nella CLL in trasformazione tipo Richter (Gaidano *et al.*, 1991).

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
 Dick F., Maca R., *Cancer*, 1978, **41**, 283.
 Gaidano G., Ballerini P., Gong J. Z. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 5413.
 Galton D., Goldman J., Wiltshaw E. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1974, **27**, 7.
 Ikematsu W., Ikematsu H., Okamura S. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 2602-2610.
 Inghirami G., Wiczarek R., Zhu B. J. *et al.*, *Blood*, 1988, **72**, 1431.
 Juliusson G., Oscier D. G., Fitchett M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 720.
 Kurec A. S., Threattle G. A., Gottlieb A. J. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1992, **81**, 45-51.
 Mariano M., Moretti L., Donelli A. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 768.
 Martinsson V., Sundström C., Glimelius B., *A.P.M.J.S.*, 1989, **97**, 1025.
 Rozman C. ed., *Chronic lymphocytic leukaemia and related disorders*, in *Baillière's Clinical Haematology*, 1993, **6**, 757-915.
 Tosi P., Leocchini L., Del Vecchio M. T. *et al.*, *Lab. Invest.*, 1990, **62**, 202-212.
 Trentin L., Zambella C., Agostini C. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 4249-4256.

1.2.2. LINFOMA LINFOPLASMACITOIDE (IMMUNOCITOMA)

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Well differentiated lymphocytic, plasmacytoid lymphoma; diffuse mixed lymphocytic and histiocytic lymphoma*. Lukes-Collins: *Plasmacytic-lymphocytic lymphoma*. UKC: *Immunocytoma, lymphoplasmacytic/cytoid type*. WF: *Small lymphocytic, plasmacytoid lymphoma; diffuse mixed small and large cell lymphoma*. REALC: *Lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma*.

Definizione

Il l. linfoplasmacitoide (LPL: *Lympho Plasmacytoid Lymphoma*) è una neoplasia maligna della linea B-linfocitaria, citologicamente caratterizzata da linfociti con modulazione morfologica più o meno avanzata in senso linfoplasmacitoide e plasmacellulare. Morfologicamente può essere considerata una categoria per esclusione tra i LNH a piccole cellule, e comprende le forme che, per definizione, mancano delle caratteristiche proprie del l. a cellule centrofollicolari o dei l. del mantello o della zona marginale (Lennert *et al.*, 1991).

Reperti citologici

Il *quadro citologico* è alquanto polimorfo. Le cellule tumorali sono costituite prevalentemente da *linfociti* di piccole o medie dimensioni, con nucleo rotondo centrale o leggermente eccentrico a cromatina alquanto addensata, citoplasma in genere scarso ma talora più espanso di quello pro-

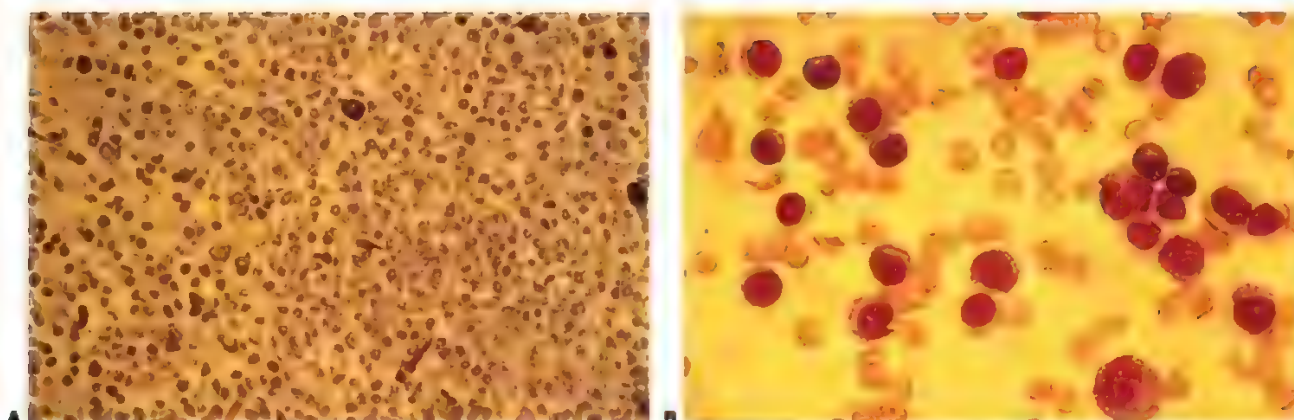


Fig. 12. L. linfoplasmacitoide/immunocitoma (LPL). Linfonodo, colorazione Giemsa. A) Sezione istologica. Diffusa infiltrazione di linfociti maturi, linfoplasmacitoidi e linfoplasmacitici; singole mastcellule. B) Su apposizione (colorazione MGG), dettagli citomorfologici.

prio dei piccoli linfociti della B-CLL, a basofilia di vario grado. Più o meno cospicue sono le componenti cellulari di tipo linfoplasmacitoide e linfoplasmacitico (secondo la nomenclatura di Lennert); presentano nucleo eccentrico e citoplasma espanso intensamente basofilo (fig. 12). Si notano pure plasmacellule e qualche immunoblasto. In genere numerose sono le mastcellule.

Nelle cellule linfoplasmacitoidi e nelle plasmacellule si possono rinvenire inclusioni PAS-positive, intracitoplasmatiche (corpi di Russell) o intranucleari (corpi di Dutcher), costituite da agglomerati glicoproteici di natura immunoglobulinica. Per le reazioni citochimiche v. sopra tab. VI.

Immunofenotipo e genetica molecolare

È notevolmente caratteristico (v. sopra tab. VII) con qualche diversità tra il tipo linfoplasmacitoide ed il linfoplasmacitico. L'80% delle cellule linfoplasmacitoidi esprime CD25 e CD23, quelle linfoplasmacitiche nel 50% dei casi sono CD25 negative e CD23 positive.

Le indagini documentano riarrangiamenti clonali di geni IgH e L, ma non lesioni specifiche.

Reperti istologici

Nei linfonodi la proliferazione linfomatosa ha spesso sviluppo prettamente interfolicolare con risparmio dei seni linfatici, ma talora è di tipo diffuso e può scompaginare più o meno completamente l'architettura linfonodale. La milza è spesso infiltrata da cellule linfoidi pleomorfe, distribuite prevalentemente in manicotti linfoidi peritrabecolari e periarterioli oppure più uniformemente diffuse. Nel fegato l'infiltrazione linfomatosa interessa gli spazi di Kiernan. Il midollo osseo appare sempre più o meno largamente infiltrato dalle cellule linfoidi pleomorfe, in forma nodulare o interstiziale o diffusa; è presente iperplasia fibrillare.

Bibliografia

- Lennert K., Feller A., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, 2 ed., Springer, Berlin.
Lennert K., Tamm I., Wacker K. K., *Leuk Lymphoma*, 1991 (Suppl.), 157-160.
Zuckenberg C., Medeiros L., Ferry J., Harris N., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993, 100, 373.

1.2.3. LINFOMA DELLE CELLULE MANTELLARI

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Intermediate or poor differentiated lymphocytic, diffuse or nodular*. Lukes-Collins: *Small cleaved follicular center cell*.

UKC: *Centrocytic (mantle cell) lymphoma*. WF: *Small cleaved cell, diffuse or nodular; rarely diffuse mixed or large cleaved cell*. Altri: *Mantle zone lymphoma*. REALC: *Mantle cell lymphoma*.

Definizione

Il l. derivato dalle cellule dell'area mantellare (in breve, «l. mantellare», MCL: *Mantle Cell Lymphoma*), corrisponde al l. descritto originariamente come «l. linfocitico intermedio o a differenziazione intermedia» (Berard e Dorfman, 1974) e al «l. centrocitico» di Lennert (1978). La denominazione di «l. mantellare» proposta da Weisenburger *et al.* (1982) è dovuta alla dimostrazione che il «l. centrocitico» non deriva da cellule centrofolicolari come si era postulato, bensì da una sottopopolazione linfoide (CD5+, CD23 negativa) situata in quantità solitamente modesta nell'area mantellare interna del follicolo linfonodale e splenico (Inghirami *et al.*, 1991), a sua volta originata da cellule linfoidi B circolanti nel sangue fetale e partecipi della formazione dei follicoli primari nella milza e nei linfonodi (Durandy *et al.*, 1990).

Reperti istologici e citologici

Nei linfonodi (fig. 13) è tipica l'infiltrazione linfomatosa di tipo diffuso, in cui si riconosce talora un vago accenno a strutturazione nodulare (variante «folicolare»). Il sovvertimento dell'architettura linfonodale è completo. In alcuni casi (specie in stadi iniziali di malattia) la proliferazione neoplastica forma ampi mantelli linfomatosi attorno a follicoli di tipo reattivo, oppure interessa la sola area mantellare, in assenza o con scarsa evidenza di residui atrofici di centri folicolari. La presenza di macrofagi può conferire all'infiltrato linfomatoso aspetto «a cielo stellato». Talora è presente modesta fibrosi, a sviluppo diffuso o a bande ialine. Cellule dendritiche sono commiste alle cellule linfoidi, in una rete disorganizzata. La milza, sempre ingrandita e talora in grado cospicuo, presenta vistosa espansione della polpa bianca. Il midollo osseo mostra nel 70% dei casi infiltrazione di cellule linfoidi mantellari, di tipo nodulare (paratrabecolare) o diffuso. Nel fegato si riscontrano spesso infiltrati linfomatosi negli spazi portali e talora nei sinusoidi. Frequente è il coinvolgimento dell'anello di Waldeyer, del tratto gastro-intestinale (in forma di poliposi linfomatosa multipla, O'Brian *et al.*, 1989), mentre più raro è quello della cute (Bertero *et al.*, 1994).

Le cellule neoplastiche presentano nella maggior parte dei casi morfologia alquanto uniforme: dimensioni piccole

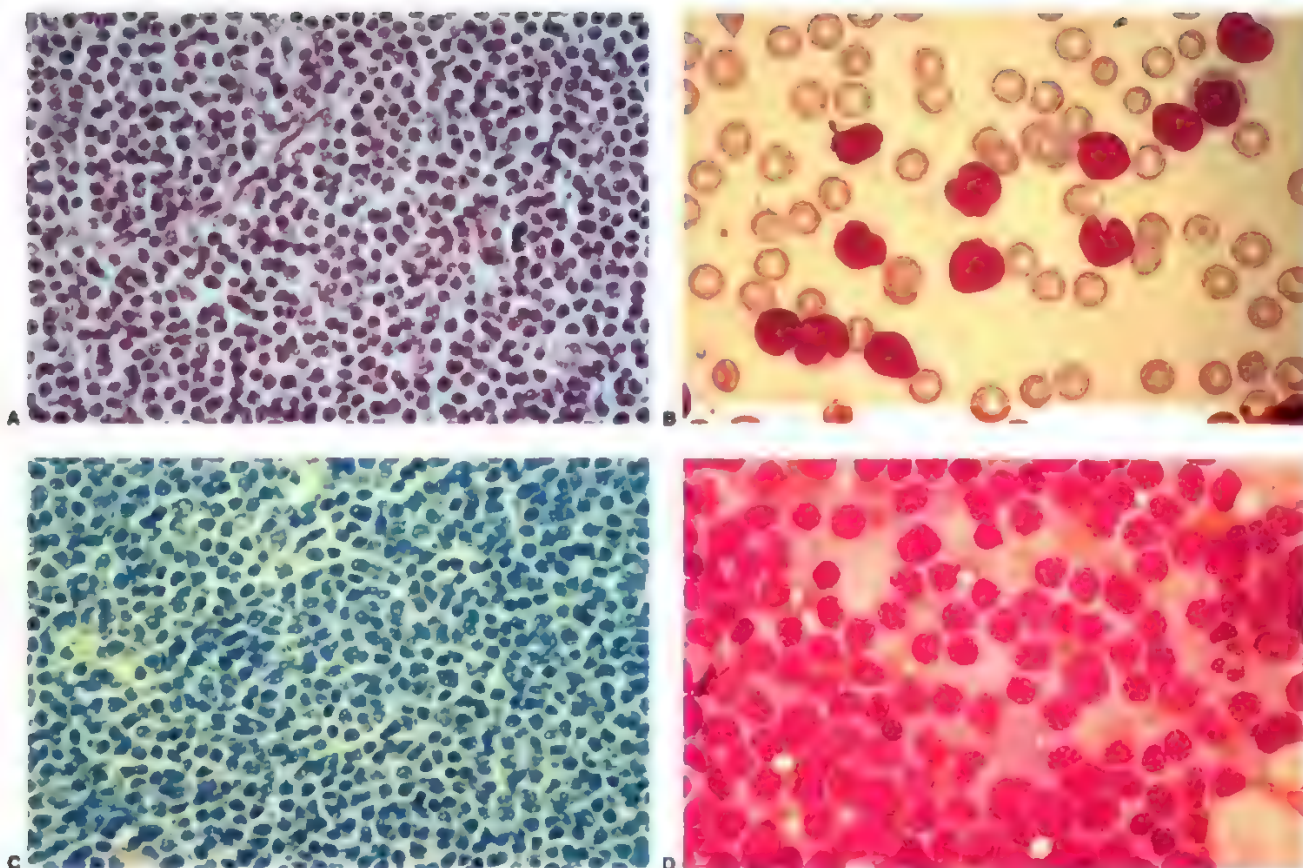


Fig. 13. L. a cellule mantellari (MCL). A) Linfonodo, colorazione Giemsa. Diffusa proliferazione di elementi linfoidi di tipo centrocitico (variante a piccoli centrocitici). B) Sangue periferico, colorazione MGG. In fase leucemica, presenza di numerosi linfociti a nucleo inciso («centrocitici»). C) Linfonodo, colorazione Giemsa. MCL, variante linfoblastoide. D) Linfonodo, apposizione, colorazione MGG. Caratteristiche citomorfologiche della variante linfoblastoide («l. centrocitico a grandi cellule»).

o medie, nucleo unico con cromatina dispersa, piccoli nucleoli. Il nucleo ha spesso contorni irregolari per la presenza di sottili fissurazioni (cellule a nucleo «inciso», «clivato», «indentato»). Il citoplasma è scarso, debolmente basofilo. Spesso tuttavia, frammisti ai piccoli linfociti a nucleo inciso, si osservano elementi linfoidi con nucleo rotondeggiante a contorni regolari oppure linfociti assai piccoli con nucleo a cromatina addensata come nello SLL: da ciò il termine di «l. intermedio». Altre volte ancora, una popolazione cellulare a morfologia simil-linfoblastica, in attiva proliferazione, può assumere discreto rilievo quantitativo: si parla allora di «variante linfoblastoide o blastoide del linfoma mantellare», probabilmente analoga alla «variante anaplastica del l. centrocitico» di Ott *et al.* (1994) e al «l. centrocitico a grandi cellule» (Lennert, 1978) nonché al «l. centroblastico centrociticoide» della UKC (1988). Presenta elevato *indice mitotico*, contrariamente alle altre varianti del l. mantellare. Si può reperire una *progressione istologica* che passa da una forma a piccole cellule con nucleo inciso a quella linfoblastoide, non verso forme ad alto grado di malignità.

La *diagnosi differenziale istologica* va posta soprattutto nei confronti dei processi di tipo reattivo, della m. di Castleman (varietà sclerosante), dei l. linfocitici a piccole cellule (CLL/SLL var. interfollicolare), del l. della zona marginale, dei MALT-linfomi, più raramente dei l. centrofollicolare cb/cc. La negatività di CD23 orienta la diagnosi verso il l. mantellare contro lo SLL; la positività di CD5

esclude la diagnosi di l. centrofollicolare e di l. della zona marginale (sopra tab. VII).

Reperti citochimici

Intensa attività fosfatase alcalina di membrana, reazioni negative o deboli per le idrolasi ed il PAS (v. sopra tab. VI).

Immunofenotipo

Ha tipicamente carattere B immaturo, CD5+, CD23- (v. sopra tab. VII).

Anomalie citogenetiche e genetica molecolare

Nel 70% dei casi si riscontra t(11;14)(q13;q32), che comporta riarrangiamento del gene *bcl-1* (v. sotto *Patogenesi*). Non sono rare anche la t(11;22)(q13;q11) e la trisomia 12.

È usuale reperire nelle cellule linfomatose riarrangiamento di geni IgH , mentre TCR β è in configurazione germinale. Non si reperiscono traslocazioni di *bcl-2*; il gene *bcl-1* appare spesso clonalmente riarrangiato (Moynihan *et al.*, 1996).

Bibliografia

- Berard C. W., Dorfman R. F., *Clin. Hematol.*, 1974, **3**, 39-76.
- Bertoni M., Novelli M., Fierro M. T. *et al.*, *J. Amer. Acad. Dermatol.*, 1994, **30**, 23-30.
- Durandy A., Thimiller L., Forveille B. *et al.*, *J. Immunol.*, 1990, **144**, 1000-1004.
- Inehmani G., Foti D., Sabichi A. *et al.*, *Blood*, 1991, **78**, 1503.
- Lehmann K., *Mantle cell lymphoma other than Hodgkin's disease*, 1995, Springer, 1-100.

- Lennert K., Feller A., *Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
- Moynihan M. J., Bast M. A., Chan W. C. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, 20, 442-452.
- O'Brien D. S., Kennedy M. J., Deley P. A. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1989, 13, 691-699.
- Ott M. M., Ott H., Kuse R. et al., *Histopathology*, 1994, 24, 329-334.
- Weisenburger D. D., Kim H., Rappaport H., *Cancer*, 1982, 49, 1429-1438.

1.2.4. LINFOMI DEL CENTRO FOLLICOLARE

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Nodular poor differentiated lymphocytic lymphoma; Mixed lymphocytic-histiocytic, or histiocytic lymphoma*. Lukes-Collins: *Small cleaved or large noncleaved FCL, follicular*. UKC: *Centroblastic/centrocytic follicular lymphoma; Follicular centroblastic lymphoma*. WF: *Follicular, small cleaved, mixed, or large cell lymphoma*. REALC: *Follicle center lymphoma (FCL), follicular*. Provisional subtype: *Follicle center lymphoma, diffuse (predominantly small cell)*.

Definizione

La classificazione REAL include tra i l. centro-follicolari (FCL: *Follicle Center Lymphoma*) tutte le forme nodulari e le nodulari/diffuse (sia a cellule miste cb/cc che a prevalenti centroblasti) contemplate dalla classificazione di Kiel, ed ammette (con riserva) la rara forma di tipo diffuso a cellule miste con prevalenza di centroцити: esclude quindi la forma diffusa prevalentemente centroblastica (assegnata alla classe dei l. a grandi cellule di linea B) nonché la forma diffusa a centroцити, attualmente interpretabile — almeno nella maggior parte dei casi — come l. delle cellule mantellari.

Reperti citologici

Le cellule che compongono il FCL hanno caratteristiche morfologiche ben definite, affini a quelle delle cellule dei normali centri germinativi.

Centroцити (cc): sono linfociti con scarso citoplasma debolmente basofilo, nucleo con una o più sottili introflessioni (nuclei incisi), cromatina finemente dispersa e piccoli nucleoli. Possono avere dimensioni sia molto piccole sia alquanto maggiori di un linfocito maturo normale. Le reazioni citochimiche per le fosfatasi alcaline di membrana danno intensa positività, quelle per le idrolasi acide ed il PAS sono negative o deboli.

Centroblasti (cb): sono cellule piuttosto grandi, con sottile citoplasma basofilo a contorni regolari e ben definiti, nucleo rotondo a cromatina fine, non inciso, con 2-3 nucleoli ben evidenti e adesi alla membrana nucleare. La reazione citochimica per le fosfatasi acide è debole o negativa; talora si osserva discreta PAS-positività citoplasmatica di tipo granulare.

Il rapporto quantitativo tra cb e cc e tra cc piccoli e grandi varia a seconda dei casi. La malignità del processo è maggiore se i cb prevalgono sui cc ed i cc grandi su quelli piccoli. Ciò ha indotto a subclassificare i FCL nodulari in tre gradi, rispettivamente caratterizzati da: (grado I) cb < 25%; (grado II) cb 25-50%; (grado III) cb > 50%. La valutazione del grading è tuttavia altamente soggettiva. Altre modalità di valutazione dell'aggressività del linfoma sono lo score mitotico ed i test per l'attività DNA sintetica, con il Ki-67 o altri anticorpi (Leoncini et al., 1993).

Immunofenotipo e anomalie cromosomiche

Centroцити e centroblasti possiedono immunofenotipo in larga parte identico (v. sopra tab. VII).

Nel 70-95% dei casi si reperisce, quale anomalia cromosomica, la t(14;18), che comporta riarrangiamento dell'oncogene *bcl-2* (v. *Patogenesi*).

Reperti istologici

Il processo proliferativo cb/cc nel 90% dei casi è strutturato in forma nodulare, ma può esserlo anche in forma diffusa o mista nodulare/diffusa (Lennert, 1978) (fig. 14). Nelle aree a proliferazione diffusa tutto il parenchima linfonodale è uniformemente infiltrato dagli elementi cb/cc commisti in varia proporzione. Frequente è l'iperplasia fibrillare a tendenza sclerotizzante. Nella variante cb/cc nodulare l'architettura linfonodale è sovvertita per la presenza sia nella corticale che nella midollare di pseudo-follicoli, costituiti da centroцити ed in minore misura da centroblasti, macrofagi, cellule dendritiche e da piccoli linfociti a morfologia matura (Zuckerberg et al., 1993). Tali pseudo-follicoli possono avere struttura uniforme e compatta oppure sono circondati da una corona di piccoli linfociti e centroцити, avascolare nella parte più interna, ricca di venule postcapillari nelle aree esterne (tessuto linfoide para-follicolare o internodulare). Gli pseudo-follicoli possono assumere grandi dimensioni («linfoma gigantofollicolare», che in parte comprende la casistica un tempo inquadrata come «linfoma di Brill-Symmers»). Le fibre argentofile mancano quasi completamente nelle aree centrali degli pseudo-follicoli, mentre sono fortemente stipate nelle aree internodulari.

La composizione citologica della proliferazione linfomatosa è relativamente uniforme in tutto il parenchima linfonodale invaso: reperire in qualche settore limitato uno spiccato addensarsi di cellule di maggiori dimensioni, anaplastiche o pleomorfe, è sempre indice di una progressione del processo verso un l. più aggressivo o in una ALL di tipo B o pre-B. Meno frequentemente si tratta di coesistenza di due l. di natura diversa («composite lymphoma»). In rari casi di FCL cb/cc diffuso si osserva un elevato contenuto in plasmacellule neoplastiche contenenti Ig monotipiche (linfoma cb/cc con differenziazione plasmacitoide). Non è raro rinvenire nei FCL depositi extracellulari di materiale amorfo eosinofilo di natura glicoproteica, PAS-positivo. Esiste inoltre (Kim et al., 1978) una variante di l. cb/cc caratterizzata dalla presenza nel citoplasma dei centroцити (e di plasmacellule) di ampi vacuoli, che mostrano incostante positività al PAS e alle reazioni immunoperossidasiche per le Ig, per lo più IgM o IgG (linfoma cb/cc nodulare con cellule a castone, *Signet-ring Cell Lymphoma*) (fig. 14, D).

Nella milza e negli altri organi l'infiltrazione linfomatosa ha sempre carattere distruttivo. Nel midollo osseo, costantemente coinvolto solo in fasi avanzate di malattia, prevalgono le infiltrazioni nodulari paratrabecolari, costituite quasi esclusivamente da centroцити.

Nella DD istopatologica del FCL cb/cc si deve tenere presente che esistono talora aspetti sfumati nei confronti di alcune varianti della leucemia prolinfocitica e in genere dei l. linfocitici (SLL) ed anche dei LPL/immunocitomi. La discriminazione dai l. a cellule mantellari può avvalersi della mancata espressione di CD5 e CD43 nel FCL; la positività di CD10 lo differenzia dal l. della zona marginale. Talora si impone la DD nei confronti dell'iperplasia follicolare reattiva: in questa tuttavia l'attività proliferativa è più intensa che nella forma neoplastica, vi prevalgono i centroblasti sui centroцити, l'iperplasia macrofagica è molto più cospicua, la demarcazione tra area centro-nodulare e corona linfocitica è sempre molto netta e nella corona non si reperiscono centroцити; nella forma non neoplastica, infine, sono sempre rilevanti i fenomeni reattivi nelle aree paracorticali e intrasinusali, assenti nel FCL cb/cc nodulare. Tranne rare eccezioni, nell'iperplasia follicolare reattiva non si reperisce l'espressione della proteina *bcl-2* (Limpens et al., 1991).

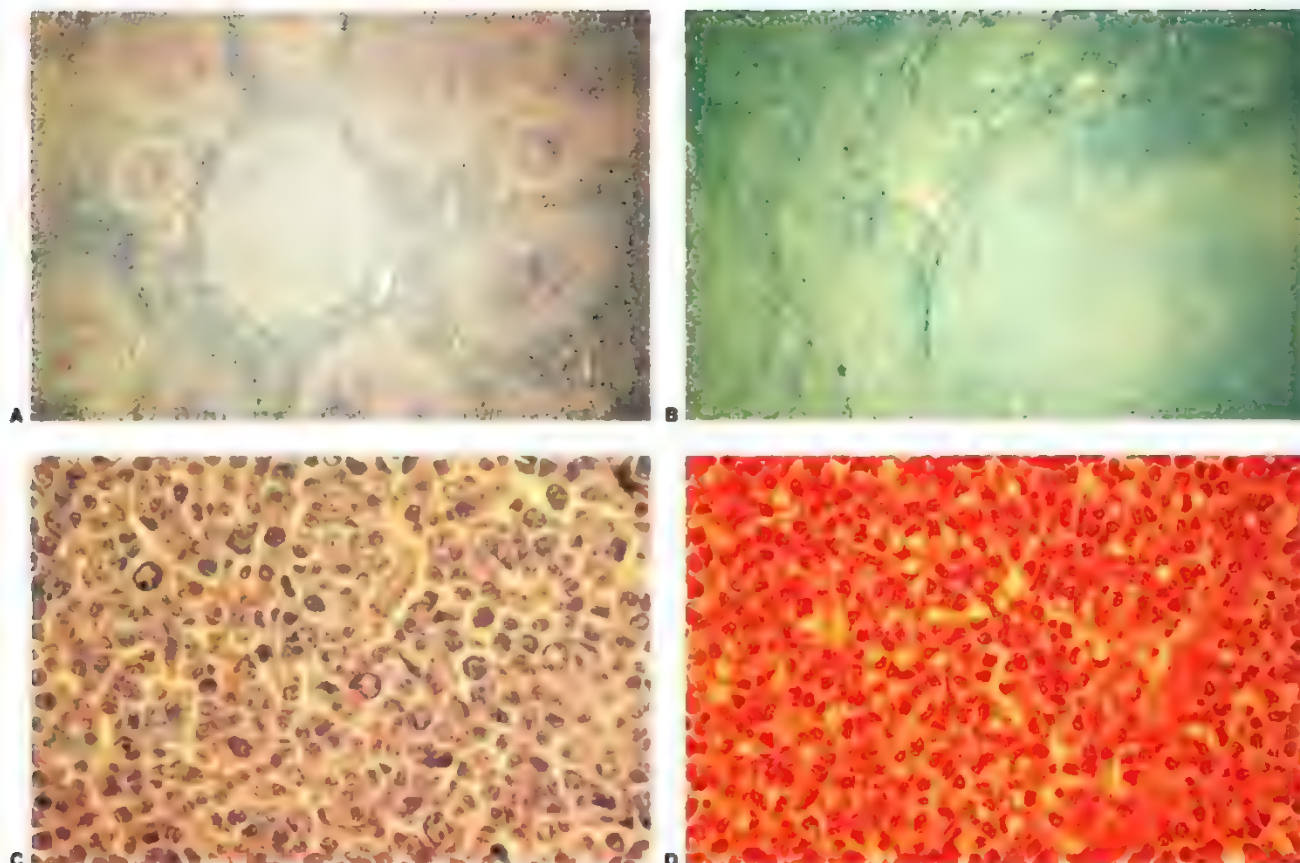


Fig. 14. L. del centro follicolare (FCL). Linfonodo. A) Proliferazione nodulare (colorazione E.E.). B) Aspetti di trasformazione da nodulare a diffusa (colorazione Giemsa). C) Composizione cellulare mista (cb/cc) del FCL (colorazione E.E.). D) Variante a cellule a castone («signet-ring cell lymphoma»).

Bibliografia

- Gerdes J., Sabbatini E., Pileri S. et al., in Crocker J. ed., *Cell proliferation in lymphomas*, 1993, Blackwell, Oxford, pp. 131-144.
 Harris N. L., Ferry J. A., *Follicular lymphoma and related disorders (germinal center lymphomas)*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 645-674.
 Kim H., Dorfman R. F., Rappaport H., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1978, **2**, 119-132.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Leoncini L., Del Vecchio M. T., Megha T. et al., *Am. J. Pathol.*, 1993, **142**, 755-763.
 Limpens J., de Jong D., Kricken J. et al., *Oncogene*, 1991, **6**, 2271.
 Zuckerberg L., Medeiros L., Ferry J., Harris N. L., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993, **100**, 373.

1.2.5. LINFOMA A CELLULE B DELLA ZONA MARGINALE (LINFOMA A CELLULE B MONOCITOIDI, MALT-LINFOMI A BASSA MALIGNITÀ)

Denominazioni equivalenti

Rappaport (non specificamente elencato) *Well differentiated lymphoma (WDL) or WDL-plasmacytoid lymphoma; IDL; ILL; PDL; ...; nodular or diffuse lymphoma; ...; B-cell, plasmacytoid lymphoma; Small lymphocytic B, monocytoid lymphoma (LCL); Monocytoid B-cell lymphoma; ...; Well differentiated lymphoma (WDL) or WDL-plasmacytoid lymphoma (some call CLL, some plasmacytoid); Small cleaved or mixed small and large cell (cleaved or diffuse) lymphoma; REALC; Marginal zone B-cell lymphoma; ...; low-grade B-cell lymphoma of MALT type (+/- monocytoid B*

cells); 2) Nodal: (+/- monocytoid B cells) (provisional); 3) Splenic marginal zone lymphoma, with or without villous lymphocytes (provisional entity).

Premessa

La classificazione REAL raccoglie sotto la comune denominazione di l. a cellule B della zona marginale (MZBL: *Marginal Zone B Lymphoma*) alcuni quadri istopatologici di l. individuati in anni recenti a seguito di importanti acquisizioni: 1) caratterizzazione morfologica e fenotipica di una particolare popolazione linfoide situata nell'area marginale del follicolo linfatico (cellule della zona marginale, MZC: *Marginal Zone Cell*), capace di modulazione in senso monocitoide (cellule B monocitoidi, MBC: *Monocytoid B Cell*) e di maturazione plasmacitica. 2) Precisione della struttura e genesi del tessuto linfoide fisiologicamente presente in alcuni organi o formatosi in seguito a processi infiammatori/immunologici («tessuto linfoide associato alle mucose», MALT [*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*] primitivo e secondario) (v. Agg. I, *3896-3901). Ciò ha consentito di interpretare meglio alcuni quadri di l. citologicamente eterogenei, a bassa malignità, a sede linfonodale ed extralinfonodale: l. della zona marginale, MALT-LNH.

Tessuto linfoide associato alle mucose (MALT)

MALT è un termine che comprende il «*Gut-associated lymphoid tissue*» (GALT), il «*Bronchus associated lymphoid tissue*» (BALT) e il «*Salivary gland associated lymphoid tissue*» (SALT) nella cui mucosa sono fisiologicamente presenti strutture linfoidi. Successivamente si è notato

che nello stomaco (benché dotato di mucosa) ed in alcuni organi privi di mucosa, un tessuto tipo MALT è assente in condizioni normali ma può formarsi a seguito di eventi flogistico-reattivi o autoimmuni. Si è pertanto distinto un *MALT primitivo* e un *MALT acquisito (secondario)*: esempi di quest'ultimo sono la gastrite follicolare cronica da infezione di *H. pylori*, la tiroidite di Hashimoto, la sialoadenite mioepiteliale (MESA) della sindrome di Sjögren.

Il MALT è costituito da un *pool* di linfociti con caratteristiche eterogenee. Il modello meglio noto di MALT è rappresentato dal GALT, in cui Isaacson e Norton (1994) distinguono 4 compartimenti.

a) Le placche del Peyer consistono in aggregati non capsulati di linfociti, in cui si ravvisano strutture diverse: 1) *aree linfocitarie di linea B*, organizzate in follicoli forniti di centro germinativo e di *area mantellare* nonché di una vasta *zona marginale* costituita prevalentemente da centrociti che migrano verso l'*area sottopiteliale della mucosa*; 2) partendo dalla zona marginale, piccoli linfociti B (IgM+, IgD-, IgA1+, IgA2+; CD5 e CD10 negativi), con nucleo a contorni irregolari e citoplasma debolmente basofilo (*centrocyte-like cells*, CCL), si insinuano tra gli epitelii cilindrici di rivestimento della mucosa formando *clusters di linfociti B intraepiteliali*; 3) *aree di linfociti T*, equivalenti alla paracorticale dei linfonodi somatici.

b) La *tonaca propria* della mucosa intestinale, in aree GALT, è diffusamente infiltrata da plasmacellule, macrofagi, linfociti B e T. Le plasmacellule secernono soprattutto IgA dimeriche, ma pure IgM, IgG, IgE. I linfociti T sono in prevalenza CD4+, CD8-; per il 50% esprimono lo «human mucosal lymphocyte antigen» HML-1 (CD103+).

c) In sede *intraepiteliale*, oltre ai *clusters* di linfociti B, si notano anche numerosi *linfociti T* (CD3+, CD4-, CD8+, HML-1+), specie nel digiuno.

d) I *linfonodi mesenterici* hanno fondamentalmente la struttura dei linfonodi periferici, con alcune particolarità: follicoli piccoli, ampia zona marginale, scarsa paracorticale, seni ben sviluppati e dilatati, contenenti blasti linfoidi di linea B, che sintetizzano IgA.

Linfoma della zona marginale (MZBL) (con cellule B monocitoidi, MBC)

Questo l. presenta una popolazione cellulare eterogenea ma caratterizzata dalla costante presenza (anche se quantitativamente variabile) di cellule B di tipo monocitoide.

Reperti citologici

Le *cellule B monocitoidi (MBC) neoplastiche* (fig. 15, C) hanno dimensioni piccole o medie, citoplasma più o meno espanso e debolmente basofilo; in confronto alle MBC non neoplastiche i nuclei (euploidi) sono più irregolari e spesso leggermente incisi, i nucleoli più grandi e prominenti; l'attività mitotica è più elevata.

Il PAS dà *reazione citochimica* diffusa o finemente (talora grossolanamente) granulare. Debole è la reazione per le esterasi non specifiche e per le fosfatasi acide. Il *fenotipo* delle MBC è riportato nella tab. VII. Non sono stati reperiti riarrangiamenti degli oncogeni *bcl-2*, *bcl-1*, *c-myc*, né *t(14;18)* (Schmid *et al.*, 1992).

Nei MZBL linfonodali è stata segnalata una «*variante a piccole cellule monocitoidi*» (Nizze *et al.*, 1991), con citoplasma piuttosto scarso e debolmente basofilo, simili alle «*cellule centrocitoidi*» (*centrocyte-like cells*) di Isaacson.

Reperti istologici

Il MZBL è prevalentemente una neoplasia dei linfonodi (fig. 15), ma si può osservare anche in sedi extralinfonodali e talora — con aspetti istologici particolari — nella milza. Sheibani (1992) distingue 4 diversi quadri istologici.

1) *Varietà linfonodale del linfoma a cellule B monocitoidi (MBCL)*, in cui la proliferazione può assumere quattro

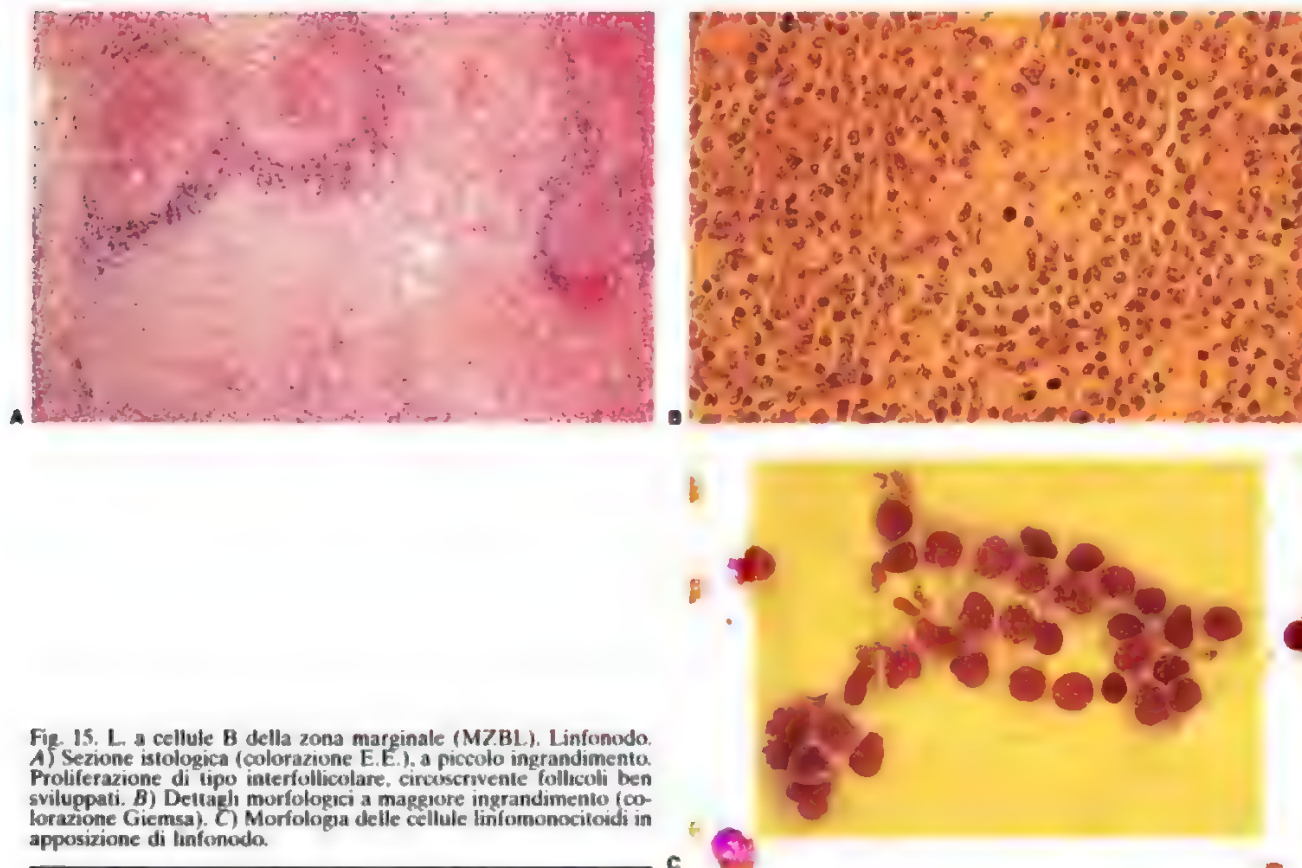


Fig. 15. L. a cellule B della zona marginale (MZBL). Linfonodo. A) Sezione istologica (colorazione E.E.), a piccolo ingrandimento. Proliferazione di tipo interfollicolare, circoscrivente follicoli ben sviluppati. B) Dettagli morfologici a maggiore ingrandimento (colorazione Giemsa). C) Morfologia delle cellule linfomonocitoidi in apposizione di linfonodo.

aspetti distinti: interfollicolare/simil-mantellare, sinusoidale, diffuso, forma *in situ*. Non è insolito rinvenire quadri istologici di tipo misto. Inoltre in singole aree linfonodali si può osservare il fenomeno della «colonizzazione dei centri germinativi» da parte di MBC, il che fa assumere alla proliferazione neoplastica un aspetto pseudofollicolare.

Alla proliferazione di MBC si associa spesso una forte reazione di cellule epitelioidi: se coesistono pure note di evoluzione plasmacitica degli elementi neoplastici, si realizza un quadro simile all'immunocitoma, sottotipo ad elevato contenuto di cellule epitelioidi (Lennert e Feller, 1992).

Infine è da tenere presente che in circa il 10% dei casi l'MBCL può progredire verso forme di linfoma a grandi cellule altamente maligne (Ngan *et al.*, 1991).

2) *Varietà extralinfonodale del linfoma della zona marginale con linfociti monocitoidi.* — In circa il 20% dei casi il MZBL/MCBL interessa primariamente organi extralinfonodali (Sheibani *et al.*, 1992): più frequentemente ghiandole salivari (parotide), stomaco, intestino, polmone, alte vie respiratorie, tiroide; talora milza, midollo osseo, fegato, mammella, cute e tessuto sottocutaneo. Le cellule linfomatose hanno le caratteristiche morfologiche e fenotipiche già descritte per la forma linfonodale. La strutturazione più frequentemente assunta è quella di tipo diffuso.

MALT-linfomi non-Hodgkin

In seno alle aree MALT possono insorgere processi linfomatosi di tipo non-Hodgkin, di linea B, di basso o — insolitamente — di alto grado di malignità (MALT-LNH) (Isaacson e Wright, 1984). È singolare che tali l. non insorgano frequentemente in sedi provviste di MALT primario ed invece più spesso in organi sedi di MALT acquisito (secondario).

La frequenza dell'evoluzione neoplastica del MALT-acquisito non è tuttavia elevata.

Quadro istocitologico

È piuttosto eterogeneo. Nei MALT-LNH a basso grado di malignità (fig. 16, A e B) insorti in aree di MALT acquisito si riscontrano spesso tracce di follicoli reattivi non neoplastici, circondati da un infiltrato neoplastico costituito da linfociti di piccole o medie dimensioni, con citoplasma moderatamente espanso e nuclei a contorni irregolari centrocitosimili, ma con ampio spettro di variabilità morfologica, dal tipo di piccolo linfocita a quello di linfocita monocitoide, cui si associano elementi linfoidi a morfologia più nettamente blastica. Un reperto basilare dei MALT-LNH di basso grado è la presenza di «lesioni linfoepiteliali», ad opera di «centrocyte-like (CCL) cells» che invadono e disgregano le strutture epitelio-ghiandolari dell'organo sede del l. In circa 1/3 dei casi si nota la maturazione degli elementi linfoidi in plasmacellule, che si addensano soprattutto nell'area sottoepiteliale superficiale. Nelle plasmacellule non sono insolite le immagini di tesaurismo di materiale immunoglobulinico, talora a struttura cristallina.

Una spiccata evoluzione degli elementi linfoidi in plasmacito è propria della «immunoproliferative small intestinal disease» (IPSID) (fig. 17), in cui si può osservare (60% dei casi) secrezione di catene pesanti alfa (*malattia delle catene pesanti alfa*) (v. Agg.°, coll. 1357-1358).

Vi sono analogie tra i meccanismi patogenetici implicati nei MALT-LNH dello stomaco (*H. pylori*-correlati) e quelli propri dell'IPSID. Nel primo caso si prospetta che lo sviluppo di un l. di linea B avvenga in via secondaria per stimolazione del compartimento

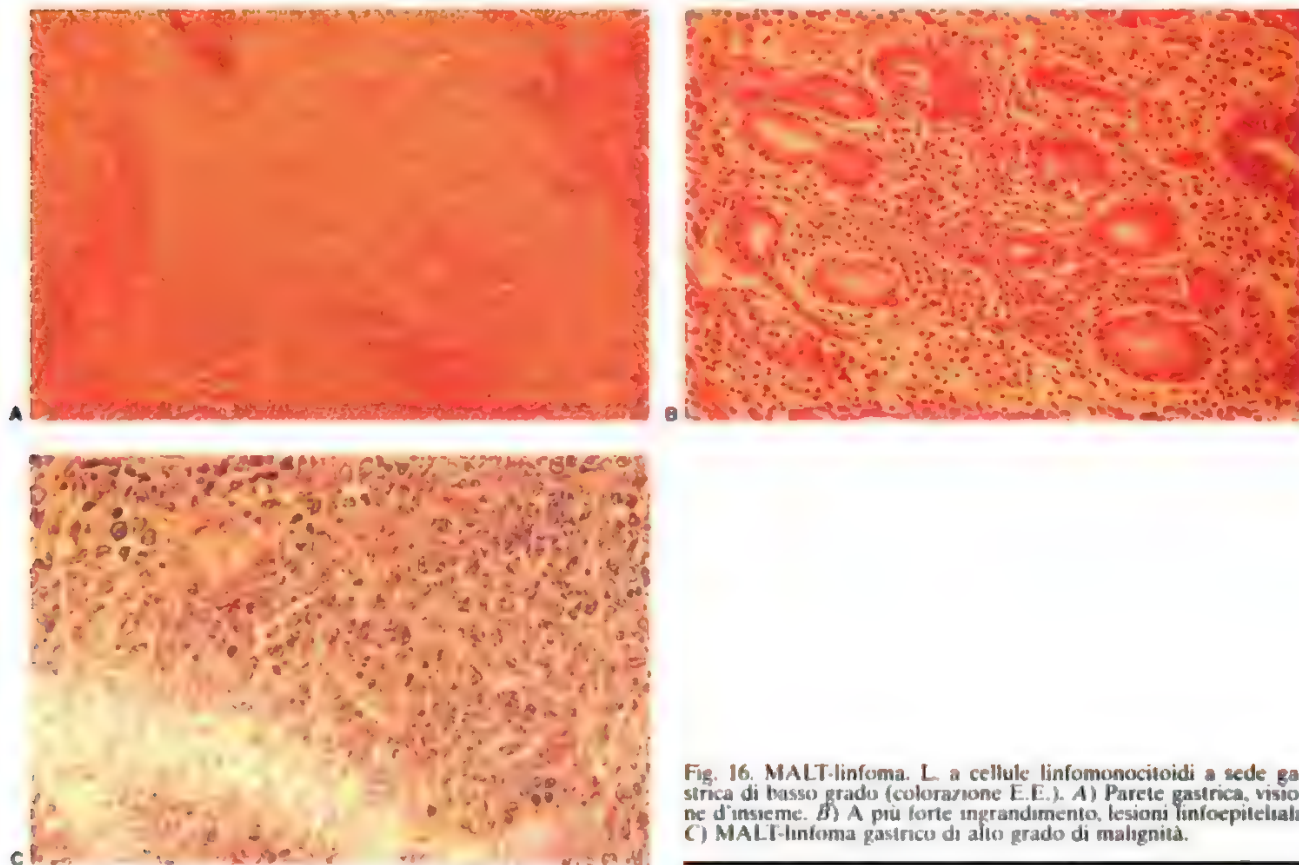


Fig. 16. MALT-linfoma. L. a cellule linfomonocitoidi a sede gastrica di basso grado (colorazione E.E.). A) Parete gastrica, visione d'insieme. B) A più forte ingrandimento, lesioni linfoepiteliali. C) MALT-linfoma gastrico di alto grado di malignità.

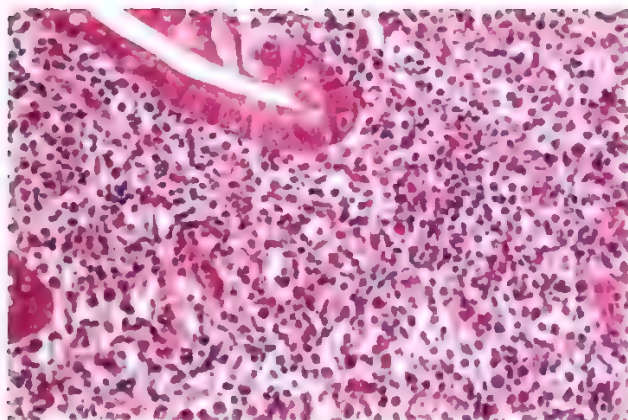


Fig. 17. IPSID, Malattia delle catene pesanti alfa. Tenue, biopsia perorale, colorazione E.E. La mucosa è appiattita (mancanza di villi, ipotrofia dell'apparato ghiandolare), la tonaca propria è largamente infiltrata da elementi linfoidi piccoli e linfoplasmacitoidi, da plasmacellule e da grandi mononucleati basofili.

B-linfocitario da parte di citochine dismesse dai linfociti T primariamente attivati verso antigeni dell'*H. pylori* (Hussell *et al.*, 1993). Nel secondo caso si ritiene che la malattia inizi con una stimolazione immunologica specifica e aspecifica delle cellule immuno-compendenti del tenue IgA secernenti, autolimitante e talora regredibile se l'esposizione antigenica viene rimossa con appropriata terapia antibiotica. Successivamente si assiste ad una progressione irreversibile del processo verso una forma conclamata di l. (Galian *et al.*, 1977).

Il MALT-LNH può avere origine uni- o multicentrica nello stesso viscere. *Linfonodi satelliti* possono presentare un infiltrato interfollicolare di cellule centrocito-simili (CCL), che circondano i follicoli come una zona marginale oppure si assiste ad una colonizzazione selettiva dei follicoli linfonodali, con aspetti simili al l. follicolare: il quadro istologico è sostanzialmente sovrapponibile a quello dei l. linfonodali primitivi a cellule linfomonocitoidi della zona marginale.

Nelle cellule centrocito-simili si osserva riarrangiamento di geni di catene immunoglobuliniche H e L, e assenza di riarrangiamento dell'oncogene *bcl-2*. Le loro *caratteristiche immunofenotipiche* sono riportate nella tab. VII, col. **3233.

I MALT-LNH di basso grado possono *evolvere in forme ad alto grado di malignità*, caratterizzate da cellule a morfologia centroblastica e/o plasmablastica e/o anaplastica. In alcuni casi si osserva commistione tra infiltrati linfoidi a basso e ad alto grado, in altri solo infiltrazione blastica: in tal caso si può sospettare un MALT-LNH altamente maligno *de novo* (fig. 16, C).

Linfoma splenico primario della zona marginale

È un l. dalle caratteristiche non ancora del tutto definite ma che, nel complesso, si distingue per alcuni aspetti istocitologici e clinici dalle varianti del MZBL dinanzi considerate ed è invece vicino alla tricoleucemia (HCL).

L'infiltrazione neoplastica della *milza* può assumere carattere nodulare o diffuso o misto (Sheibani *et al.*, 1992). Raro è l'interessamento di *linfonodi* superficiali, ilo-polmonari, periaortici: mostrano infiltrazione neoplastica diffusa. Il *midollo osseo* presenta aggregati linfomatosi interstiziali o infiltrazione linfomatosa intrasinusoidale più frequentemente che nelle altre varietà del MZL.

Le cellule neoplastiche sono alquanto eterogenee (fig. 18): presentano spesso la morfologia tipica delle MBC, talora in differen-

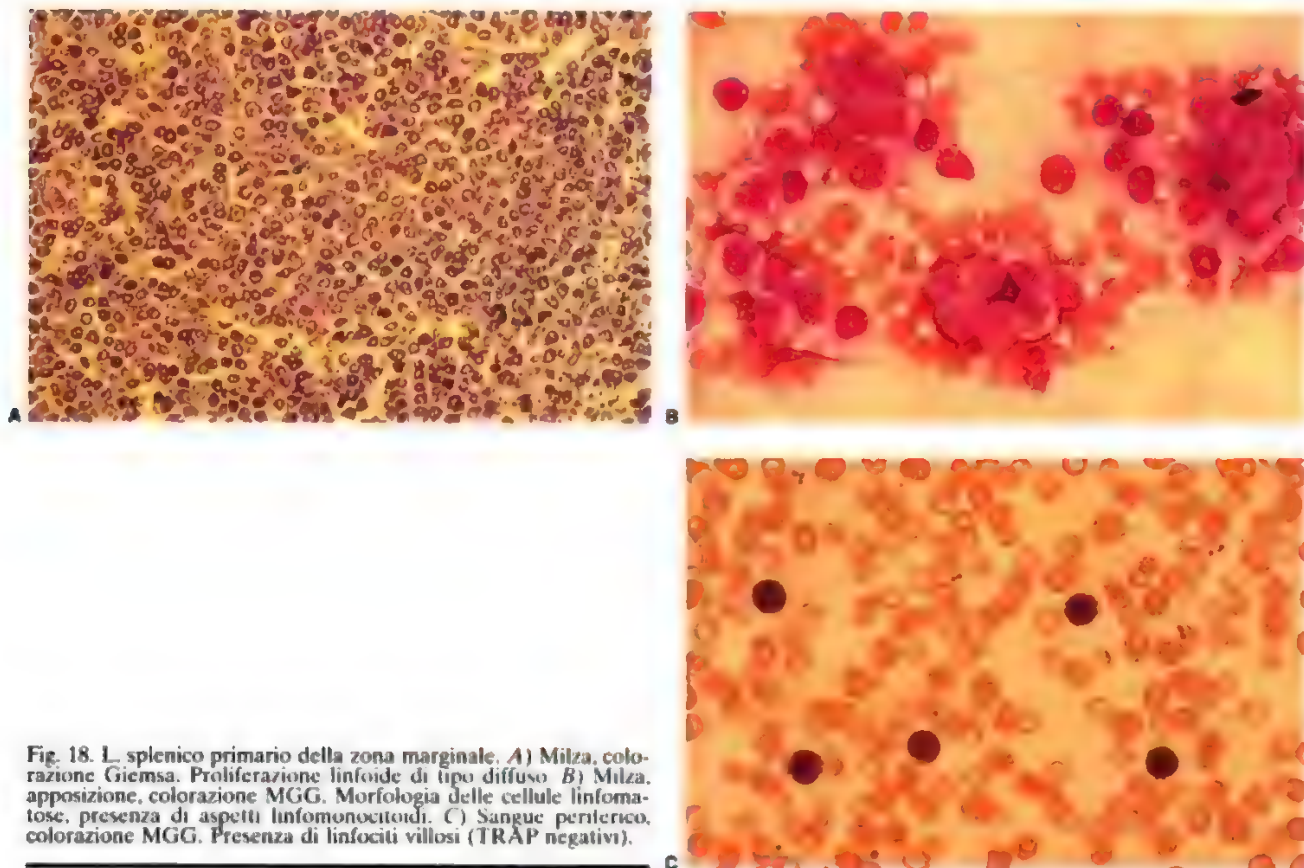


Fig. 18. L. splenico primario della zona marginale. A) Milza, colorazione Giemsa. Proliferazione linfoide di tipo diffuso B) Milza, apposizione, colorazione MGG. Morfologia delle cellule linfomatose, presenza di aspetti linfomonocitoidi. C) Sangue periferico, colorazione MGG. Presenza di linfociti villosi (TRAP negativi).

ziazione plasmacitica, con corpi di Dutcher PAS+. Altre volte — specie nella forma a proliferazione diffusa — assumono l'aspetto di piccoli linfociti ed il solo esame morfologico non ne consente la differenziazione dai tricolinfociti (HCs) della tricoleucemia, fuorché per la negatività della reazione TRAP (v. sotto *Tricoleucemia*), per la frequente negatività di CD25 e per i reperti ultrastrutturali (presenza di lunghi profili di reticolo endoplasmico ruvido).

L'immunofenotipo è quello di cellule di linea B, con negatività di KiB3, LN1, DBA44, a differenza del MBCL e della HCL. Si osserva riarrangiamento dei geni IgH e IgL, con restrizione delle catene leggere. È costante l'elevata espressione della proteina *bcl-2* (Hammer *et al.*, 1996), ma il protooncogene *bcl-2* (come il *bcl-1* e il *c-myc*) sono in configurazione *germline*. Nel 40% dei casi sono presenti mutazioni di *p53*.

Spesso questo l. presenta in circolo, talora in quantità rilevante, linfociti anomali con margini citoplasmatici sfrangiati, assai simili ai tricolinfociti della HCL (fig. 18, C): forme siffatte sono affini a quelle descritte da Melo *et al.* (1987) come «*Splenic B-cell lymphoma with circulating villous lymphocytes*» (SLVL) (v. Agg.*, col. 7257).

Bibliografia

- Galian A., Lecestre M. J., Scotto J. *et al.*, *Cancer*, 1977, **39**, 2081-2101.
 Hammer R. D., Glick A. D., Greer J. P. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 613-626.
 Hussell T., Isaacson P. G., Crabtree J. E., Spencer J., *Lancet*, 1993, **342**, 571-574.
 Isaacson P. G., *Ann. Oncol.*, 1995, **6**, 319-329.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Isaacson P. G., Wright D. H., *Cancer*, 1984, **53**, 2515-2524.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Melo J. V., Robinson D. S. F., Gregory C., Catovsky D., *Leukemia*, 1987, **1**, 294-299.
 Ngan B. Y., Warnke R. A., Wilson M. *et al.*, *Human Pathol.*, 1991, **22**, 409-421.
 Nizze H., Cogliatti S. B., von Schilling C., Lennert K., *Histopathology*, 1991, **18**, 403-411.
 Schmid C., Kirkham N., Diss T., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1992, **16**, 455-466.
 Sheibani K., *Monocytoid B cell lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 629-644.
 Traweck S. T., Sheibani K., Winberg C. D. *et al.*, *Blood*, 1989, **73**, 573-578.

1.2.6. TRICOLEUCEMIA

Denominazioni equivalenti

Rappaport: (non contemplato). Lukes-Collins: *Hairy cell leukemia*. UKC: *Hairy cell leukemia*. WF: (non contemplato). REALC: *Hairy cell leukemia*.

Premessa

La tricoleucemia o leucemia a cellule capellute o *Hairy Cell Leukemia* (HCL) (v. TRICOLEUCEMIA*, Agg. I, coll. *7253-7260) è un raro l. di basso grado di malignità a cellule B (casi con fenotipo T sono una rarità).

Reperti citologici

I linfociti propri della HCL (*Hairy Cells*, HCs) sono cellule un po' più grandi di un normale linfocito (diametro 10-20 µm) con nucleo alquanto eccentrico, rotondo od ovale o reniforme, raramente lobulato o convoluto, con reticolo cromatinico fine, nucleolo unico e non ben evidente. Il citoplasma, debolmente basofilo e di solito agranulato, è abbastanza espanso e presenta superficie irregolarmente sfrangiata, apprezzabile su strisci di sangue periferico ben eseguiti e colorati con MGG (fig. 19, A) ma ancor meglio con l'osservazione in contrasto di fase o in microscopia elettronica. Nelle apposizioni di linfonodi, milza o midollo osseo il reperto è meno evidente. Le proiezioni citoplasmatiche hanno base larga e sono lunghe 0,6-1,4 µm.

Reperti ultrastrutturali

È caratteristica la presenza nel citoplasma delle HCs di complessi ribosomo-lamellari, di ribosomi liberi e di granuli elettron-densi, di importanza diagnostica nei confronti di altri disordini linfoproliferativi, in cui tali reperti non si osservano neanche in presenza di linfociti a morfologia villosa (ad es. nel MZBL splenico con linfociti villosi).

Reperti citochimici

Caratteristica (fig. 19, B) è la positività citoplasmatica (diffusa o finemente granulare) della reazione citochimica per la *fosfatasi acida*, presente nella forma isomerica 5 che è *tartrato resistente* (TRAP).

Attività proliferativa

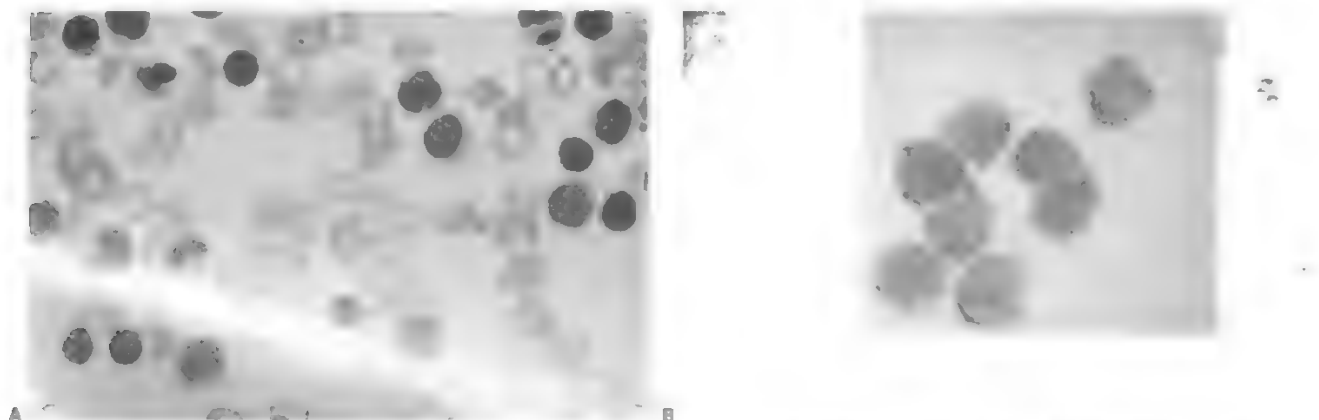
È la più bassa di tutti i tipi di LNH (cellule Ki-67 positive inferiori al 5%).

Fenotipo

È riconducibile quasi in tutti i casi alla *linea linfocitaria B* (v. tab. VII). Nella pratica routinaria, la coespressione di un marker pan-B e di HC2, CD11c, CD25, CD103 è fortemente probante per la diagnosi citoimmunologica di HCL.

Citogenetica e genetica molecolare

Il cariotipo delle HCs è di solito normale o presenta alterazioni non clonali. Sporadicamente sono state segnalate traslocazioni o



1.2.6.6. Tricoleucemia (HCL). A) Sangue periferico (arrectato) — presenza di tipici linfociti villosi. B) Reazione postova per le fosfatasi acide tartrato resistenti (TRAP).

delezioni del cromosoma 14, presenza di un extracromosoma Y o di un marker 6q-, alterazioni di vario tipo dei cromosomi 1, 2, 5 (Haglund *et al.*, 1994). Non risultano alterati i loci *bcl-2* e *c-src*. È accertato che il genoma di HTLV-II non è integrato nel DNA delle HCs, con singole eccezioni (specie in HCL di linea T). È documentata invece la frequente presenza del genoma EBV (Wolf *et al.*, 1990).

Reperti istopatologici

Il midollo osseo (v. **TRICOLEUCEMIA***, Agg. I, figg. 2 e 3, a coll. *7255-7256) è presso che costantemente infiltrato dalle HCs già all'esordio di malattia, in forma zonale (non paralamellare) o diffusa, però con risparmio di larga parte degli adipociti. Nelle aree occupate dai tricolinfociti l'infiltrazione assume un aspetto lasso perché i nuclei appaiono distanziati essendo circondati dall'ampio citoplasma (reperito caratteristico ma non patognomonico, essendo presente anche nel MBZL). Sempre presente e talora cospicua è l'iperplasia delle fibrille reticolari argentofile (v. **TRICOLEUCEMIA***, fig. 3 a coll. *7256), il che è frequente causa di *punctio sicca*. Una valutazione quantitativa della cellularità tricolinfocitica può essere desunta dal cosiddetto *Hairy Cell index* (% cellularità totale x% cellularità HCs/10⁴), che si aggira tra 0-1 (Golomb e Vardiman, 1983). In caso di minimo coinvolgimento midollare (all'esordio o dopo chemioterapia), per valutare l'entità dell'infiltrazione tricolinfocitica può essere utile l'immunocolorazione delle HCs con gli anticorpi DBA44 o L26.

Nella milza, ingrossata nell'80-90% dei casi (peso medio 1300 g, massimo osservato 4600 g), si osserva atrofia dei follicoli malpighiani, diffusa infiltrazione tricolinfocitica nella polpa rossa, presenza di lacune pseudoangiomatose ripiene di sangue, delimitate da HCs in posizione di sponda. Il fegato mostra architettura normale, talora fibrosi degli spazi portal, di solito infiltrati da HCs, come i sinusoidi. Sono presenti strutture pseudoangiomatose simili a quelle descritte nella milza. Nella milza e nel fegato raramente si notano focolai di mielopoiesi (criterio differenziale nei confronti della mielofibrosi idiopatica). Nei linfonodi l'architettura è del tutto o parzialmente sovvertita per la larga infiltrazione delle cellule HCs nelle aree B (con risparmio della paracorticale), nella capsula e nei tessuti perilinfonodali. I più vari organi e tessuti possono presentare infiltrazione di HCs, ivi compresi la cute (infiltrati periannessiali e perivasali), il polmone (infiltrati focali) e lo scheletro (3% dei casi), in cui si riscontrano aree osteolitiche, talora osteo-

sclerosi distrettuale, o osteoporosi diffusa (Van der Molen *et al.*, 1989).

Hairy cell leukemia variant (HCL-v)

È stata descritta per primo da Cawley *et al.* (1980). Le HCs presentano morfologia simil-proliferativa, *debole TRAP positività*, assenza di complessi ribosoma-lamellari nel citoplasma. Il fenotipo differisce da quello proprio della HCL per la negatività di HC2 e CD25. Nella DD della HCL-v devono essere tenute presenti la l. cronica proliferativa, lo SLL ipersplenomegalico, il MZBL splenico, la mielofibrosi idiopatica.

Bibliografia

- Butter M. R., *Hairy cell leukemia*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1209-1234.
Cawley J. C., Burns G. F., Hayhoe F. G. J., *Leuk. Res.*, 1980, **4**, 547-559.
Golomb H. M., Vardiman J. W., *Blood*, 1983, **61**, 349-352.
Haglund U., Juliusson G., Stella B. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 2637-2645.
Matutes E. *et al.*, *Leuk. Lymphoma*, 1994, **14** (Suppl. 1), 57-61.
Van der Molen L. A., Urban W. J., Longo D. L. *et al.*, *Blood*, 1989, **74**, 2066-2069.
Wolf B. C., Martin A. W., Neiman R. S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1990, **136**, 717-723.

1.2.7. PLASMOCITOMA

Il plasmacitoma è stato incluso dalla REALC tra le malattie linfoproliferative in quanto è una neoplasia derivata da un clone linfocitario B capace di completa evoluzione maturativa fino al plasmacito. Non illustreremo qui la sua classica forma midollare (mieloma multiplo), né quella di plasmacitoma osseo solitario (v. **PLASMOCITOMA** [v.: v.*; v.**]), ma solo le insolite forme di plasmacitoma primario extramidollare.

Plasmacitoma primario extramidollare

Può localizzarsi nelle sedi più disparate (v. sotto *Quadri clinici*, col. **3387) in forma di masserelle del diametro di 0,5-5,0 cm. La massa neoplastica è costituita da un monotono infiltrato plasmacellulare (fig. 20, A) ad elementi generalmente di tipo maturo. Insoliti sono gli elementi di tipo plasmablastico (*plasmacitoma anaplastico*; fig. 20, B). Le plasmacellule sono fittamente stipate in bande o aggregati che tendono ad invadere e sovvertire le normali strutture dell'organo invaso. Nei linfonodi è notevolmente frequente l'iperplasia fibrillare che unitamente ad una proliferazione

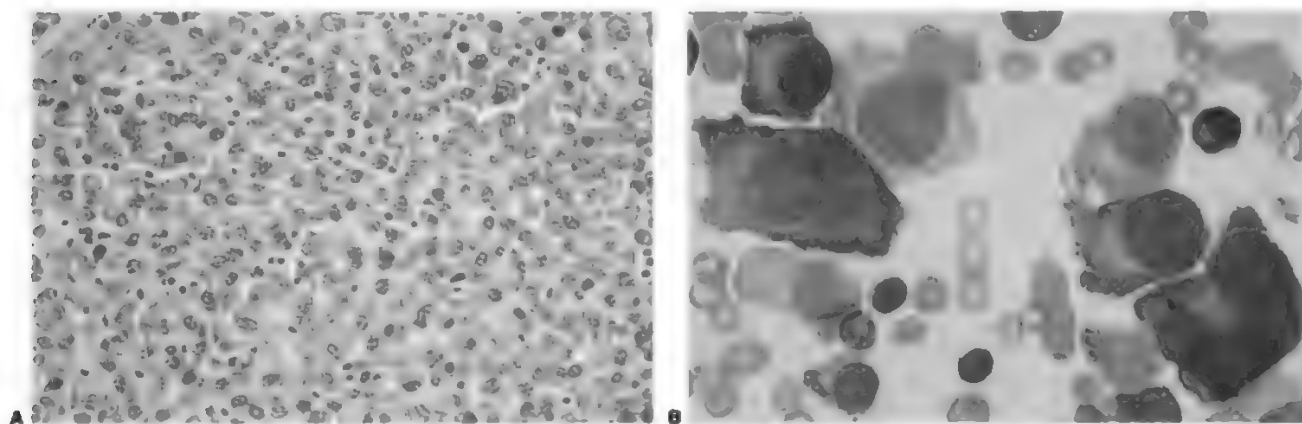


Fig. 20. Plasmacitoma linfonodale. A) Linfonodo, colorazione E.E. Diffusa infiltrazione di plasmacellule piccole e di media grandezza. B) Linfonodo, apposizione, colorazione MGG. Plasmacitoma anaplastico.

LINFOMI

di piccoli vasi tende a circondare le aree plasmacitomatoze fornendo aspetti di tipo alveolare. Occasionale è il reperto di depositi di amiloide, frequente quello di strutture pseudoangiomatose (Lennert e Feller, 1992).

L'immunofenotipo delle plasmacellule neoplastiche è caratterizzato da negatività di slg, presenza di clg monotipiche (soprattutto IgA), da positività di antigeni associati alle plasmacellule (PCA, PC, CD38), sono assenti per la maggior parte gli antigeni B-associati CD19, CD20, CD22; espressi spesso CD79a, CD45R, HLA-DR, EMA, CD43.

La diagnosi differenziale istopatologica va posta nei confronti di condizioni di rilevante iperplasia plasmacellulare di tipo reattivo benigno, di metastasi linfonodali in corso di mieloma multiplo o di leucemia plasmacellulare, dell'immunocitoma, del l. di Lennert e della variante plasmacellulare della malattia di Castleman.

Le plasmacitosi reattive si distinguono dal plasmacitoma linfonodale primitivo per la tendenza delle plasmacellule alla dispersione casuale invece che alla proliferazione compatta, e per la minore uniformità del tipo plasmacellulare. I reperti immunofenotipici e di biologia molecolare denunciano la policlonalità della proliferazione.

Le metastasi linfonodali del mieloma multiplo sono contraddistinte da maggiore pleomorfismo cellulare.

Nella leucemia plasmacellulare si osservano nei linfonodi plasmaciti piccoli con spiccata tendenza ad infiltrare la capsula ed i tessuti perilinfonodali; il reperto ematico è pure inconfondibile.

Il linfoma linfoplasmacitoide (immunocitoma) è caratterizzato da una popolazione neoplastica mista, linfocitica, linfoplasmacitoide e plasmacitica.

Qualche difficoltà diagnostica comporta talora la malattia di Castleman («iperplasia linfonodale angiofollicolare», specie se presente nella «variante plasmacellulare», solitamente multicentrica («Multicentric Castleman's Disease», MCD). In questa forma si riscontrano lesioni follicolari in parte analoghe a quella della forma sclero-ialina, associate a ialinosi perivascolare, scarsi immunoblasti e corona mantellare ridotta, larga infiltrazione interfollicolare di plasmacellule mature policlonali, nel cui seno si notano però spesso cloni monotipici (Menke *et al.*, 1996), presentanti riarrangiamento di geni IgH (Hanson *et al.*, 1988).

Bibliografia

- Frizzera G., *Semin. Diagn. Pathol.*, 1988, 5, 346-364.
Grogan T. M., Spier C. M., *The B cell immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1265.
Hanson C. A., Frizzera G., Patton D. F. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1988, 131, 84-91.
Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
Menke D. M., Tieman M., Camoriano J. K. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996, 105, 268-276.

1.2.8. LINFOMA A GRANDI CELLULE B (A CRESCITA DIFFUSA)

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Diffuse histiocytic, occasionally diffuse mixed lymphocytic-histiocytic lymphoma*. Lukes-Collins: *Large cleaved or large uncleaved follicular center cells; B-immunoblastic*. UKC: *Centroblastica, B-cell, large cell anaplastic (B-cell) lymphoma*. WF: *Diffuse large cell anaplastic or immunoblastic; occasionally diffuse mixed small and large cell lymphoma*. REALC: *Diffuse large B-cell lymphoma*. (Lennert).

Premessa

Il termine «l. a grandi cellule B, a crescita diffusa» (DLBCL), adottato dalla REALC, raccoglie un gruppo eterogeneo di l., accomunati dall'appartenenza alla linea linfoide B,

dalle cospicue dimensioni delle cellule neoplastiche, dalla proliferazione di tipo diffuso, dall'aggressività del decorso clinico, dalla simile risposta alle attuali terapie; tuttavia ontogenesi, morfologia, alcune particolarità dell'immunofenotipo e delle alterazioni genomiche depongono per una composizione citologica non omogenea. Nella maggior parte dei casi esiste infatti una commistione di cellule di tipo centroblastico e immunoblastico, con minore frequenza si notano grandi cellule a nucleo inciso (*cleaved*) o multilobulato (tale quadro è spesso reperibile in sedi extralinfonodali) o grandi cellule anaplastiche analoghe a quelle reperibili in l. a grandi cellule di linea T o null. Altri casi ancora mostrano una particolare ricchezza di linfociti T o di «istiociti».

Nella classificazione di Kiel (Lennert e Feller, 1992) figurano come entità distinte le forme di l. centroblastico e di l. immunoblastico, ma l'inserimento nell'uno o nell'altro quadro istologico è inficiato da valutazioni largamente soggettive della preminenza dell'uno o dell'altro tipo cellulare, giacché in nessun caso vi è esclusiva presenza di uno solo dei predetti oncotipi. Ciò ovviamente comporta spesso disparità di interpretazioni diagnostiche inter- ed anche intrapersonali. Bisogna notare inoltre che pure nell'ambito di una stessa collocazione diagnostica il quadro istocitologico per alcuni aspetti risulta diverso a seconda che si tratti di una neoplasia *de novo* oppure di una forma secondaria, insorta per trasformazione blastica di un processo linfomatoso a basso grado di malignità. Questi rilievi giustificano l'approccio eclettico della REALC nell'inquadramento dei l. a grandi cellule B.

Reperti istocitologici

Sufficientemente ben definiti sono i caratteri morfologici e le espressioni fenotipiche e genetiche di ciascun tipo cellulare partecipe dei l. a grandi cellule B.

Centroblasto neoplastico

Richiama i tratti morfologici del centroblasto dei follicoli linfatici attivati. È una cellula piuttosto grande con sottile citoplasma basofilo a contorni ben stagliati, solitamente con nucleo rotondo non inciso ma talora alquanto pleomorfo, a cromatina fine, fornito di tre o più nucleoli ben evidenti e adesi alla membrana nucleare. Le cellule non manifestano elevata coesione. Il 25-80% delle cellule è Ki-67 positivo.

La classificazione di Kiel etichetta come l. centroblastici (fig. 21, A e B) tutti i quadri istocitologici in cui i centroblasti figurano in misura superiore al 25%, commisti a cellule con nucleo inciso e ad immunoblasti.

Vengono distinte alcune varianti del l. centroblastico (Hui *et al.*, 1987): 1) *Variante monomorfa*: comporta più del 60% di tipici centroblasti, cui sono commisti centrociti, cellule centrocitoidi e meno del 10% di immunoblasti. 2) *Variante polimorfa*: è caratterizzata da ampia commistione di centroblasti, centrociti, immunoblasti (> 10%), cellule con nucleo multilobato (< 10%). 3) *Variante multilobata* (Pinkus *et al.*, 1979-1981), più del 10% dei centroblasti ha nucleo distintamente multilobato (3-4 lobi) (fig. 18, C). Oltre ai linfonodi, può interessare cute (Palleen *et al.*, 1981), sottocutaneo e scheletro (Baroni *et al.*, 1987). 4) *Variante centrocitoide* (fig. 22): le cellule sono in prevalenza piccole (maggior diametro di 9-11 µm), hanno sottile orletto citoplasmatico debolmente basofilo, nucleo allungato o ovalare non chiaramente inciso, cromatina lassa e piccoli nucleoli; a queste cellule sono frammisti tipici centroblasti e immunoblasti, in varia proporzione.

Immunoblasto B neoplastico

È una cellula voluminosa (diametro di 15-30 µm), con nucleo rotondo o ovalare un po' eccentrico, cromatina mode-

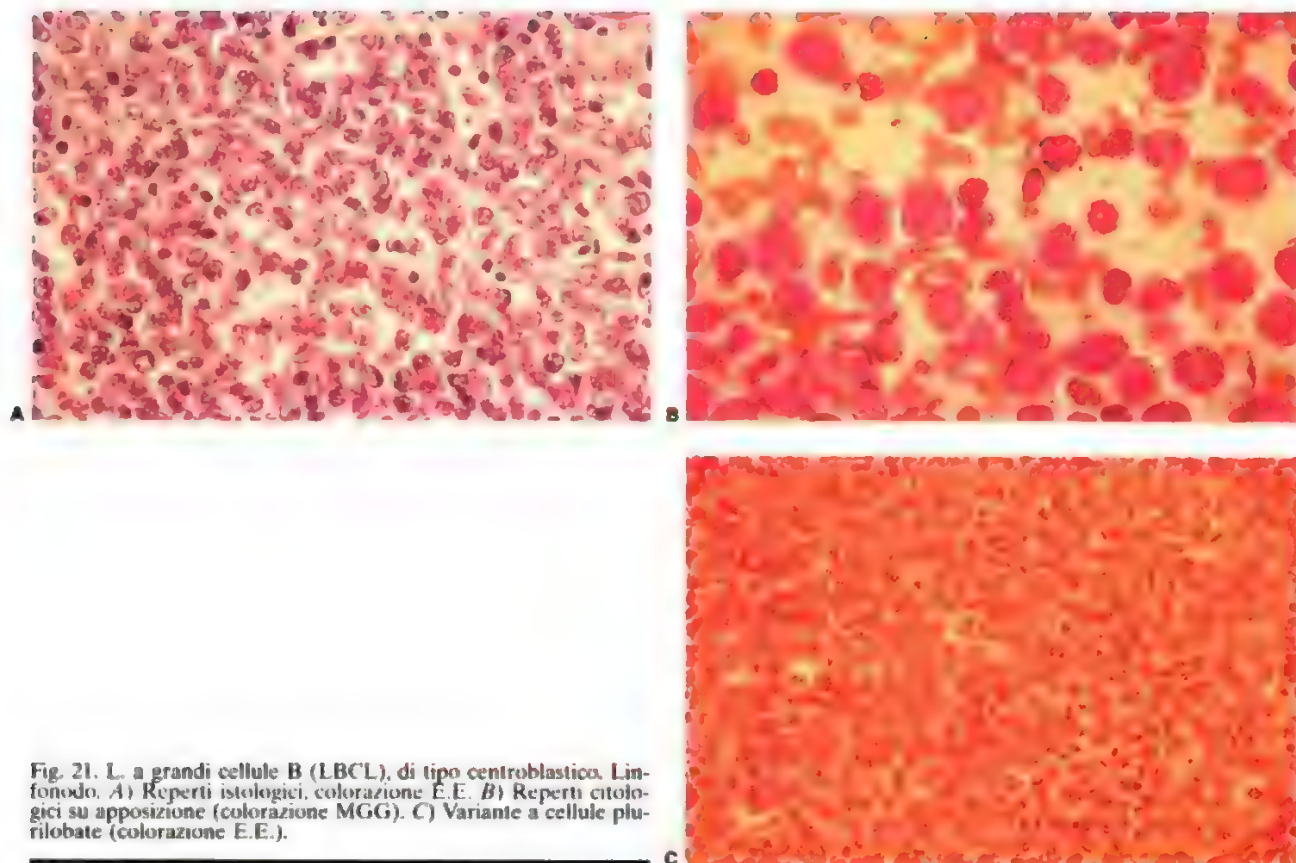


Fig. 21. L. a grandi cellule B (LBCL), di tipo centroblastico. Linfonodo. A) Reperti istologici, colorazione E.E. B) Reperti citologici su apposizione (colorazione MGG). C) Variante a cellule pluri-lobate (colorazione E.E.).

ratamente addensata e 1-3 grossi nucleoli basofili centrali; il citoplasma è ampio, intensamente basofilo, talora vacuolato.

L'attività mitotica è elevata ed il 25-80% delle cellule è Ki-67 positivo.

La classificazione di Kiel etichetta come *l. immunoblastici B* (fig. 23) i casi di l. a grandi cellule B in cui prevalgono i grandi immunoblasti (> 90%), commisti a modeste quantità di centroblasti, centrociti, linfociti maturi e plasmacellule, cellule dendritiche follicolari, macrofagi e cellule epitelioidi. Occasionalmente le cellule tumorali contengono

materiali intracitoplasmatici globulari o diffusi PAS positivi, di natura immunoglobulinica.

Sono state descritte alcune varianti citologiche del *l. immunoblastico*: 1) variante senza differenziazione plasmacitica (forma relativamente monomorfa); 2) variante con differenziazione plasmacitica; 3) variante con elevato contenuto di linfociti B maturi e linfoplasmacitoidi.

Linfoma a grandi cellule anaplastiche

È incerto se possa considerarsi una variante di questa classe di l. a grandi cellule B il l. a grandi cellule anaplastiche Ki-1

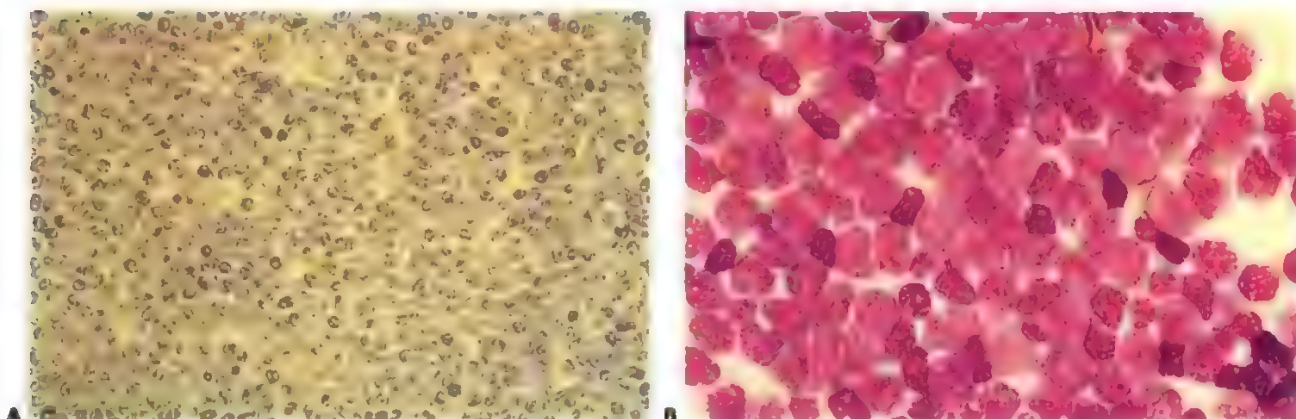


Fig. 22. L. a grandi cellule B (LBCL), variante centroblastica centrocitoidica. Linfonodo. A) Reperti istologici, colorazione E.E. B) Reperti citologici su apposizione, colorazione MGG.

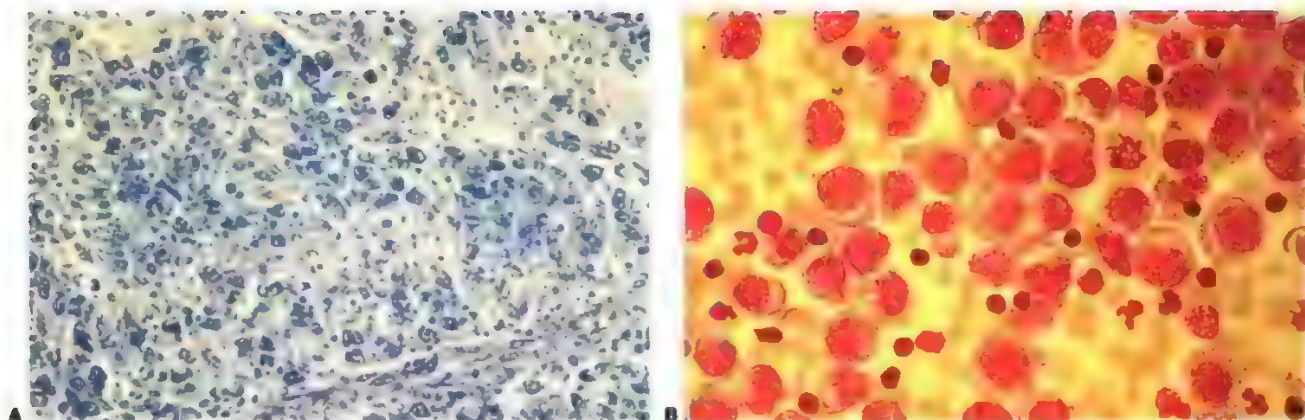


Fig. 23. L. a grandi cellule B (DLBCL), tipo immunoblastico. Linfonodo. A) Reperti istologici, colorazione Giemsa. B) Reperti citologici su apposizione, colorazione MGG.

(CD30) positive, di linea B (fig. 24). I l. a grandi cellule anaplastiche (ALCL: *Anaplastic Large Cells Lymphoma*) CD30+ sono quasi sempre di linea T. Per la descrizione dei caratteri istocitologici di questo linfoma si rinvia alla corrispondente forma T.

Immunofenotipo

Nei sottotipi citologici di DLBCL si apprezza variabile espressione di vari antigeni attribuita alla eterogenea derivazione delle cellule linfomatose. Anche in rapporto alla sede d'insorgenza del l. linfonodale o extralinfonodale (49% dei casi) e alla sua natura *de novo* o secondaria (da linfomi centrofollicolari di basso grado di malignità o di altro tipo), i reperti più salienti figurano nella tab. VII: segnaliamo la frequente positività di clg nella variante linfoplasmacitoidica, e quella di CD5 e CD10 in forme secondarie a SLL; l'elevata frequenza di positività per markers di attivazione (CD25, CDw70). Raramente però è positivo il CD30, anche nel l. immunoblastico. La coespressione di antigeni di linea B e di CD45RO, rappresenta un evento caratteristico di una porzione di casi (10%) di DLBCL.

Genetica molecolare e citogenetica

Il gene *bcl-2* appare riarrangiato in circa il 30% dei casi e l'evento sarebbe frequente soprattutto nei DLBCL secondari a l. centrofollicolari. In circa il 40% dei casi è riarrangiato il *bcl-6* (46%), verosimilmente in DLBCL *de novo* (Lo Coco *et al.*, 1994).

Il *major breakpoint* di t(14;18) non è dimostrabile in nessun caso di l. immunoblastico B, mentre si rinviene in circa il 6% dei l. centroblastici (forse secondari a FCL).

Caratteristica istologica comune a tutte le forme citologiche dei DLBCL è la proliferazione di tipo diffuso (solo occasionalmente di tipo misto nodulare/diffuso), che comporta completo sovvertimento della normale struttura linfonodale e manifestazioni destruenti dei parenchimi extralinfonodali eventualmente invasivi. Tra le cellule neoplastiche si possono osservare cellule epitelioidi. Frequente nei l. centroblastici è l'iperplasia fibrillare, solitamente assente negli immunoblastici.

In definitiva sia il cosiddetto «l. centroblastico» sia il cosiddetto «l. immunoblastico» non offrono un quadro istocitologico unico ma quasi sempre quadri misti con commistione in varia proporzione delle due classi cellulari e una serie di varianti morfologiche entro la stessa classe di l.; un insieme eterogeneo altresì in qualche misura anche per il profilo immunofenotipico e per anomalie geniche, in parte in rapporto alla natura *de novo* o secondaria del processo. Tenuto conto pure dell'orientamento dei clinici di trattare tutta questa casistica con gli stessi schemi terapeutici, è condivisibile l'impostazione della REALC di inserire

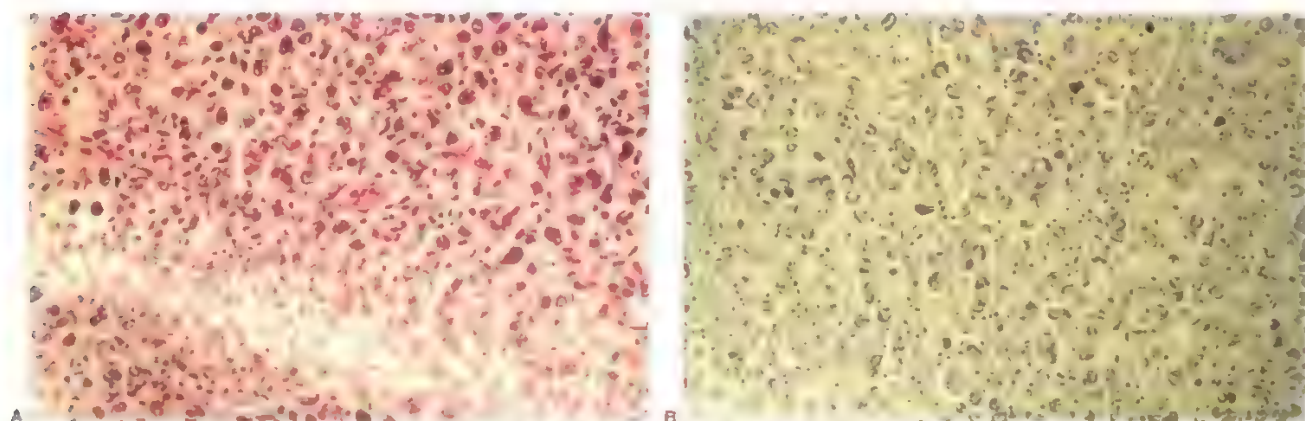


Fig. 24. L. a grandi cellule anaplastiche B (ALCL B). Linfonodo. A) colorazione P.E. B) colorazione Giemsa. Sono meglio apprezzabili i dettagli morfologici nucleari e la basofilia del citoplasma.

per ora tutte queste forme morbose a grandi cellule B in un unico gruppo. Nel quale tuttavia sono stati individuati di recente due quadri istopatologici e clinici che appaiono sufficientemente definibili come *autonome entità*: il *I. a grandi cellule B anaplastico ricco di linfociti T*, ed il *I. a grandi cellule B primitivo del mediastino*, che richiedono una trattazione a sé stante (v. oltre). Il *linfoma angiotropico a grandi cellule B* sarà descritto in appendice al capitolo *Linfoma angiocentrico* (v. sotto col. **3412).

Bibliografia

- Baroni C. D., Pescarmona E., Calogero A. et al., *Histopathology*, 1987, **11**, 1121-1132.
 Hui P. K., Feller A. C., Pileri S. et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1987, **87**, 55-59.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Lo Coco F., Ye B. H., Lista F. et al., *Blood*, 1994, **83**, 757-759.
 Pallesen G., Madsen M., Hastrup J., *Scand. J. Haematol.*, 1984, **26**, 72-79.
 Pinkus G. S., Said J. W., Hargreaves H. K., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979, **72**, 540-550.
 Stein H., Dallenbach F., *Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, William & Wilkins, Baltimore, pp. 675.
 Weinberg D. S., Pinkus G. S., *Am. J. Clin. Med.*, 1981, **76**, 190-196.
 Weiss L., Warnke R., Sklar J., Cleary M. L., *N. Engl. J. Med.*, 1987, **317**, 1185-1189.

Forme particolari dei linfomi a grandi cellule B

Linfoma a grandi cellule B ricco di linfociti T

Il «*T-cell-rich B large-cell lymphoma*» (Ramsay et al., 1988; Scarpa et al., 1989; Osborne, 1990; Chittal et al., 1991) è un l. con distinte caratteristiche morfologiche. All'esame istologico l'architettura dei linfonodi appare cancellata dalla diffusa infiltrazione di cellule linfoidi, associata ad iperplasia venulare con endoteli appiattiti o moderatamente cubici. Nell'infiltrato si distinguono due tipi di cellule: a) *grandi cellule linfoidi di linea B*, isolate o raccolte in piccoli aggregati; hanno nucleo rotondo o irregolarmente convoluto o multilobato, a cromatina dispersa, e con uno o più distinti nucleoli; il citoplasma è ora sottile ora piuttosto abbondante, basofilo; un orientamento plasmacitoide è incostante; singole cellule possono presentare morfologia Reed-Sternberg-simile o affine alla variante L&H; b) *piccoli linfociti di linea T*, con nucleo rotondo e cromatina compatta oppure con nucleo convoluto e cromatina più lassa, e piccoli nucleoli. Le grandi cellule linfoidi B, che rappresentano il 3-16% dell'intera popolazione cellulare, sono immerse in seno al diffuso infiltrato dei piccoli linfociti T (~ 90%).

Le grandi cellule linfoidi B esprimono alcuni antigeni di superficie B-cellule associati e quasi sempre Ig monotipiche di superficie e/o citoplasmatiche; sono negative per CD5, CD10, CD15, e costantemente per marcatori T-cellulari, macrofagici e NK, nonché per gli antigeni CD30 e EMA. Mostrano riarrangiamento per geni delle catene H e L delle immunoglobuline. I piccoli linfociti T a morfologia matura presentano invece immunofenotipo T, CD45RO+, CD4+ o CD8+ e sono policlonali.

L'insolita commistione di grandi cellule B e di linfociti T viene ascritta ad una risposta attiva dell'ospite contro il tumore oppure ad una risposta T-linfocitica passiva alla secrezione di citochine (IL-4) da parte delle grandi cellule tumorali (De France et al., 1992).

La singolarità del quadro istologico può indurre in errore e ad interpretare come neoplastiche le numerose cellule linfoidi T invece delle grandi cellule B. La diagnosi richiede una attenta valutazione morfologica e soprattutto complete indagini immunocitologiche e di genetica molecolare, ricorrendo eventualmente a tecniche di ibridazione *in situ*. La diagnosi differenziale istopatologica deve essere posta nei confronti di varie condizioni patologiche benigne e maligne, quali mononucleosi infettiva, varie linfadenopatie di natura virale o associate a malattie autoimmuni, linfadenopatia angioimmunoblastica, l. a grandi cellule di natura secondaria (Ng et al., 1989), nonché con la MH tipo LP, con la variante «*Lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease*» (Mc Bride et al., 1996) (v. col. **3221) e con il cosiddetto «*Histiocytic*

rich B-cell lymphoma» istologicamente affine al «*paragranuloma*» hodgkiniano (v. col. **3217).

Bibliografia

- Chittal S. M., Brousset P., Voigt J. J. et al., *Histopathology*, 1991, **19**, 211-220.
 De France T., Fluckinger A. C., Rossi J. F. et al., *Blood*, 1992, **79**, 990.
 Mc Bride J. A., Rodriguez J., Luthra R. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 193-201.
 Ng C. S., Chan J. K. C., Hui P. K., Lau W. H., *Human Pathol.*, 1989, **20**, 1145-1154.
 Osborne B. M., Butler J. J., Pugh W. C., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1990, **14**, 933-938.
 Ramsay A. D., Smith W. J., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 433-443.
 Scarpa A., Bonetti F., Zamboni G. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1989, **13**, 933-938.

Linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino (timico)

Il «*primary mediastinal B-cell lymphoma with sclerosis*» (PMBCL) (fig. 25) è costituito da cellule di variabili dimensioni ma in predominanza grandi, con nucleo pleomorfo talora multilobato, sempre fornito di più nucleoli e con membrana nucleare ben stagliata; il citoplasma è ampio e debolmente basofilo. Meno frequentemente si osservano cellule con caratteristiche simil-immunoblastiche oppure pleomorfe e simulanti cellule di Reed-Sternberg. La proliferazione è di tipo diffuso e nel 50% dei casi si associa a spiccata iperplasia fibrillare sclerotizzante (collagene). In alcuni casi lunghe bande ialine suddividono il l. in noduli (*immagini di compartimentalizzazione*) (Menestrina et al., 1986). Si possono osservare aree di necrosi. Non di rado alla proliferazione linfomatosa si associa un infiltrato linfoide di tipo policlonale reattivo, forse secondario all'azione locale di citochine. In seno alla proliferazione linfomatosa si possono riconoscere strutture epiteliali timiche (Lamarre et al., 1989).

L'immunofenotipo dominante (Al-Sharabati et al., 1991; Falini et al., 1995) è quello di un linfoma di derivazione B-cellulare, con variabile espressione di CD30 e frequente negatività di Ig sia di membrana che citoplasmatiche; incostante espressione di CD45 (+ 61%), di CD30 (+ 60%) e di HLA-DR (+ 50%), positività per l'antigene PCI (associato alle plasmacellule); l'antigene nucleare di proliferazione PCNA è positivo nel 35-80% delle cellule (Lazarino et al., 1993).

È costante il riarrangiamento di geni IgH e L (Scarpa et al., 1987; Al-Sharabati et al., 1991) anche nei casi in cui mancano slg e clg. Talora è stato reperito riarrangiamento dell'oncogene *c-myc* (Scarpa et al., 1991).

La diagnosi differenziale istopatologica va posta nei confronti di altre neoplasie mediastiniche, particolarmente con il timoma maligno, la malattia di Hodgkin («*variante sinciziale*» del sottotipo NS), il seminoma, taluni carcinomi anaplastici. Dev'essere

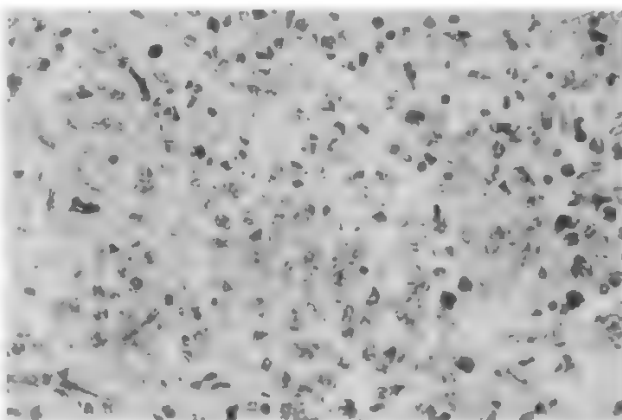


Fig. 25. L. a grandi cellule B primitivo del mediastino, con sclerosi. Timo, colorazione Giemsa (v. testo).

LINFOMI

tenuto presente pure il raro l. primario del mediastino recentemente descritto da Suster e Moran (1996) come «*pleomorphic large cell lymphoma of the mediastinum*», in cui si possono distinguere tre diversi quadri istopatologici: tipo sarcomatoide, tipo anaplastico simil-carcinomatoso, tipo simil-Hodgkin-LD variante siniziale, che mostrano tutti lo stesso immunofenotipo: forte positività dei grandi linfociti atipici con gli anticorpi LCA e L26 (pan-B cellulare); reperti negativi con ogni altro marcatore (compreso CD30).

Bibliografia

- Aisenberg A. C., *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 2291-2293.
 Al-Sharabati M., Chittal S., Duga-Neulat I. et al., *Cancer*, 1991, **67**, 2579-2587.
 Falini B., Venturi S., Martelli M. et al., *Br. J. Haematol.*, 1995, **89**, 780-789.
 Lamarre L., Jacobson J. O., Aisenberg A. C., Harris N. L., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989, **13**, 730-739.
 Lazzarino M., Orlandi E., Paulli M. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 2306-2313.
 Menestrina F., Chilosi M., Bonetti F. et al., *Histopathology*, 1986, **10**, 589-600.
 Scarpa A., Bonetti F., Menestrina F., *Virchow's Arch. (A)*, 1987, **412**, 17.
 Scarpa A., Borgato L., Chilosi M. et al., *Blood*, 1991, **78**, 780-788.
 Suster S., Moran C. A., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 224-232.

1.2.9. LINFOMA DI BURKITT

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Undifferentiated lymphoma, Burkitt's type*. Lukes-Collins: *Small, non cleaved cell lymphoma*. UKC: *Burkitt's lymphoma*. WF: *Small noncleaved cell, Burkitt's type*. REALC: *Burkitt's lymphoma*.

Premessa

Il l. linfoblastico di Burkitt (BL), sia di tipo endemico che di tipo sporadico (v. sopra *Epidemiologia*; v. sotto *Patogenesi*; v. anche BURKITT, LINFOMA DI [v.; v.*]), presenta crescita aggressiva, con proliferazione di tipo diffuso e larga infiltrazione dei più vari organi e tessuti.

Reperti citologici

Il reperto citologico più saliente del BL è costituito da cellule d'aspetto «blastico indifferenziato», notevolmente uniformi per morfologia e dimensioni (fig. 26). I linfoblasti del BL hanno diametro di 20-25 µm, nucleo rotondeggiante, cromatina piuttosto addensata in masserelle compatte immerse in paracromatina chiara («aspetto fenestrato» dei nuclei), 2-3 nucleoli di media grandezza, basofili, in posizione centrale; citoplasma in genere piuttosto scarso, fortemente basofilo, spesso vacuolato (fig. 26, C). Si osservano talora (specie in BL in soggetti HIV positivi) anche cellule grandi, coesive, con nucleo rotondo fornito di un unico grosso nucleolo («variante immunoblastica» del BL).

Reperti citochimici

Si può osservare positività di membrana per le fosfatasi alcaline, incostante e debole positività per le idrolasi acide (reazione gra-

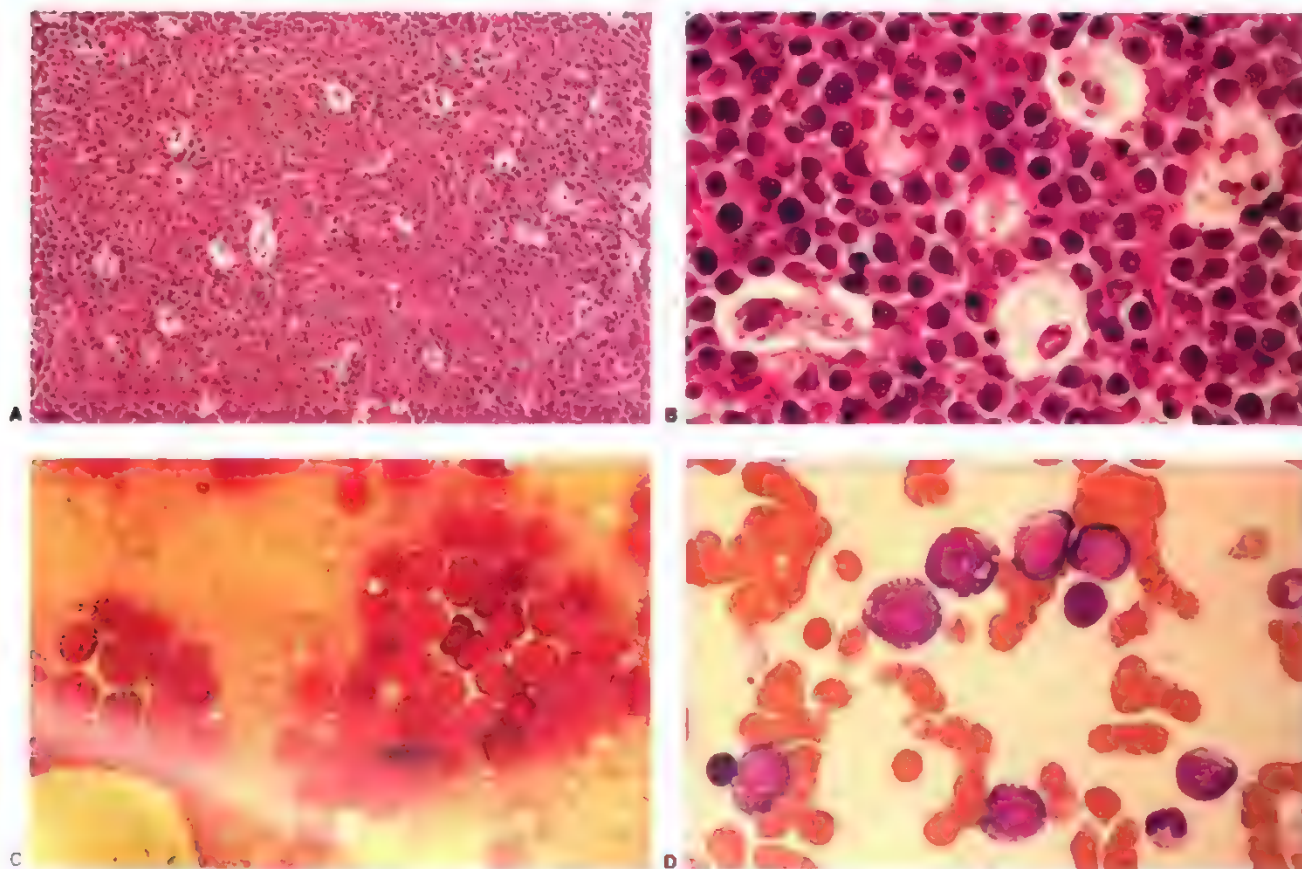


Fig. 26 L. di Burkitt (BL), sporadico occidionale. A) Rappresentazione in linfonodo, colorazione H.E. B) Tonsilla, colorazione H.E. A maggiore ingrandimento si apprezzano le caratteristiche morfologiche delle cellule linfomatose. C) Morfologia delle cellule linfomatose su appoggio di linfonodo, colorazione MGG. D) Sangue periferico colorato con MGG. E) Colorazione di BL: cellule a morfologia FAB L3 nel sangue periferico.

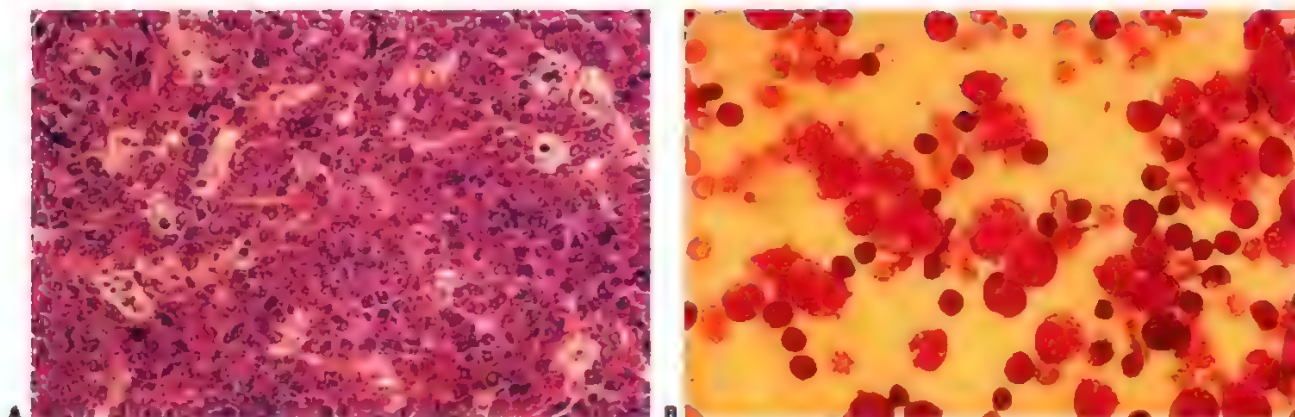


Fig. 27. L. Burkitt-like. Linfonodo. A) Reperti istologici, colorazione Giemsa. B) Reperti citologici su apposizione, colorazione MGG.

nulare non focale), reazione PAS negativa. I vacuoli contengono lipidi colorabili con il Sudan rosso.

Fenotipo

Sono sempre presenti sIg monoclonali (usualmente IgM), con espressione monotipica di catene leggere ($\lambda > \kappa$). Raramente si rinvencono clg (cq) nei BL sporadici occidentali, mai nel BL endemico africano. Gli antigeni di superficie presenti (v. tab. VII, coll. **3233-3234) sono B-cellule associati; non è espresso TdT se non in fase leucemica. Soprattutto in casi contenenti il genoma EBV si osserva positività di CD24.

Citogenetica e genetica molecolare

Costanti, e caratterizzanti, sono le traslocazioni interessanti il braccio lungo del cromosoma 8, quali t(8;14) (q24;q32) presente nell'80% dei casi, e — meno frequentemente — t(2;8)(p12;q24) e t(8;22)(q24;q11) (Shiramizu *et al.*, 1991). Ciò comporta alterazione dell'oncogene *c-myc* (v. sotto *Patogenesi*).

Proliferazione

Le mitosi sono numerose, il tempo potenziale di duplicazione è breve (25,6 ore) (Iversen *et al.*, 1974) e la frazione di crescita comprende la quasi totalità della popolazione linfoblastica (nell'80% delle cellule si rinviene positività di Ki-67). Ampissima però è anche la perdita cellulare.

Reperti istologici

Nelle sezioni istologiche dei linfonodi i blasti monomorfi presentano carattere coesivo. La presenza di voluminosi macrofagi regolarmente disseminati tra le cellule blastiche conferisce alle sezioni l'aspetto a cielo stellato (*starry sky*) (fig. 26, A/B). Tale reperto però non è quantitativamente uniforme in tutta l'area linfonodale e può in parte mancare nelle sedi extralinfonodali. Il reperto comunque non è specifico del BL. Nei linfonodi periferici l'architettura è solitamente del tutto sovrastata dall'infiltrazione neoplastica di tipo diffuso. Nei muscoli e nei nervi ed in altri distretti extralinfonodali, l'infiltrazione procede per via interstiziale, dislocando ma non distruggendo le strutture nobili.

Nei casi di BL classico l'infiltrazione linfomatosa del midollo osseo manca o è scarsa. La concentrazione nel midollo osseo di cellule Burkitt superiore al 25% comporta — per convenzione — la diagnosi di ALL L3, ma tra BL e L3 si nota un *continuum* che rende arbitraria ogni rigida delimitazione tra le due forme (fig. 26, C/D).

Linfoma a cellule B ad alta malignità, Burkitt-simile

Il «High grade B-cell lymphoma, Burkitt-like» (BL-like) è una entità inserita in via provvisoria nella classificazione REAL in

appendice al I. di Burkitt ed ai I. a grandi cellule B. È probabilmente da identificare con il «Burkitt's lymphoma with cytoplasmatic immunoglobulin» di Lennert e Feller (1992). È possibile che questa categoria di I. comprenda più di una entità morbosa; certamente vi sono forme *borderline* rispetto al classico I. di Burkitt.

I reperti morfologici più salienti (fig. 27) consistono in una proliferazione linfomatosa di tipo diffuso, a cellule che per dimensioni e per caratteristiche nucleari possono essere considerate intermedie tra i linfoblasti tipici del BL e le grandi cellule linfomatose dei LCBL. I «blasti» sono per lo più cellule di medie dimensioni, con maggiore pleomorfismo dei blasti del BL sia endemico che sporadico. Il citoplasma è variamente espanso, intensamente basofilo con alone chiaro perinucleare in area golgiana (similmente al «sottotipo plasmablastico» del BL di Hui *et al.*, 1987). Il nucleo è rotondo od ovale con cromatina fine e piccoli nucleoli (raramente il nucleolo è unico e centrale). Si possono tuttavia osservare casi con cellule di maggiori dimensioni e citoplasma più espanso, nucleo a morfologia meno uniforme e talora più nuclei. L'aspetto coesivo della proliferazione distingue queste cellule dagli immunoblasti. Le mitosi sono molto frequenti. Alle cellule linfomatose possono essere frammisti macrofagi, ma l'immagine di *starry sky* non è costante.

I reperti citochimici sono caratterizzati da intensa positività al PAS (di tipo granulare, diastasi sensibile) e alle reazioni per le ATPasi e per le 5-nucleotidasi, mentre sono deboli quelle per le fosfatasi acide e per l'ANAE.

Il fenotipo è caratterizzato da sIg +/- e da clg (cq) dimostrabili anche in tessuti fissati in formalina, il che non si osserva nel BL classico (Lennert e Feller, 1992). Solitamente si reperiscono antigeni di superficie B-associati, negatività di CD5 e CD10. All'opposto si reperisce talora CD23, negativo nel BL classico.

Le indagini di genetica molecolare dimostrano che il riarrangiamento di *c-myc* è inconsueto, il che distingue il BL-like dal BL classico. Nel 30% dei casi è presente riarrangiamento di *bcl-2* (Yano *et al.*, 1992).

Bibliografia

- Hui P. K., Feller A. C., Lennert K., *Histopathology*, 1988, **12**, 127-143.
- Iversen O. H., Iversen U., Ziegler J. L., Bluming A. Z., *Europ. J. Cancer*, 1970, **10**, 155-163.
- Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin, pp. 139-146.
- Magrath I. T., Jain V., Jaffe E. S., *Small noncleaved lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 749-772.
- Shiramizu B., Barriga F., Necquaye J. *et al.*, *Blood*, 1991, **77**, 1516-1526.
- Yano T., Van Krieken J., Magrath J. T. *et al.*, *Blood*, 1992, **79**, 1292.

CARLO MAURI

LINFOMI

2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE T (E NK)

2.1. NEOPLASIE DERIVATE DA PRECURSORI CELLULARI T

2.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA T-LINFOLASTICO

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Poorly differentiated lymphocytic lymphoma* (modificato in *Lymphoblastic, convoluted/non convoluted*). Lukes-Collins: *Convoluted T lymphocytic lymphoma*. UKC: *T lymphoblastic lymphoma*. WF: *Lymphoblastic, convoluted or non convoluted lymphoma*. REALC: *Precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia*.

Reperti istocitologici

La morfologia (fig. 28) delle cellule del linfoma T-linfoblastico (T-LbL: *T-Lymphoblastic Lymphoma*) è quella del corrispondente linfoma a cellule B (v. col. **3233) e della leucemia linfoblastica acuta (in genere di tipo FAB L1). Le cellule, di grandezza piccola o media (diametro 10-20 µm), hanno rima citoplasmatica per lo più sottile, con positività focale paranucleare delle reazioni per le *fosfatasi acide* (fig. 28, C); il *nucleo* è *rotondo* (fig. 28, A) od ovoidale oppure variamente convoluto, con cromatina finemente dispersa, nucleoli piccoli e poco appariscenti od anche assenti. L'aspetto a *nucleo convoluto* (fig. 28, B) può essere presente solo in poche cellule oppure in più dell'85%; tali casi vengono considerati quale *sottotipo di T-LbL*. Un'ulteriore variante del T-LbL è costituita da casi a *cellule grandi e pleomorfe*, simili a quelle della ALL FAB L2, con nucleo convoluto e uno o più grandi nucleoli. L'attività mitotica è elevata in tutte le varianti di LbL.

La proliferazione linfomatosa, di tipo diffuso, spesso cancella del tutto l'architettura *linfonodale*, talora coinvolge solo aree T paracorticali ed interfollicolari. Si possono osservare aree di iperplasia di cellule epitelioide a cielo stellato, a distribuzione focale. Capsula, tessuti molli perilinfonodali, pareti vasali sono abitualmente infiltrati. In circa il 15% dei casi alle cellule linfomatose sono frammisti granulociti eosinofili e plasmacellule. Nel *timo*, frequentemente interessato, solo i reperti immunofenotipici permettono di distinguere il LbL dal timoma (Sander *et al.*, 1992).

Immunofenotipo

Il *fenotipo T* (tab. VIII) è presente nell'80% dei LbL: TdT+, positività — con varia frequenza — di antigeni di differenziazione T di tipo intermedio (corticale) o maturo (midollare timico); cCD3 è positivo anche quando antigeni di superficie T sono assenti; CD4 e CD8 possono essere entrambi positivi (e allora CD44 è negativo) o negativi. Il CD10 è positivo nel 40% dei casi mentre lo è solo nel 10% di T-ALL (Deegan, 1989); HLA-DR negativo. Talora sono espressi antigeni associati alla *linea NK* (CD16+, CD57+) (Gouttenfangeas *et al.*, 1990).

Citogenetica e genetica molecolare

Sono stati osservate t(10;14) (q24;q11) e anomalie di 7q. Si nota solitamente riarrangiamento di geni TCR α/β (Falini *et al.*, 1989). Il fatto che solo il 10% di T-LbL CD3+ TCR α/β negativo esprima l'eterodimero TCR γ/δ mentre lo esprime il 67% di T-ALL CD3+ TCR α/β, consente di prospettare l'esistenza di differenze biologiche tra i precursori T cellulari.

Bibliografia

Deegan M. J., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1989, **113**, 606-618.
Falini B., Folenghi L., Fagioli M. *et al.*, *Blood*, 1989, **74**, 2501.

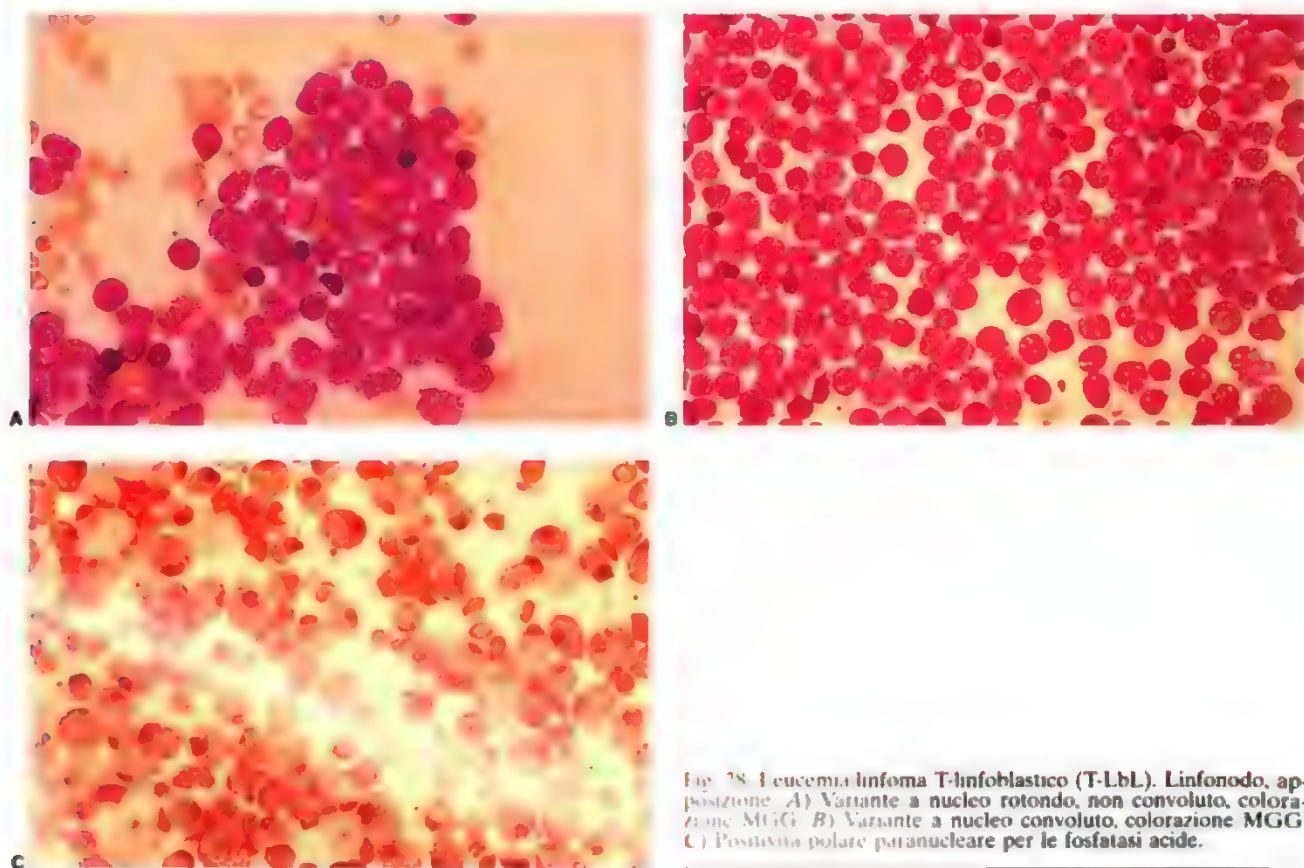


Fig. 28. Leucemia linfoma T-linfoblastico (T-LbL). Linfonodo, approssimazione MGG. A) Variante a nucleo rotondo, non convoluto, colorazione MGG. B) Variante a nucleo convoluto, colorazione MGG. C) Positivita polare paranucleare per le fosfatasi acide.

TAB. VIII. IMMUNOFENOTIPO DEI LINFOMI/LEUCEMIE A CELLULE T

Linfoma	Marcatori immunofenotipici											Altri
	CD 1	CD 2	CD 3	CD 4	CD 5	CD 7	CD 8	CD 25	CD 11	OK17 CD6	Be2	
T-LbL	+	+	+ c -/+ m	(+)	+	+	(+)		-	+	-	TdT +; CD10 +; CD16 -/+; CD38 +; CD44 +; CD57 -/+
T-LGCL	-		+		-	-	+	-	-	+	-	TdT -; CD16 +; CD56 -; CD57 +
T-PLL	-	+	+	+70%	+	+	- (+14%)	-	-	+	-	CD16 -; CD56 -; CD57 -; CD122 +/-
ATLL	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	+	+	+	-/+	CD16 -; CD56 -; CD57 -;
CTCL	-	+	+	+	+	- (+30%)	-	-	+/-	+	+	CD43 +; CD45 +
T-ALCL	-	+	-/+ (cCD3 +/-)	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	CD15 -/+; EMA +/-; CD43 -/+; CD45RO -/+; CD68 -; CD30 +; HLA-DR +
T-periferici «un- specified»	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+		HLA-DR +/-; CD25 +/-; CD30 +/-; EMA -/+

c: positività citoplasmatica; m: positività di membrana; (+): talora perdita; +/-: espressione variabile.

T-LbL: l. T-loblastico; T-LGCL: l. a grandi linfociti granulati T; T-PLL: l. prolinfocitico T; ATLL: Adult T lymphoma/leukemia; T-ALCL: l. a grandi cellule anaplastiche T.

Gouttenfangeas C., Bensussan A., Boumsell L., *Blood*, 1990, 75, 931-934.

Knowles D. M., *Lymphoblastic lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 715-747.

Nathwani B. N., Bryner R. K., Lincoln T. et al., *Classification of Non-Hodgkin's lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 555-601.

Sander C. A., Jaffe E. S., Gebhardt F. C. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1992, 16, 300-305.

CARLO MAURI

2.2. NEOPLASIE DERIVATE DA CELLULE LINFOIDI T-PERIFERICHE

I linfomi a proliferazione diffusa derivati da cellule T-periferiche post-timiche (*T-peripheral diffuse lymphomas*, *T-PDL*) comprendono vari sottotipi istocitologici (tab. IX). Alcuni presentano caratteristiche morfobiologiche e cli-

niche sufficientemente definite, sì da poterli considerare quali vere e proprie entità nosologiche: tali «*varianti specifiche*» dei T-PDL non sono frequenti e talune del tutto insolite. La maggior parte dei T-PDL costituisce tuttavia un gruppo di l. eterogeneo per morfologia, immunofenotipo, lesioni genetiche, in cui non si ravvisa alcuna costante caratteristica patognomonica (Chott et al., 1990) che consenta una soddisfacente subclassificazione in classi ben definite da precisi criteri diagnostici differenziali, tali da offrire accettabili valori di riproducibilità e rilevanti ricadute sotto l'aspetto nosografico e prognostico-terapeutico. Questi ultimi casi rientrano pertanto in un gruppo di «*unspecified lymphomas*» («l. non altrimenti specificabili», «di classe indeterminata»).

Con i limiti degli attuali mezzi di indagine di ordine citoimmunologico e di genetica molecolare disponibili per la diagnostica citologica delle sindromi linfoproliferative di linea T, certamente inferiori a quelli così fruttuosamente applicati allo studio dei l. di linea B, anche nella recente classificazione REAL è implicita l'ammissione che, all'infuori delle forme meglio caratterizzate («specifiche») non sia possibile procedere ad una ripartizione in sottogruppi dell'intera casistica dei T-PDL, se non sulla base di una *divisione per classi cito-dimensionali* (l. a cellule di media grandezza, l. a cellule miste medie e grandi, l. a grandi cellule). In larga parte i T-PDL «unspecified» corrispondono alla eterogenea «varietà pleomorfa» dei l. T-cellulari contemplata dalla UKC, che propone anche una suddivisione in rapporto al grado di malignità (a basso e ad alto grado). I T-PDL, sia del gruppo «specifico» che del «non specifico», sono ad ogni modo nettamente distinguibili dai l. derivati da precursori cellulari T.

Caratteri immunofenotipici dirimenti (Catovsky e Matutes, 1992) sono: a) nei l. derivati da precursori cellulari T la costante presenza della TdT, l'espressione di CD1a e CD7, la coespressione di CD4 e CD8, la negatività di mCD3 e — nelle forme più immature — di CD2; b) la presenza nei l. a cellule T-periferiche del comune fenotipo di cellule mature post-timiche (talora con deficiente espres-

TAB. IX. LINFOMI A CELLULE T-PERIFERICHE

- A. *Linfomi T-periferici non altrimenti specificabili («unspecified»)*
L. a cellule piccole, medie, grandi, miste
- B. *Linfomi T-periferici, istotipi «specifici»*
L. linfatica cronica T (T-CLL)
L. prolinfocitica T (T-PLL)
L. a grandi linfociti granulati (LGCL, T/NK)
Micosi fungoide/S. di Sézary (MF/SS)
L. epatosplenico a cellule T gamma-delta
L. sottocutaneo di tipo panniculitico a cellule T
L. a cellule linfoepitelioidi (L. di Lennert)
L. angioimmunoblastico a cellule T (AILD-like lymphoma)
L. angiocentrico (Granulomatosi linfomatoide; Lethal midline granulomatosis)
L. primitivo intestinale a cellule T (+/- associato ad enteropatia)
Linfoma/leucemia dell'adulto a cellule T (ATLL)
L. a grandi cellule anaplastiche CD30+ (ALCL-T o «null»)
L. a grandi cellule anaplastiche, Hodgkin-simile

LINFOMI

sione di antigeni), con costante negatività della TdT e di CD1a, nonché, di regola, con espressione di CD2, raramente di coespressione di CD4 e CD8, e con insolita positività di CD7 (v. tab. XII).

Come in tutti i linfomi di linea T, le reazioni citochimiche delle idrolasi acide mostrano intensa positività citoplasmatica polare paranucleare.

Bibliografia

- Catovsky D., Matutes E., *Leukemias of mature T cells*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1267-1279.
- Chott A., Augustin I., Wra F. et al., *Human Pathol.*, 1990, 21, 117.
- Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.

2.2.1. LINFOMI A CELLULE T-PERIFERICHE NON ALTRIMENTI SPECIFICABILI (T-PDL)

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Diffuse PDL*, *Diffuse mixed lymphocytic-histiocytic, Histiocytic lymphoma*. Lukes-Collins: *T-immunoblastic lymphoma*. UKC: *T-zone lymphoma*; *Lymphoepithelioid cell lymphoma*; *Pleomorphic, small, medium and large cell*; *T-immunoblastic lymphoma*. WF: *Diffuse small cleaved cell*; *Diffuse mixed small and large cell*; *Large immunoblastic (polymorphous or clear cell) lymphoma*. REALC: *Peripheral T-cell lymphomas, unspecified (T-PDL)* (*provisional cytologic categories: medium-sized cell, mixed medium and large cell, large cell, lymphoepithelioid cell*).

Caratteristiche istocitologiche

Per quanto attiene ai reperti istologici (fig. 29), nei linfonodi sono frequenti la sovversione dell'architettura linfonodale per proliferazione di tipo diffuso oppure il particolare interessamento delle sole aree paracorticali e interfollicolari (talora intrasinusale o sottocapsulare), le immagini di iperplasia venulare post-capillare ad endoteli alti e di fine iperplasia fibrillare argentofila. L'originaria descrizione di Lennert (1978) e di Suchi et al. (1987) del «*T zone lymphoma*» (attualmente inglobato dalla REALC tra i T-PDL «unspecified») segnala con particolare evidenza che il massiccio processo invasivo di cellule linfoidi T nelle aree paracorticali linfonodali è associato a prolungata conservazione di strutture follicolari, che in stadi iniziali di malattia sono anzi aumentate di numero ed attivate. In rari casi la crescita linfomatosa assume nella paracorticale dei l. un carattere nodulare più o meno appariscente (*variante nodulare del l. T-cellulare paracorticale*) (Macon et al., 1995). Tuttavia non

si osservano nelle sezioni istologiche centri di proliferazione, come nel l. a piccoli linfociti di linea B (B-CLL/SLL).

Nella milza la proliferazione linfomatosa predilige le aree T periarteriolari e tende a confluire in ampi noduli. Nel midollo osseo l'infiltrazione è di tipo diffuso o focalmente dispersa, raramente paratrabecolare; è talora associata a spiccata iperplasia fibrillare argentofila. Nella cute (Bernengo e Massobrio, 1990) l'infiltrazione colpisce elettivamente il derma (in aree periarteriolari e periannessiali) e può estendersi al sottocutaneo ed anzi in alcune forme l'aspetto «panniculitico» è peculiare; mancano di solito epidermotropismo e formazione di aggregati linfoidi intraepidermici (tipo Pautrier), caratteristici invece della micosi fungoide (MF). Nel tubo digerente (stomaco e tenue) l'infiltrazione linfomatosa può interessare la mucosa a tutto spessore ed anche la sottomucosa; l'apparato ghiandolare della mucosa è atrofico.

Nel midollo osseo e nella milza soprattutto, ma anche in altre aree, l'infiltrazione linfomatosa può accompagnarsi ad eritrofagocitosi, ad opera di macrofagi non neoplastici.

Caratteristiche citologiche dei T-PDL (*T-Peripheral Diffuse Lymphoma*) «unspecified» sono l'eterogeneità morfologica dei linfociti neoplastici, la frequente progressione da forme a cellule piccole in quadri a cellule miste o solo grandi, la commistione delle dominanti cellule linfomatose con cellule non neoplastiche (istiociti «epitelioidi», granulociti neutrofili ed eosinofili, plasmacellule).

I T-PDL solo raramente sono caratterizzati dalla presenza di linfociti piccoli o di grandezza intermedia: sono cellule a scarso citoplasma debolmente basofilo, con nuclei a contorni un po' irregolari (non incisi), cromatina addensata e nucleoli piccoli e poco appariscenti; scarse le mitosi (tranne eccezioni). Una variante di T-PDL a piccole cellule (*HTLV-I negativa*) riguarda forme a piccoli linfociti con scarso citoplasma debolmente basofilo, nucleo pleomorfo, proliferazione diffusa e monotona, non epidermotropi.

Le forme di T-PDL di tipo cellulare misto sono caratterizzate da una doppia popolazione cellulare, una di linfociti di taglia piccola o intermedia, l'altra (circa il 20-30%) di cellule grandi con citoplasma più ampio e di variabile basofilia, nuclei a struttura più complessa e due o più distinti nucleoli, si da ricordare talora le cellule H-RS della malattia di Hodgkin. Tali cellule possono essere disperse tra i linfociti piccoli oppure essere aggregate in clusters. La diagnosi differenziale va posta, in particolare, nei con-

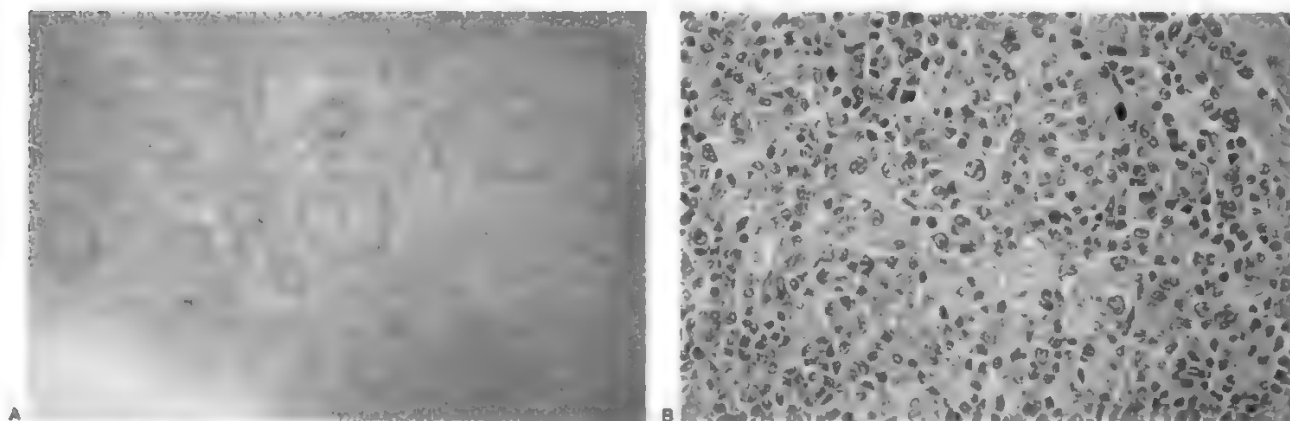


Fig. 29. L. a cellule T periferiche «unspecified». Linfonodi. A) Visione d'insieme; colorazione E.E. Proliferazione linfomatosa paracorticale con notevole risparmio dei follicoli (quadro di «T-zone lymphoma» secondo Lennert). B) Particolari citologici della paracorticale, evidenziati dalla colorazione con enzima. Polimorfismo cellulare.

fronti del «T cell-rich, B cell lymphoma» e della malattia di Hodgkin.

I T-PDL a grandi cellule mostrano larga preponderanza o esclusiva presenza di elementi cellulari di ampie dimensioni, con spettro di espressioni morfologiche notevolmente largo: citoplasma espanso ora debolmente ora intensamente basofilo od anche anfofilo; nucleo spesso a contorni relativamente regolari, rotondo, con cromatina dispersa, più nucleoli ampi e prominenti (aspetto di tipo immunoblastico), ma talora più bizzarro, iperlobato, polipoide o del tutto pleomorfo (Reed-Sternberg-simile). Alle grandi cellule linfomatose possono essere frammisti piccole cellule linfoidi atipiche, plasmacellule, granulociti eosinofili, cellule di tipo istio-macrofagico; la proliferazione venulare è di grado variabile. Il l. a grandi cellule T può insorgere quale processo *de novo* oppure quale trasformazione di altri tipi di l. a cellule T.

Sia nei linfonodi che in aree extralinfonodali si può osservare una proliferazione di grandi cellule anaplastiche, che generalmente sono di derivazione linfocitaria T (v. col. **3299), benché forme morfologicamente analoghe possano rivelare natura B (v. col. **3262).

Immunofenotipo e genetica molecolare

Le cellule dei T-linfomi periferici sono TdT e CD1 negative, assai spesso mostrano perdita di uno o più markers cellulari pan-T (in ordine decrescente di frequenza CD7, CD5, CD3, CD2). In assenza di ogni antigene T-associato è necessario effettuare lo studio del riarrangiamento dei geni *TCR* e delle Ig per accertare la natura T o B delle cellule. Quasi tutti i casi di T-PDL mostrano riarrangiamento clonale dei geni *TCR* γ o β , talora del δ (Knowles 1989). Talora però mancano anche segni di riarrangiamento di geni *TCR* β o γ , il che non esclude la natura T della proliferazione maligna. I casi CD4+ prevalgono su quelli CD8+, ma ambedue possono essere assenti oppure si può osservare coespressione CD4+CD8+. Casi con fenotipo CD4+/CD8- esprimono spesso il ligando CD40L (Carbone *et al.*, 1995). Frequente è l'espressione di antigeni di attivazione.

Citogenetica

Sono frequenti le alterazioni cromosomiche interessanti i cromosomi 14 e 7, sedi del locus *TCR α* (14q11.2) e rispettivamente (17q34-q36), ma ancora poco è noto circa il ruolo di possibili traslocazioni nella linfomagenesi di queste forme (Pinkus e Said, 1992).

Riferimenti

- Beljaards R. C., Meijer C. J. L. M., Scheffer E. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989, **135**, 1169-1178.
 Bernengo M. G., Massobrio R., *Cutaneous manifestations in T-zone lymphoma*, in Van Vloten W. A. ed., *Current problems in dermatology*, Karger, Basel, 1990, **19**, 161-166.
 Carbone A., Gioghi A., Gruss H. J., Pinto A., *Am. J. Pathol.*, 1995, **147**, 912.
 Chott A., Augustin L., Wra F. *et al.*, *Human Pathol.*, 1990, **21**, 1117.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Knowles D. M., *Am. J. Pathol.*, 1989, **134**, 761-785.
 Lennert K., *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*, 1978, Springer, Berlin.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin lymphomas*, 1992, 2 ediz., Springer, Berlin, pp. 165-261.
 Macon W. R., Williams M. E., Greer J. P., Cousar J. B., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 297-303.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Suchi T., Lennert K., Tu H. Y. *et al.*, *J. Clin. Pathol.*, 1987, **40**, 995-1015.

Linfoma a cellule linfo-epitelioidi

Il l. a cellule linfo-epitelioidi (linfoma di Lennert) è considerato nella classificazione REAL come una delle possibili varianti citologiche dei T-PDL «unspecified»: figura però come entità a sé stante nella Updated Kiel Classification (UKC) ed è largamente menzionato in letteratura, per cui è opportuno farne cenno in ap-

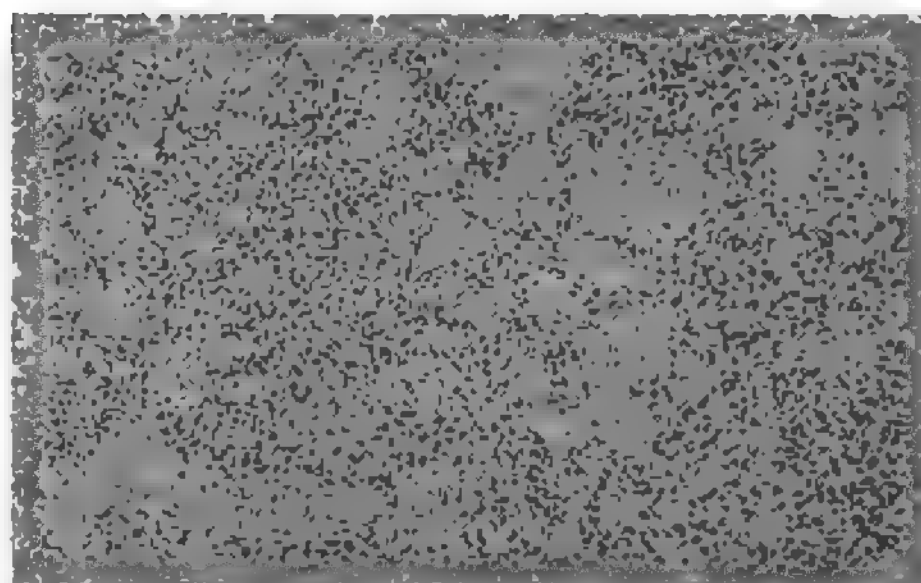


Fig. 30. L. a cellule T-periferiche ricco di cellule epitelioidi (l. linfo-epitelioidi di Lennert). Linfonodo, colorazione E.F.

pendice ai T-PDL «unspecified». È un linfoma a cellule T periferiche mature, la cui fondamentale caratteristica istocitologica è la commistione di elementi linfoidi neoplastici e di cellule epitelioidi non neoplastiche (fig. 30).

Reperti citologici

I linfociti neoplastici presentano ampio range dimensionale (cellule piccole, medie, grandi) e forme intermedie tra l'una e l'altra classe. Il citoplasma è piuttosto scarso, il nucleo rotondeggiante, con membrana nucleare irregolare e pieghettata («squiggly») nelle forme più piccole e medie, con cromatina addensata. Non mancano però mai, in varia quantità, cellule di taglia maggiore con citoplasma anfofilo, nucleo rotondo od ovale con singolo grosso nucleolo centrale o con più nucleoli piccoli, a morfologia anche francamente immunoblastica. Forme multinucleate Sternberg-simili non sono rare. La quantità di tali linfociti «trasformati» aumenta con il progredire della malattia fino a predominare (Klein *et al.*, 1977). Molte mitosi sono presenti nei grandi immunoblasti, ma sono insolite nei linfociti piccoli.

Gli elementi linfoidi neoplastici presentano fenotipo T periferico maturo ed esprimono in genere CD4+. Nella maggior parte dei casi è stato reperito riarrangiamento del gene di *TCR* β . È possibile osservare anomalie del cromosoma 3.

Il quadro citologico del l. di Lennert è reso particolarmente composito dalla presenza tra i T-linfociti neoplastici di linfociti polyclonali normali di linea sia T che B, di plasmacellule, di granulociti eosinofili, e soprattutto di numerose grandi cellule epitelioidi, caratterizzate da abbondante citoplasma leggermente eosinofilo, da nucleo ovale o reniforme con rete cromatinica fine e distinti nucleoli. Le cellule epitelioidi tendono ad aggregarsi in bande o clusters a limiti mal definiti, e possono dar luogo a cellule giganti tipo Langhans, il che accentua l'aspetto «granulomatoso» del processo. Si ritiene che nella patogenesi dell'iperplasia epitelioidi svolgano un ruolo importante alcune interleuchine (soprattutto IL-2) dismesse sia dalle cellule neoplastiche che dalle epitelioidi (Shimizu *et al.*, 1988).

Reperti istologici

Nei linfonodi coinvolti nel processo linfomatoso l'architettura del parenchima è sovvertita dalla diffusa infiltrazione linfoide ed epitelioidi: i seni linfatici sono oblitterati, capsula e tessuti perilinfonodali sono invasi, i follicoli in genere mancano del tutto, l'iperplasia venulare è scarsa. Nella milza si notano numerosi noduli tumorali di varia ampiezza, originati nei manicotti linfoidi periarteriolari e nelle aree marginali dei follicoli malpighiani. Le vie aeree superiori ed in particolare la tonsilla palatina sono spesso sede di l. di Lennert, anche in forma primaria (Isaacson e Norton, 1994).

Diagnosi differenziale

Il quadro isto-citologico del l. di Lennert richiama notevolmente quello della malattia di Hodgkin, sottotipo cellularità mista, e so-

prattutto la sua variante ad alto contenuto di cellule epitelioide (Patsouris *et al.*, 1989), ma anche alcuni l. a cellule B altamente maligni, con rilevanti reazioni di cellule epitelioide benigne, nonché il l. B-linfoplasmacitoide ed il l. angioimmunoblastico a cellule T (Lennert e Feller, 1992) e pure linfadenopatie non neoplastiche granulomatoze, immunoreattive, dermatopatiche.

Bibliografia

- Klein M. A., Jaffe R., Neimann R. S., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1977, **68**, 601-605.
 Isaacson P. G., Norton J. N., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, 2 ed., Springer, Berlin, pp. 178-196.
 Patsouris E., Noel H., Lennert K., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 341-350; *ibidem*, 1989, **13**, 1014-1022.
 Pincus G. S., Said W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Shimizu S., Takiguchi T., Sugai S. *et al.*, *Blood*, 1988, **71**, 196-203.

2.2.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE T. LEUCEMIA PROLINFOCITICA T

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Well differentiated lymphocytic (WDL); Poor differentiated lymphocytic (PDL)*. Lukes-Collins: *Small lymphocytic T, prolymphocytic*. UKC: *Lymphocytic T-cell CLL/PLL*. WF: *Small lymphocytic, c/w CLL; Diffuse small cleaved cell*. French-American-British (FAB): *T-prolymphocytic leukemia*. REALC: *T-cell chronic lymphocytic leukemia/T-prolymphocytic leukemia (T-CLL/T-PLL)*.

Per i rapporti tra leucemia linfatica cronica e leucemia prolinfocitica, rimandiamo alla trattazione delle corrispondenti forme a cellule B (coll. **3236-3239).

Reperti citologici

La *leucemia linfocitica cronica a cellule T (T-CLL: T-Cell Lymphocytic Leukemia)* è forse un'entità non esistente e i casi etichettati in passato come tale erano verosimilmente per lo più leucemie a grandi linfociti granulati; alcuni potrebbero essere assimilati alla insolita variante a piccole cellule della leucemia prolinfocitica T (v. oltre), altri alla *T-CLL a nucleo bozzuto (knobby type)* di Lennert e Feller (1992) (fig. 31). I casi descritti come T-CLL sono comunque citologicamente analoghi alla B-CLL, da cui differiscono solo per caratteri immunofenotipici e citochimici (che sono analoghi a quelli della T-PLL).

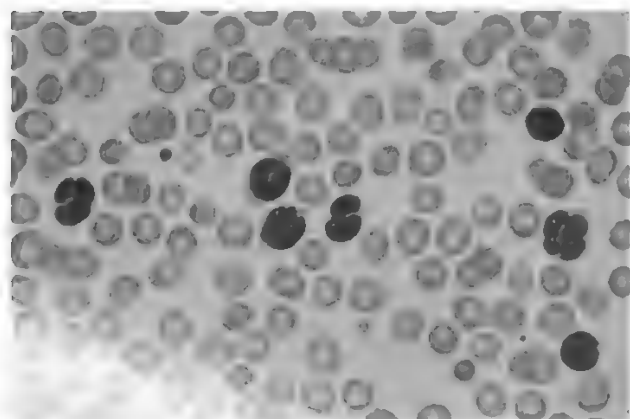


Fig. 31. L. linfatica cronica T (T-CLL), tipo a nucleo bozzuto, CD4+. Smplice periferico, colorazione MGG.

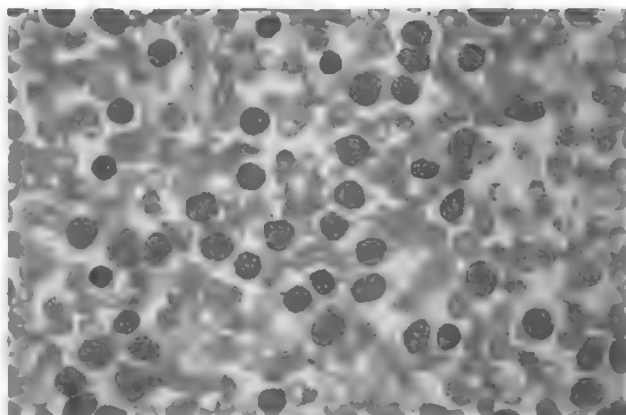


Fig. 32. L. prolinfocitica T (T-PLL). Linfonodo, apposizione, colorazione MGG.

In circa il 50% dei casi di *leucemia prolinfocitica T (T-PLL: T-Prolymphocytic Leukemia)* le cellule circolanti e quelle infiltranti gli organi non appaiono diverse dalle cellule della B-PLL (v. a suo luogo) (fig. 32). Nel 40% dei casi i T-prolinfociti sono più piccoli dei B, hanno citoplasma meno espanso e più intensamente basofilo, nucleo a contorni più irregolari ma raramente polilobati o profondamente incisi, nucleolo centrale ben stagliato. In altri casi ancora i linfociti sono notevolmente piccoli, con cromatina addensata, nucleolo poco appariscente in microscopia ottica ma ben apprezzabile in ME. Si parla in tal caso di «*variante a piccole cellule*» della T-PLL. Le caratteristiche morfologiche dei T-prolinfociti sono meglio apprezzabili negli strisci di sangue periferico che in quelli di midollo osseo.

Si ritiene che la *controparte cellulare normale* sia una cellula T periferica circolante.

Reperti citochimici

Le cellule di T-PLL appaiono ricche di enzimi lisosomiali e di idrolasi acide, in particolare di ANAE contenute nei *corpi di Gall*; questi reperti costituiscono criteri differenziali nei confronti della B-PLL.

Immunofenotipo

TdT e CD1a negativi; positività di CD2, CD3, CD5; nel 70% dei casi CD4 positivo con negatività di CD8 (nel 14% dei casi si osserva invece CD4-CD8+); forte espressione di CD7, debole o assente di CD25 e CD122 (recettore di *IL-2*) (v. tab. VIII).

Anomalie cromosomiche

Nel 63% dei casi si osserva inv14(q11; q32) con *breakpoints* in q11 o q32 (rispettivamente nel 13 e nel 6,5% dei casi). La rottura in 14q11 interessa i geni α e β del TCR. Nel 53% dei casi si nota trisomia 8q (Matutes *et al.*, 1991).

Reperti istologici

La proliferazione T-linfocitaria nei *linfonodi* è di tipo diffuso, non dissimile da quanto descritto per la B-PLL; ha esordio nelle aree paracorticali. Pure nella *milza* la proliferazione è diffusa, con preminente interessamento della polpa rossa. Il *midollo osseo* mostra spiccata e diffusa infiltrazione degli spazi intra-trabecolari e non dei para-trabecolari; raramente assume forma nodulare. È costante l'aumento delle fibre reticolari. L'infiltrazione della *cute*, nelle chiazze eritrodermiche, non palesa alcun epidermotropismo; le lesioni nodulari mostrano accumuli linfoidi attorno ai vasi e agli annessi cutanei.

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
 Catovsky D., Matutes E., *Leukemias of mature T cells*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1267-1279.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Matutes E., Brito-Babapulle V., Swanbury J. et al., *Blood*, 1991, **78**, 3269.

2.2.3. LEUCEMIA A GRANDI LINFOCITI GRANULATI**Denominazioni equivalenti**

Rappaport: *SL.L., CLL.* Lukes-Collins: *Small lymphocyte, T.* UKC: *T-CLL.* WF: *Small lymphocytic, consistent with CLL.* FAB: *T-CLL, T-LGL.* Altri: *Ty lymphoproliferative disease; T-CLL CD8+; T-cell lymphocytosis.* REALC: *Large granular lymphocyte leukemia, T-cell and NK-cell lines.*

L'esistenza di una condizione di linfocitosi a cellule T CD8+, associata a spiccata neutropenia, è nota da un ventennio (Brouet et al., 1975), ma solo in tempi recenti si è ottenuta la dimostrazione che nella maggior parte dei casi si tratta di una proliferazione clonale (Loughran, 1993).

Reperti citologici

I grandi linfociti granulati (LGL: *Large Granular Lymphocyte*) leucemici appaiono nel sangue periferico (fig. 33) quali cellule con abbondante citoplasma basofilo contenente tre o più granuli azurofili, fini o grossolani e prominenti; raramente si osservano cellule agranulate. Il nucleo è eccentrico, rotondo o ovale o con contorni leggermente incisi, a cromatina moderatamente addensata, nucleoli poco evidenti o assenti. La morfologia di tali elementi è analoga a quella dei LGL reattivi osservabili in soggetti affetti da mononucleosi infettiva o da altre virosi.

L'esame in *microscopia elettronica* documenta nel citoplasma dei LGL presenza di granuli elettrondensi circondati da una membrana, di vescicole, dell'apparato di Golgi. Nei granuli si possono evidenziare fascetti tubolari: tale anomalia manca tuttavia nei casi CD3 negativi con positività di antigeni NK (v. oltre), in cui si riscontra invece una sostanza amorfa (Litz e Brunning, 1993).

Per i reperti citochimici v. tab. VI.

I LGL leucemici mostrano in genere un *fenotipo* di cellule mature T post-timiche (v. tab. VIII): TCR $\alpha\beta$ riarrangiato. Tale quadro configura il *fenotipo comune T* della neoplasia. Sia pure non

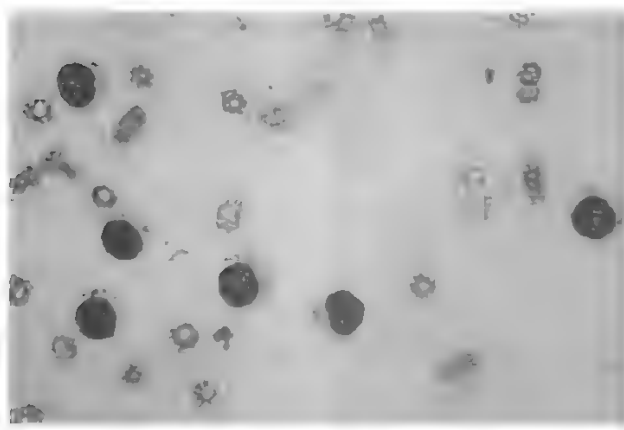


Fig. 33. L. a grandi linfociti granulati, tipo comune T (CD8+). Sangue periferico, colorazione MGG.

frequentemente si possono osservare profili immunofenotipici diversi dal «comune», con positività o negatività variamente combinate di CD4, CD8, CD11b, CD16, CD56/57. Il più insolito ma interessante di questi fenotipi comporta CD3-, CD4-, CD8-, CD11b+(-), CD16+, CD56+, CD57-(+), TCR in configurazione germline: è un assetto compatibile con il *tipo linfocitario NK* (Catovsky e Matutes, 1992). Si riscontra più frequentemente in Giappone che in Occidente.

Singoli reperti citogenetici riguardano anomalie clonali con alterazioni strutturali dei cromosomi 6, 11 (delezione del braccio lungo), 4, 8, 14.

Reperti istopatologici

L'infiltrazione del midollo osseo è in genere di tipo interstiziale disseminato, con possibili aggregati focali; è sempre meno massiccia che nella B-CLL. Nella milza si nota infiltrazione leucemica nella polpa rossa, con permeazione dei seni. Nel fegato i sinusoidi sono infiltrati dai LGL leucemici (Agnarsson et al., 1989).

Conclusioni

La leucemia a LGL è pertanto un *processo fenotipicamente eterogeneo*. I LGL leucemici appaiono derivati per la maggior parte da un clone di linfociti T periferici, che esplicano per lo più funzione soppressiva ma non NK e mostrano riarrangiamento dei geni TCR $\alpha\beta$; una minoranza di casi deriva invece da cellule NK, con geni TCR in configurazione germline. È da notare che mentre la clonalità della proliferazione dei LGL di tipo T comune è accertata, nella maggior parte dei casi di leucemia a LGL di natura NK la clonalità non appare documentata (Pellicci et al., 1987). Il ruolo svolto dai LGL nella soppressione della granulocitopoiesi non è ancora del tutto provato: appare tuttavia evidente una loro capacità inibitoria sulle colonie CFU-GM (Catovsky e Foa, 1990).

Bibliografia

- Agnarsson B., Loughran T., Starckebaum G., Kadin M., *Human Pathol.*, 1989, **20**, 643.
 Brouet J. C., Flandrin G., Sasportes M. et al., *Lancet*, 1975, **11**, 890.
 Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
 Catovsky D., Matutes E., *Leukemias of mature T cells*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1267-1279.
 Litz C. E., Brunning R. D., *Chronic lymphoproliferative disorders: classification and diagnosis*, in Rozman C. ed., *Chronic lymphocytic leukaemia and related disorders*, in *Baillière's Clinical Haematology*, 1993, **6**, 767.
 Loughran T. P., *Blood*, 1993, **82**, 1.
 Pellicci P., Allavena P., Alessandro R., *Blood*, 1987, **70**, 1500.

2.2.4. MICOSI FUNGOIDE E SINDROME DI SÉZARY**Denominazioni equivalenti**

Rappaport: *Mycosis fungoides/Sézary syndrome*. Lukes-Collins: *Cerebriform T.* UKC: *Small cell, cerebriform.* WF: *Mycosis fungoides.* REALC: *Mycosis fungoides/Sézary syndrome.*

Introduzione

La micosi fungoide (MF; v. MICOSI FUNGOIDE, IX, 1168-1179) e la sindrome di Sézary (SS; v. SÉZARY, SINDROME DI, XIV, 117-119) che ne è l'espressione leucemica, sono le due principali entità anatomo-cliniche tra i *L. cutanei a cellule di linea T* (CTCL), di cui in più modi è stata comprovata la mono/oligoclonalità.

La maggior parte dei L. a cellule T può presentare localizzazioni cutanee in corso di malattia (*L. cutanei secondari*). Con minore frequenza l'esordio clinico è caratterizzato da localizzazioni esclusivamente o preminentemente cutanee ed in altri casi ancora, in genere rari, il L. è costantemente e permanentemente circoscritto alla cute (*L. cutanei primitivi*).

vi). Queste forme, diverse dalla MF/SS ma spesso da prendere in considerazione nella sua diagnosi differenziale, saranno illustrate nel capitolo dedicato ai quadri clinici della micosi fungoide e dei l. cutanei in genere (coll. **3401-3407), assieme alla classificazione generale dei l. cutanei primitivi e secondari di linea B e T (v. sotto tab. XLIV). Illustreremo pertanto in questa sede solo il quadro istiocitologico della MF/SS.

Reperti citologici

Le cellule caratterizzanti la MF/SS sono linfociti T periferici maturi post-timici con morfologia particolare. Sono denominate *cellule di Lutzner* nella MF (fig. 34) e *cellule di Sézary* nella SS (fig. 36). In prevalenza sono di piccole dimensioni, hanno scarso citoplasma debolmente basofilo agranulato, nucleo a contorni irregolari, inciso o cerebriforme, con cromatina addensata. Una bassa percentuale di cellule ha dimensioni maggiori, citoplasma più espanso, nucleo a morfologia simile a quello delle cellule più piccole. Presentano tutte intensa positività citoplasmatica focale (paranucleare) alla *reazione citochimica* delle idrolasi acide (fosfatasi acida, ANAE, etc.). L'attività proliferativa è bassa.

Immunofenotipo

Le cellule linfomatose della MF esprimono antigeni associati alla linea T (v. sopra tab. VIII); sono quasi sempre CD4+, raramente si osservano casi CD1+, CD4-/CD8-, oppure CD4+/CD8+. È stato notato che il profilo immunofenotipico più comune viene espresso nelle fasi iniziali o intermedie dello sviluppo del processo linfomatoso, prima che si sviluppino masse cutanee «tumorali» o vengano coinvolti linfonodi. Nelle fasi più avanzate uno o due antigeni pan-T vengono spesso a mancare e la perdita di antigeni pan-T può riguardare esclusivamente le cellule infiltranti l'epidermide (Michie *et al.*, 1989). Di recente è stato osservato che nella SS le cellule infiltranti il derma esprimono l'integrina VLA-3 mentre quelle circolanti presentano la molecola LFA-1 (CD11a/CD18+) (Savoia *et al.*, 1992). Talora le modificazioni dell'immunofenotipo si associano alla trasformazione della MF in un l. a grandi cellule CD30 (Ki-1) positive (Cerroni *et al.*, 1990). Una variante di MF è il *linfoma a cellule cerebriformi con spiccato epidermotropismo pagetoide*, caratterizzato dal particolare fenotipo CD8+ o gamma-delta (Berti *et al.*, 1991).

Genetica molecolare e citogenetica

È costante il riarrangiamento clonale di geni TCR. Sono state talora documentate condizioni di aneuploidia o alterazioni strutturali di cromosomi prive di particolare significato.

Reperti istologici

La cute offre reperti istologici in parte diversi nei vari tipi clinici di lesioni, propri della MF. Le placche ben sviluppate mostrano spiccata infiltrazione di cellule di Lutzner nel derma superficiale e papillare, con formazione di piccoli aggregati di cellule linfomatose in spazi epidermolitici («*ascessi di Darier-Pautrier*») (fig. 34). Nell'infiltrato si notano spesso anche granulociti eosinofili, plasmacellule, macrofagi, cellule reticolari interdigitate e cellule di Langerhans (S-100 e CD1a positive). Il derma profondo ed il sottocutaneo sono indenni. Le lesioni a chiazze eritematose presentano assai spesso infiltrazione linfoide del derma superficiale, in sede prevalentemente perivasale, con elementi linfoidi entro l'epidermide non spongiosa ma con scarsa tendenza all'aggregazione. Le lesioni «*tumorali*» avanzate sono costituite da un denso infiltrato di cellule linfomatose nel derma superficiale e profondo e nel sottocutaneo; sono risparmiati in parte l'epidermide ed il derma papillare («*Grenz-Zone*») (fig. 35). Talora in seno all'infiltrato dermico si notano granulomi tuberculoidi o singole cellule giganti plurinucleate («*variante granulomatosa della MF*») (Le Boit *et al.*, 1988). Le lesioni *eritrodermiche* della MF/SS sono talvolta del tutto aspecifiche e limitate ad aspetti di dermatite spongiosa, altre volte mostrano il quadro infiltrativo tipico della MF.

I *linfonodi* sono ingranditi nel 40-70% dei casi, specie nelle stazioni satelliti di lesioni cutanee. Vi si possono osservare *alterazioni di tipo diverso*: a) assai spesso reperti di «*linfadenopatia dermatopatica*», caratterizzata da grande sviluppo dell'area paracorticale infiltrata da linfociti, plasmacellule, talora eosinofili, macrofagi contenenti melanina oppure lipidi, e cellule reticolari interdigitate; numerose le mitosi; sono presenti follicoli reattivi e cordoni midollari compressi dall'espansione dell'area corticale; frammenti al tessuto reattivo si possono reperire elementi linfoidi con nucleo convoluto ipercromico; b) aspetti aspecifici di *iper-*

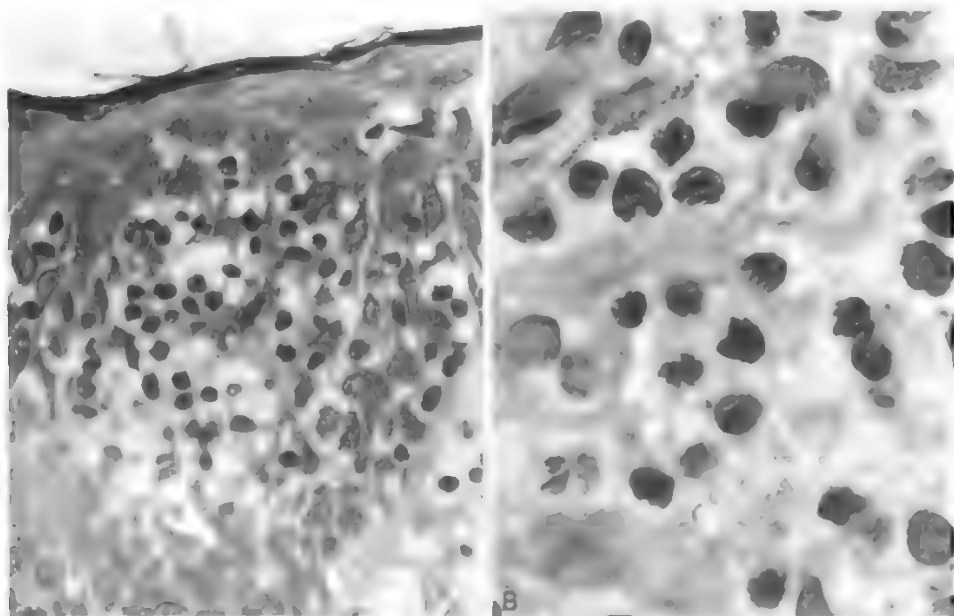


Fig. 34. Micosi fungoide. A) Epidermotropismo, «*ascesso*» di Darier-Pautrier. B) Morfologia delle cellule di Lutzner.

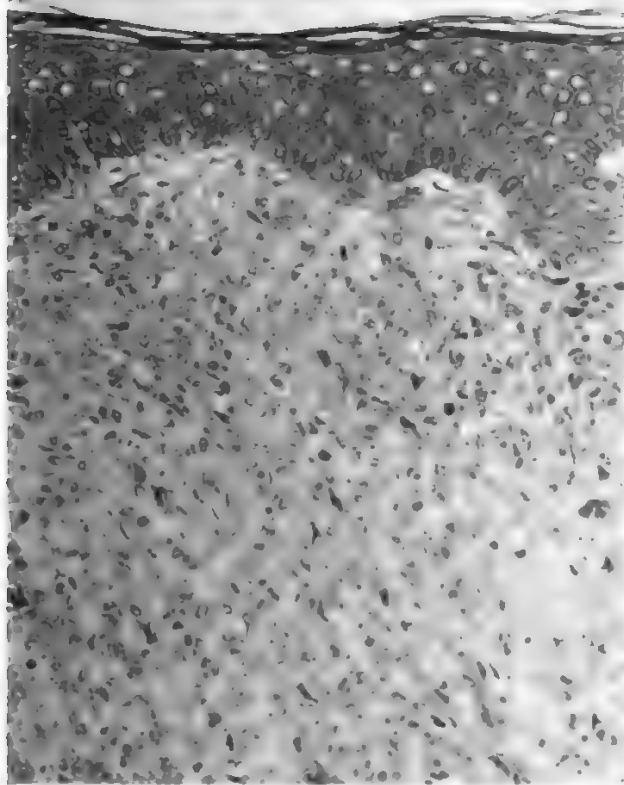


Fig. 35. Micosi fungoide, forma «tumorale». Cute. Densa infiltrazione di cellule di Lutzner nel derma superficiale e profondo, con risparmio dell'epidermide e del derma papillare (*Grenz-Zone*).

plasia follicolare reattiva, iperplasia sinusale, fibrosi; c) parziale o totale sconvolgimento della struttura linfonodale con forte espansione delle aree paracorticali per diffusa

infiltrazione di tipiche cellule di Lutzner (figg. 34 e 35), talora commiste a grandi cellule linfoidi (Wood, 1992). Clendenning e Rappaport (1979) hanno proposto un «grading system» dei vari quadri istopatologici linfonodali osservabili nella MF/SS, da LN-1 a LN-4.

Il midollo osseo è di solito indenne da infiltrazione di cellule di Lutzner (reperibile solo nel 7% dei casi), ma si possono osservare aggregati nodulari di piccole cellule linfoidi atipiche; cellule linfomatose con particolare struttura nucleare (ben apprezzabile soprattutto in microscopia elettronica) (fig. 36) sono in genere più frequentemente osservabili nella forma leucemica. Nel fegato sono frequenti i noduli linfomatosi in aree portali; nella forma leucemica (SS) si reperiscono cellule di Lutzner nei sinusoidi (fig. 36). Milza e polmone mostrano aree di infiltrazione linfomatosa in circa il 50% dei casi di SS autopsiati.

La diagnosi differenziale istopatologica va posta nei confronti di altri l. cutanei, di vari disordini linfoproliferativi interessanti anche la cute, talora del l. linfoblastico T con manifestazioni cutanee, ma pure di forme «pseudolinfomatose» cutanee di vario tipo e di numerosi quadri di dermatite spongiotica e psoriasiformi (v. sotto *Clinica*, coll. **3404-3407).

Bibliografia

- Berti E., Cerri A., Cavicchini S. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 1991, **96**, 718-723.
 Catovsky D., Foa R., *The Lymphoid Leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
 Cerroni L., Hodl S., Rieger E. et al., *J. Cutan. Pathol.*, 1990, **17**, 290.
 Clendenning W. E., Rappaport H., *Cancer Treat. Rep.*, 1979, **63**, 719-724.
 Davis T., Morton C., Miller-Cassman R. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 1115.
 Le Boit P. E., Zackheim H. S., White C. R., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 83-95.
 Michie S. A., Abel E. A., Hoppe R. T. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 1989, **93**, 116-120.
 Savoia P., Novelli M., Fierro M. T. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 1992, **99**, 151-159.
 Wood G. S., *Benign and malignant cutaneous lymphoproliferative disorders, including mycosis fungoides*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 917-952.

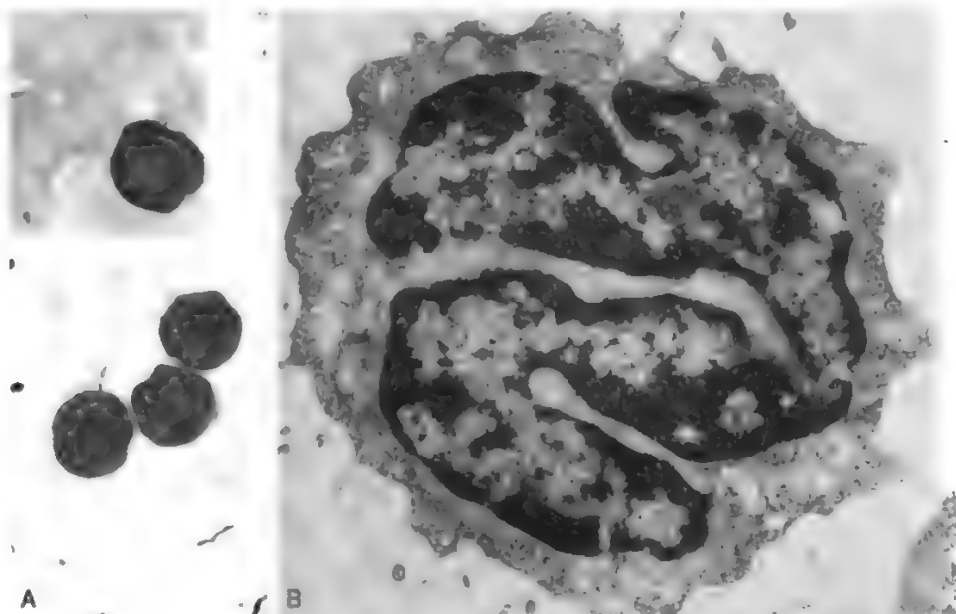


Fig. 36. Sindrome di Sézary. Sangue periferico, colorazione MGG. A) Linfocitosi a cellule linfomatose tipo Sézary. B) Ultrastruttura di una cellula di Sézary. Caratteristica morfologia del nucleo.

2.2.5. LINFOMA EPATOSPLENICO A CELLULE T GAMMA-DELTA

Il linfoma a cellule T $\gamma\delta$ è un raro processo proliferativo clonale a cellule T-periferiche, descritto da Kadin *et al.* (1981) e da Gaulard *et al.* (1990).

Reperti citologici

Dal punto di vista citologico il L a cellule T gamma-delta è caratterizzato da cellule linfoidi monomorfe di media grandezza, con ampio citoplasma debolmente basofilo e privo di granuli azurofili, nucleo ovale o inciso, talora a contorni più spiccatamente irregolari; la cromatina nucleare è addensata, i nucleoli sono poco appariscenti. L'attività mitotica è scarsa.

Le reazioni citochimiche danno nelle cellule linfomatose reperti positivi per la fosfatasi acida (a topografia focale paranucleare); assente l'attività esterasica non specifica.

Il fenotipo è costantemente quello T deficiente. Tutte le cellule esprimono gli antigeni CD2, CD3 e formano rosette con gli eritrociti di montone. Sono assenti CD4, CD8, β F1/WT31 e frequentemente anche CD7 e CD5; negativi (ma con eccezioni) gli antigeni CD16 e CD56, marker associati alle cellule NK. I geni IgH sono disposti in configurazione *germline*. È espresso l'eterodimero TCR $\gamma\delta$. È da notare che il TCR $\gamma\delta$ (TCR1) è di norma presente solo in una piccola subpopolazione linfocitaria T rinvenibile in organi linfoidi centrali e periferici, nel sangue circolante, e soprattutto in sede intraepiteliale nella cute e nella mucosa intestinale (Inghirami *et al.*, 1990).

Caratteristica citogenetica di questo linfoma è la presenza di un isocromosoma 7q.

Reperti istologici

Le cellule linfomatose infiltrano il derma, talora — e in maniera preminente — il tessuto sottocutaneo, con spiccato tropismo per le strutture vasali (che avvolgono a manicotto) ed epidermotropismo (Avinoach *et al.*, 1990). Nella milza, sempre molto ingrandita, i cordoni ed in parte i seni della polpa rossa sono infiltrati diffusamente dalle cellule linfomatose; la polpa bianca è atrofica. Nel fegato le cellule linfomatose mostrano infiltrazione intrasinusoidale, con dilatazione dei sinusoidi e fibrosi perisinusoidale; modesta o assente l'infiltrazione degli spazi portal. Nei linfonodi, anche se non ingranditi, è frequente reperire cospicua infiltrazione linfomatosa delle aree paracorticali, meno rilevante nei cordoni midollari e nei seni. Il midollo osseo è ipercellulare e mostra minima infiltrazione dei sinusoidi da parte delle cellule linfomatose. Può essere presente eritrofagocitosi ad opera delle cellule neoplastiche (soprattutto nella milza e nel midollo osseo).

Bibliografia

- Avinoach I., Halevy S., Argov S., Sacks M., *Am. J. Dermatopathol.*, 1994, 16, 426-433.
Gaulard P., Bourquelot P., Kanavaros P. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1990, 137, 617-628.
Inghirami G. I., Zhu B. Y., Chess L., Knowles D. M., *Am. J. Pathol.*, 1990, 36, 357-367.
Kadin M. E., Kamoun M., Lamberg J., *N. Engl. J. Med.*, 1981, 304, 648-553.

2.2.6. LINFOMA SOTTOCUTANEO DI TIPO PANNICULITICO A CELLULE T

È un raro processo linfoproliferativo clonale a cellule T-periferiche, con localizzazione primaria esclusivamente sottocutanea associata a sindrome eritrofagica; è spesso aggressivo con evoluzione infausta (v. sotto col. **3408).

Istocitologia

L'esame istocitologico dei noduli sottocutanei mette in evidenza un processo simil-panniculitico sostenuto da infiltrazione di cellule linfoidi disseminate tra gli adipociti del tessuto sottocutaneo e tendenti a raggrupparsi in filoni. Si nota talora estensione degli infiltrati nel derma papillare con forma di noduli; eccezionalmente è coinvolto il derma papillare con presenza di singole cellule in sede intraepidermica. Costante è il reperto di aree di necrosi nel tessuto adiposo e nel tessuto connettivale; frequente quello di granulomi con cellule giganti plurinucleate.

L'infiltrato neoplastico non è angiocentrico né angiodistruttivo e non si osserva iperplasia venulare come in altri linfomi a cellule T.

Gli elementi linfoidi infiltranti la cute sono cellule atipiche, in taluni casi di piccole dimensioni, commiste in varia proporzione a cellule grandi; in altri casi si rinvencono solo cellule di grandi dimensioni, immunoblasto-simili. I nuclei sono irregolari ed ipercromici sia nelle cellule piccole che nelle grandi, con cromatina fortemente addensata; sono talora forniti di nucleoli basofili; frequente è la carioressi; numerose sono le mitosi. Il citoplasma, agranulato, è scarso o moderatamente espanso. Sono talora numerose le plasmacellule; gli eosinofili sono rari o mancano del tutto. Alle cellule neoplastiche sono frammisti elementi monocito-macrofagici («istiociti») di natura benigna, con citoplasma schiumoso, in attività eritrofagica. I macrofagi non tendono a formare cluster ma sono più numerosi attorno alle aree di liponecrosi. Si rinvencono anche in organi (midollo osseo, linfonodi, milza, fegato, polmone) indenni da disseminazione linfomatosa.

Il meccanismo della eritrofagocitosi è oscuro. Poiché i linfociti neoplastici non fagocitano direttamente le emazie, si presume che le cellule linfomatose secernano il «phagocytosis inducing factor» (PIF) isolato da Simrell *et al.* (1985).

Genetica

Il fenotipo delle cellule linfomatose è quello proprio dei linfociti T periferici maturi: quasi sempre vi è CD4+, i casi CD8+ sono rari; si può osservare perdita di antigeni pan-T, soprattutto di CD5 o CD7. CD30 è negativo. I macrofagi mostrano reperti normali, KP-1+, lisozima positivo.

Il genotipo molecolare è caratterizzato da riarrangiamento del gene TCR β .

Bibliografia

- Gonzalez C. L., Medeiros L. J., Brazier R. M., Jaffe E. S., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1991, 15, 17-27.
Simrell C. K., Margolick J. B., Crabtree G. R. *et al.*, *Blood*, 1985, 65, 1469-1476.

2.2.7. LINFOMA ANGIOIMMUNOBLASTICO

Denominazioni equivalenti

Rappaport: non menzionato (*Diffuse mixed lymphocytic-histiocytic; Histiocytic*). Lukes-Collins: *Immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma*. UKC: *Angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteidemia*. WF: non menzionato (*Diffuse mixed small and large cell; Diffuse large cell; Large cell immunoblastic*). REALC: *Angioimmunoblastic T-cell lymphoma*.

Introduzione

Un processo linfoproliferativo associato a disordini immunologici è stato descritto con denominazioni diverse: sarcomatosi diffusa con differenziazione plasmacitica (Flandrin *et al.*, 1972), sindrome immunoproliferativa cronica pluripotenziale (Westerhausen e Orhlet, 1972), linfogranulomatosi X (LgX: *Lymphogranulomatosis X*) (Lennert, 1973), malattia immunodisplastica (Suchi, 1974), linfadenopatia immunoblastica (IBL: *ImmunoBlastic Lymphadenopathy*) (Lukes e Findle, 1975), linfadenopatia angioimmunoblastica con disproteidemia (AILD: *Angio Immunoblastic Lymphadenopathy with Dysproteidemia*) (Frizzera *et al.*, 1975). LgX, IBL e AILD presentano quadri istologici simili e sono probabilmente una sola entità nosologica (Frizzera, 1992).

Spiccate analogie si riscontrano fra le predette sindromi linfoproliferative e un particolare l. a cellule T (*AIL-like T cell lymphoma*) descritto da A.A. giapponesi (Watanabe *et al.*, 1986).

Sulla base dei reperti istocitologici, immunofenotipici, citogenetici e di genetica molecolare si è ritenuto possibile (Frizzera *et al.*, 1989) prospettare, nell'ambito delle predette linfopatie, l'esistenza di tre diverse categorie di disordini linfoproliferativi, integranti uno spettro continuo di eventi: ad un estremo si pongono i processi privi di evidenti

caratteristiche di proliferazione clonale (come il tipo AIL); all'altro estremo si collocano i processi tipicamente clonali (cui si riserva la denominazione di *AIL-like T cell lymphomas*); esiste un gruppo intermedio che non può essere inserito né nell'uno né nell'altro dei precedenti gruppi per l'esistenza di reperti discordanti con ciascuno di essi (*AIL-like dysplasias*).

AIL, LgX e IBL interessano di consueto più stazioni linfonodali superficiali e profonde, milza, fegato, anello di Waldeyer, polmoni, cute, midollo osseo, meningi ed altri organi ed apparati (v. sotto *Quadri clinici*, col. **3349).

Reperti istocitologici all'esordio

I reperti istologici linfonodali (in AIL, IBL, LgX) sono complessi (fig. 37, A): profonda alterazione dell'architettura parenchimale con frequenti lesioni regressive dei centri germinativi follicolari, associate a iperplasia delle cellule reticolari dendritiche e presenza di depositi di materiale amorfo eosinofilo («burned out germinal centers»); apparato sinusoidale solitamente ancora riconoscibile; spiccata iperplasia delle venule post-capillari con endotelio cubico, articolata in una rete anastomotica arborizzante. A ciò si aggiunge una componente infiltrativa polimorfa di piccoli linfociti B e T, di plasmacellule e di grandi elementi linfoidi «trasformati», veri e propri immunoblasti, nonché di granulociti neutrofili ed eosinofili, e di istiociti epiteloidi. L'infiltrato interessa l'intero parenchima (con risparmio parziale dei seni marginali), la capsula ed il tessuto adiposo perilinfonodale. Nella IBL (a differenza di AIL e LgX) la cellularità è tipicamente scarsa, le alterazioni regressive dei follicoli sono rare, nell'interstizio si reperisce costantemente materiale amorfo acidofilo PAS positivo originato da cellule degenerate, come dimostra la microscopia elettronica (Neiman *et al.*, 1978).

Le biopsie osteomidollari mostrano frequentemente nel tessuto midollare, in sede centrale piuttosto che para-lamellare, noduli co-

stituiti da elementi linfo-plasmacellulari e immunoblastici; si possono osservare focolai simil-granulomatosi, proliferazione vasale, note di fibrosi.

La natura del processo è stata a lungo controversa. Indubbiamente, almeno all'esordio, il quadro istologico non appare profondamente diverso da una spiccata reazione immunitaria iperergica, coinvolgente ambedue le linee linfocitarie T e B. Nella maggior parte dei casi prevalgono le cellule linfoidi con fenotipo T, in prevalenza CD4+, ma anche di tipo suppressor CD8+; in alcuni casi il fenotipo è B o «null». Si dimostra inoltre che nel 73% dei casi già all'esordio esistono clusters di elementi linfoidi con caratteristiche clonali. Tali cellule verosimilmente neoplastiche hanno varie dimensioni e nuclei rotondi o pleomorfi. La popolazione cellulare clonale è eterogenea: l'81% dei casi mostra riarrangiamento dei geni per la catena β di TCR, nel 7% si nota riarrangiamento dei geni per le catene immunoglobuliniche H o L, e nel 12% coesistono riarrangiamenti dei geni TCR β e IgH/L. Nell'83% dei casi di AIL/IBL si riscontrano anomalie cromosomiche, in parte a carattere clonale ed in parte non clonale (Kaneko *et al.*, 1988). Frequenti sono la trisomia dei cromosomi 3 e 5 e la duplicazione di X (Gödde-Salz *et al.*, 1987). Questi reperti sono simili a quelli reperibili in altre sindromi linfoproliferative T «reattive», ma diversi da quanto si osserva in linfomi T ad alto grado di malignità (Frizzera, 1992).

Si ritiene pertanto che AIL/IBL rappresentino condizioni linfoproliferative instabili, in cui esistono popolazioni linfoidi B e T non neoplastiche ma soggette ad uno stato di anormale attivazione cellulare, la cui esistenza è suggerita anche dagli alti livelli sierici del recettore di IL-2 e delle molecole solubili CD30 e CD8, di IFN- γ nonché dall'iperimmunoglobulinemia policlonale. Tali popolazioni linfoidi sono commiste a cloni emergenti multipli e non coordinati.

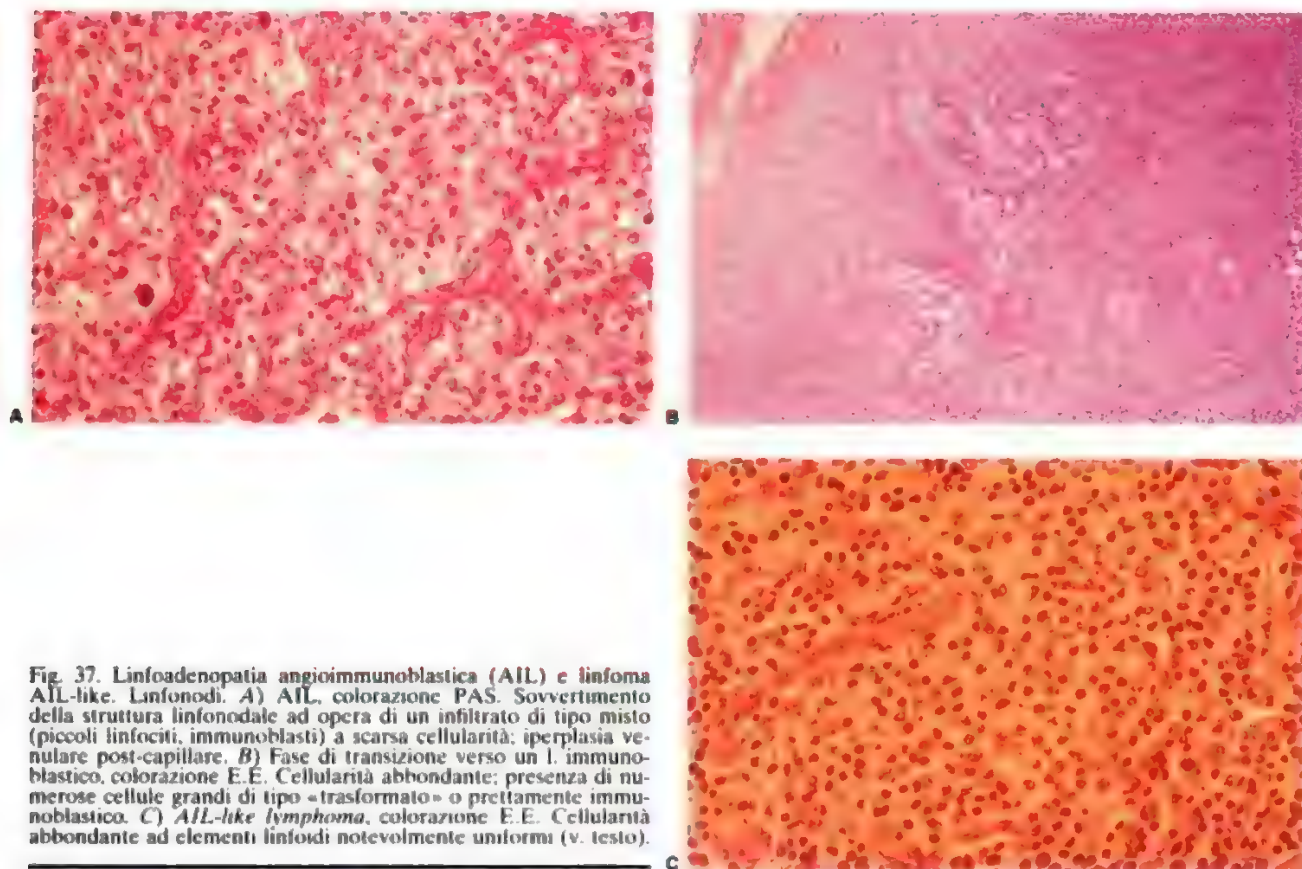


Fig. 37. Linfadenopatia angioimmunoblastica (AIL) e linfoma AIL-like. Linfonodi. A) AIL, colorazione PAS. Sovvertimento della struttura linfonodale ad opera di un infiltrato di tipo misto (piccoli linfociti, immunoblasti) a scarsa cellularità; iperplasia venulare post-capillare. B) Fase di transizione verso un l. immunoblastico, colorazione E.E. Cellularità abbondante; presenza di numerose cellule grandi di tipo «trasformato» o prettamente immunoblastico. C) AIL-like lymphoma, colorazione E.E. Cellularità abbondante ad elementi linfoidi notevolmente uniformi (v. testo).

Etiologia

L'etiologia di queste condizioni di iperstimolazione di cellule immunocompetenti è ignota. In qualche caso si presume un rapporto con reazioni allergiche a farmaci (antibiotici e anticonvulsivanti soprattutto) o si può ipotizzare una correlazione con infezioni virali (rosolia, EBV), ma è necessario ammettere, almeno quale concausa, la *sregolazione di un sistema immune deficitario* (Frishler *et al.*, 1983). I segni di tale anomalia immunologica non mancano in AIL/IBL: diminuzione di linfociti T circolanti e del numero assoluto di elementi CD4 e CD8 positivi, alterato rapporto CD4/CD8, anomalie funzionali dei linfociti T, presenza di un effetto soppressore monocitico, elevata concentrazione ematica di linfociti NK (Pizzolo *et al.*, 1987).

Progressione linfomatosa

In AIL prevale la proliferazione di linfociti T attivati, ma fattori elaborati dai cloni T possono causare intensa stimolazione di cloni cellulari B. Vi sono pertanto le premesse per una *progressione maligna di cloni linfoidi T e — sia pure raramente — anche di B.*

Questa *progressione* in un quadro che viene definito come *AIL-like Lymphoma* ha luogo in una certa aliquota di casi, in cui si può documentare che il *profilo immunofenotipico e genetico* degli elementi linfoidi si modifica nelle aree linfomatose: predominano i linfociti T, in specie dei CD4+, sono comuni fenotipi T aberranti, è frequente la perdita di uno o più antigeni CD3, CD5, CD7; è frequente il riarrangiamento clonale del gene *TCRβ* mentre è variabile quello del gene *JH*, e sono abituali anomalie cromosomiche non *random* (Pinkus e Said, 1992).

Si modifica pure il *quadro istologico* (fig. 37, B, C), per un più profondo sovvertimento dell'architettura linfonodale con aumento della cellularità: i T linfociti a scarso citoplasma e con nuclei irregolari e piccoli nucleoli appaiono più uniformi, i grandi elementi trasformati ed i T-immunoblasti tendono ora a formare lunghe bande coesive più che disperdersi tra i piccoli linfociti. Persistono in parte gli elementi cellulari non linfoidi, che caratterizzano la fase iniziale del processo (cellule epitelioide, plasmacellule, eosinofili). Sono insoliti i follicoli con aspetti regressivi e mancano le aree di materiale amorfo eosinofilo. Gradualmente il processo assume i caratteri compiuti di un l. a cellule T periferiche. Si tratta in ogni caso di una entità neoplastica *de novo*, più spesso di derivazione T linfocitaria ma talora di linea B. L'evoluzione clonale in un l. a cellule T è documentabile a livello genetico prima che la trasformazione linfomatosa si palesi a livello istologico (Pinkus e Said, 1992).

Bibliografia

- Ershler W. B., Moore A. L., Burns S. L., Tindle B. H., *J. Med.*, 1983, **14**, 81-94.
 Frizzera G., *Atypical lymphoproliferative disorders*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 459-495.
 Frizzera G., Kaneko Y., Sakurai M., *Leukemia*, 1989, **3**, 1-5.
 Godde-Salz E., Feller A. C., Lennert K., *Leuk. Rev.*, 1987, **11**, 181-190.
 Kaneko Y., Maseki N., Sakurai M. *et al.*, *Blood*, 1988, **72**, 413-421.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, 2 ed., Springer, Berlin, pp. 196-210.
 Neiman R. S., Dervan P., Haudenschild C., Jaffe R., *Cancer*, 1978, **41**, 507-518.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Pizzolo G., Vinante F., Agostini C. *et al.*, *Cancer*, 1987, **60**, 2412-2418.
 Watanabe S., Sato Y., Shimoyama M., Shimosato Y., *Cancer*, 1986, **58**, 2234-2237.

2.2.8. LINFOMA ANGIOCENTRICO

Denominazioni equivalenti

Rappporti non menzionato (*Diffuse peripheral lymphoma, mixed lymphocytic histiocytic or histiocytic*). Lukes-Collins: non menzionato

(*T-immunoblastic sarcoma*). UKC: non menzionato (*T, pleomorphic small, medium and large cell*). WF: non menzionato (*Diffuse small cleaved, mixed small and large cells; Diffuse large cell; Large cell immunoblastic*). Altri: *Angiocentric immunoproliferative lesion (grades 2 and 3), Polymorphic reticulosis, Lethal midline granuloma, Idiopathic midline destructive disease, Midline malignant reticulosis, Nasal T cell lymphoma, Lymphomatoid vasculitis, Lymphomatoid granulomatosis (some cases), REALC: Angiocentric lymphoma*.

Introduzione

Viene denominato l. angiocentrico un processo linfoproliferativo di linea cellulare non univoca e spesso incerta, in quanto lo spettro immunofenotipico spazia dal tipo T al NK ed al NK-like T e, sia pur raramente, può anche essere ascritto al tipo B (Nakamura *et al.*, 1995): tratti comuni e peculiari di questa casistica sono la crescita tumorale di tipo angiocentrico con note angiodistruttive frequenti ma non tassative, e la *localizzazione quasi esclusivamente extralinfonodale* (Kahn *et al.*, 1991). Tale quadro si riscontra in un largo gruppo di entità anatomo-cliniche a varia localizzazione preferenziale e dotate di diversa aggressività clinica. Tutti i disordini linfoproliferativi angiocentrici sono stati all'inizio interpretati quali forme di angioite granulomatosa non neoplastica, ma attualmente per la maggior parte sono considerati nell'ambito dei l. primitivi a cellule T periferiche, per i reperti citologici e per il carattere distruttivo dell'infiltrazione, specie delle pareti vasali.

Reperti istocitologici

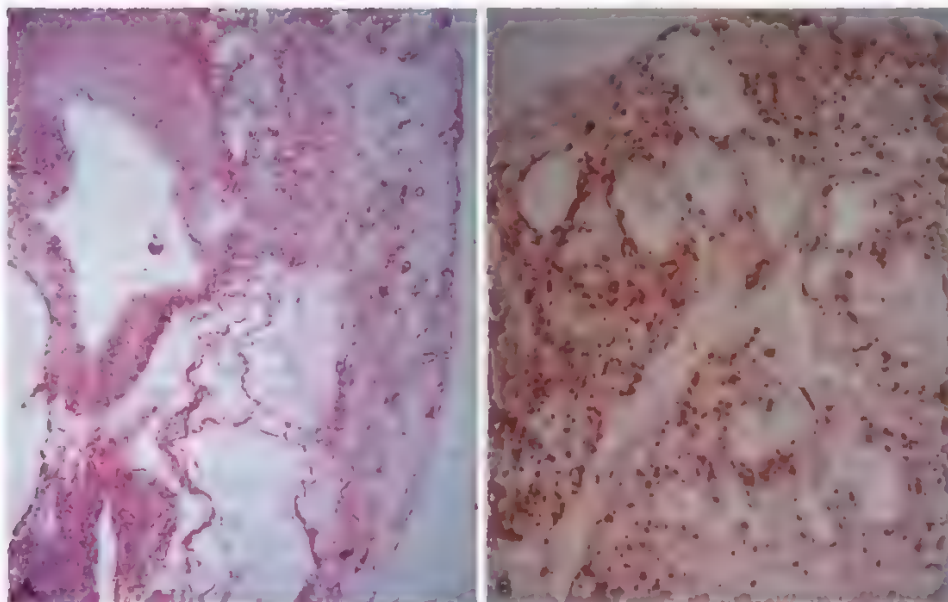
Gli aspetti istologici e citologici del disordine linfoproliferativo angiocentrico sono complessi, e appaiono con note in parte diverse a seconda della varietà anatomo-clinica e dello stadio di malattia.

Nella *vasculite linfocitica «benigna»* è manifesta una proliferazione di piccoli linfociti a morfologia normale o con minime atipie. Se il processo interessa il sottocutaneo, riproduce il quadro della panniculite recidivante di Weber-Christian.

Nelle *altre forme* qui considerate, già in *fase iniziale* si nota un infiltrato a piccoli linfociti maturi associato in varia misura ad elementi di grandi dimensioni o con caratteri prettamente immunoblastici. Inoltre la proliferazione linfoide appare sommersa da una rilevante componente «infiammatoria» e granulomatosa, ricca di plasmacellule, istiociti, granulociti eosinofili. Nelle *fasi più avanzate* le atipie linfocitarie si accentuano, si osservano grandi elementi linfoidi monomorfi ed immunoblasti; le lesioni vasali, le necrosi e le emorragie sono costanti e gravi, gli aspetti infiammatori-granulomatosi diventano invece meno appariscenti. Si instaurano processi di fibrosi sclero-ialina; molti vasi sono occlusi e quasi irricognoscibili se non si ricorre alla colorazione delle fibre elastiche che contrassegnano i resti delle pareti vasali. Queste lesioni conferiscono al processo carattere distruttivo e ulcerativo, particolarmente nelle localizzazioni del linfoma alle aree mediane della faccia, al naso, ai seni paranasali, alla faringe (anello di Waldeyer), alle vie aeree e digestive superiori, dove dà luogo ai quadri clinici noti come «*lethal midline granuloma*», «*nasal lymphoma*» e similari (Chott *et al.*, 1988).

Nei *linfonodi*, solo eccezionalmente interessati, il processo linfoproliferativo è sempre di tipo diffuso, a composizione citologica analoga a quella osservabile in sedi extralinfonodali. Nella *milza* sono caratteristici l'interessamento delle aree T-dipendenti nonché gli aspetti di iperplasia e attivazione macrofagica, con eritrofagocitosi. Nel *fegato* l'infiltrazione ha sede negli spazi portali. I *polmoni* presentano infiltrati multinodulari con tendenza ad invadere i setti alveolari senza ledere le pareti bronchiali (fig. 38): possono confluire in voluminose masse tumorali, integranti il quadro noto come *granulomatosi linfomatosa* (Liebow *et al.*, 1972). Alla *localizzazione polmonare* non si associa quella dei linfonodi ilari. Il *midollo osseo* non appare alterato. Nella *cute*, che presenta lesioni nodulari (talora ulcerate) mono- o multicentriche, sono coin-

Fig. 38. L. angiocentrico (granulomatosi linfomatoide). Polmone e pleura. A) Visione d'insieme (colorazione E.E.). Noduli linfomatosi, in parte a sede peribronchiale e perivasale. B) Immunoreazione con l'anticorpo pan-T CD3. Le cellule sono in prevalenza di natura T.



volti derma e sottocutaneo, con aspetti vasculitici e panniculitici (fig. 39). In rari casi, aggressivi e con presenza nell'infiltrato di linfociti granulati, è palese uno spiccato epidermotropismo, solitamente assente (anche il derma papillare è per lo più risparmiato) (Chan *et al.*, 1988).

Spesso si osserva che le lesioni presenti contemporaneamente nelle varie localizzazioni (polmoni, cute, S.N.C., etc.) mostrano una discrepanza istopatologica e un asincronismo sotto il profilo dello stadio di progressione.

I quadri etichettati come granulomatosi linfomatoide, reticulosi polimorfa, reticulosi maligna della linea mediana, rappresentano espressioni cliniche diverse di un processo istopatologico sostanzialmente identico, imperniato sulla associazione di un l. pleomorfo e di una componente reattiva probabilmente leucine-dipendente. È verosimile che il processo abbia carattere neoplastico fin dall'esordio e se ne ha conferma nella non lunga sopravvivenza di questi pazienti anche in assenza di una chiara progressione verso un

l. immunoblastico, evento che conclude spesso la storia naturale della malattia. Una correlazione tra caratteristiche isto-citologiche del processo e sopravvivenza (sono noti decorsi indolenti ed altri aggressivi) è tuttavia manifesta (Katzenstein *et al.*, 1979) e ne è conseguita l'opportunità di una *graduazione* («grading») a fini prognostici dei reperti istopatologici del linfoma angiocentrico in tre classi (di cui la seconda e la terza con franchi caratteri istologici maligni) (tab. X).

In parziale contrapposizione alla tendenza largamente condivisa dagli studiosi e dianzi illustrata, di accorpare su basi istopatologiche tutta la casistica dei processi linfoproliferativi a carattere angiocentrico e angio-destruente, recenti ricerche sull'immunofenotipo e la genetica molecolare (peraltro ancora scarse anche per la relativa rarità di questi processi) hanno consentito di acquisire reperti interessanti che potrebbero modificare le concezioni correnti circa la natura di questi processi.

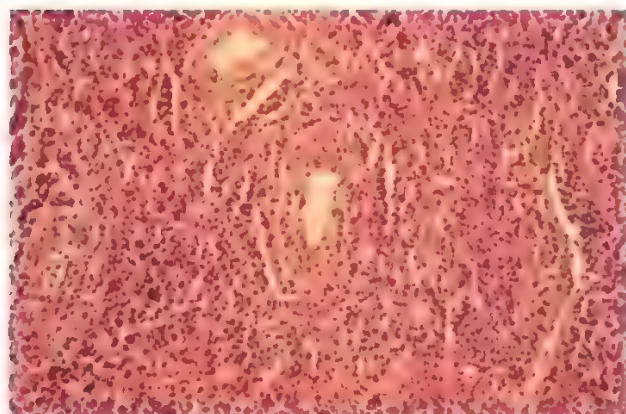


Fig. 39. L. angiocentrico. Cute e sottocutaneo. Colorazione Giemsa. Denso infiltrato perivascolare, con infiltrazione linfomatosa delle pareti vasali.

TAB. X. GRADAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLE LESIONI LINFOPROLIFERATIVE ANGIOCENTRICHE

(Secondo Lipford E. H. *et al.*, 1988)

Grado I

Polimorfismo cellulare
Presenza o assenza di atipie morfologiche dei linfociti
Rare grandi cellule linfoide (immunoblasti)
Prenenti quadri istologici di tipo infiammatorio
Necrosi solitamente assente

Grado II

Polimorfismo cellulare
Atipie morfologiche dei linfociti
Mitosi più numerose
Quadri infiammatori simili al grado I
Talora necrosi ed emorragie

Grado III

Spiccate anomalie cellulari
Grandi cellule monomorfe
Non rilevanti quadri infiammatori
Necrosi di solito preminenti

Fenotipo e genetica molecolare

Nella maggior parte delle cellule linfoidi atipiche del disordine linfoproliferativo angiocentrico si osserva un fenotipo T deficitario: CD2+, CD5+/-; CD4 o CD8 talora non espressi; CD7-; spesso manca mCD3 ma cCD3 è talora positivo; CD43 di solito positivo. Non di rado i geni *TCRβ*, γ , δ sono in configurazione *germline*, altri casi mostrano riarrangiamento di *TCRβ* e presenza di δ (Lipford *et al.*, 1988; Medeiros *et al.*, 1991). Taluni casi sono caratterizzati invece da immunofenotipo NK (CD2, cCD3, CD56, CD57, CD45, CD43 positivi), con assenza di riarrangiamento di geni *TCR* (Petrella *et al.*, 1996). In tali casi le cellule linfoidi presentano granuli azurofili come i LGL (Wong *et al.*, 1992). Nelle cellule atipiche di casi di granulomatosi linfomatoide polmonare con lesioni angiocentriche sono stati talora reperiti antigeni di linea B (CD20+), con geni *JH* in configurazione *germline*, altre volte con riarrangiamento di geni *Ig* (Guinee *et al.*, 1994). Qualora nelle cellule linfomatose sia presente il genoma EBV, il riarrangiamento di geni *Ig* ha carattere clonale. Tale reperto è più frequente nelle localizzazioni aerodigestive alte che in quelle polmonari (Sabourin *et al.*, 1993). Si tenga presente che anche i. angiocentrici di linea NK CD56+ sono spesso associati a presenza del genoma EBV o a positività di LMP-1 (Tsang *et al.*, 1994; Luzi *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 1996).

Conclusioni

Per i casi più strettamente sovrapponibili alla forma descritta come «reticolosi polimorfa» si ritiene più frequente l'attribuzione ad una linea T periferica (Strickler *et al.*, 1994) o NK (Jaffe, 1995; Petrella *et al.*, 1996) o indeterminata (Jaffe *et al.*, 1996), e si ipotizza per le linee T e NK un comune progenitore in una cellula linfoide del timo umano fetale. Per i quadri propri della granulomatosi linfomatoide si prospetta una genesi preferenziale da una linea linfoide B (CD20+) infetta da EBV (Guinee, 1994; Jaffe, 1995), con una frazione minore di casi di natura cellulare T e non infetti da EBV (Myers *et al.*, 1995). Per i casi di linea B cellulare si può avanzare l'ipotesi che le cellule T, anch'esse numerose ma di tipo reattivo e non neoplastiche, partecipino alla patogenesi della vasculopatia distruttiva tramite complessi antigene-anticorpo correlati all'infezione da EBV (Myers *et al.*, 1995).

Bibliografia

- Chan A., Ng C. S., Ngan K. C. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 861-876.
 Chott A., Rappersberger K., Schlossarek W., Radaskiewicz T., *Human Pathol.*, 1988, **19**, 1093-1101.
 Eichel B. S., Harrison E. G., Devine K. D. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1966, **112**, 597-605.
 Guinee D., Jaffe E. S., Kingma D. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1994, **18**, 753-764.
 Jaffe E. S., *Post-thymic lymphoid neoplasia*, in Jaffe E. S. ed., *Surgical Pathology of the lymph nodes and related organs*, 1995, Saunders, Philadelphia, pp. 344-389.
 Jaffe E. S., Chan J. K. C., Su I. J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 102-111.
 Katzstein A. A., Peiper S. C., *Mod. Pathol.*, 1990, **3**, 435-442.
 Khan S. M., Bailey I. S., Addis B. J., *Histopathology*, 1991, **19**, 96-98.
 Liebow A. A., Carrington C. B., Friedman P. J., *Human Pathol.*, 1972, **3**, 457-558.
 Lipford E. H., Margolick J. B., Longo D. L. *et al.*, *Blood*, 1988, **72**, 1674-1681.
 Luzi P., Leoncini L., Funtó I. *et al.*, *Virchows Arch.*, 1994, **425**, 121-125.
 Medeiros L. J., Peiper S., Elwood P. *et al.*, *Human Pathol.*, 1991, **22**, 1550-1557.
 Myers J. L., Kurtin P. J., Katzenstein A. L. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 1300-1312.
 Nakamura S., Suchi T., Koshikawa T. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 281.
 Petrella T., Delfau-Larne M. M., Caillot D. *et al.*, *Human Pathol.*, 1996, **27**, 577-583.
 Pinkus G. S., Said J. S., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Sabourin J. C., Kanavarios P., Briere J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1993, **17**, 22-30.

- Strickler J. G., Meneses M. F., Haberman T. M. *et al.*, *Human Pathol.*, 1994, **25**, 659-665.
 Tsang W. Y., Chan J. K. C., Yip T. T. *et al.*, *Human Pathol.*, 1994, **25**, 758-765.
 Wong K. F., Chan J. K. C., Ng C. S. *et al.*, *Human Pathol.*, 1992, **23**, 798-804.

2.2.9. LINFOMA PRIMITIVO INTESTINALE A CELLULE T, ASSOCIATO AD ENTEROPATIA

Denominazioni equivalenti

Rappaport: non menzionato (*Diffuse mixed lymphocytic-histiocytic; Histiocytic*). Lukes-Collins: non menzionato (*T-immunoblastic sarcoma*). UKC: non menzionato (*T, pleomorphic small, medium and large cell*). WF: non menzionato (*Diffuse small cleaved cell; Diffuse mixed small and large cell; Diffuse large cell; Large cell immunoblastic*). Altri: *Malignant histiocytosis of the intestine; Ulcerative jejunitis*. REALC: *Intestinal T-cell lymphoma (with or without enteropathy)*.

Introduzione

La maggior parte dei l. insorgenti nel tratto gastrointestinale sono di natura cellulare B (v. tab. XXVIII, col. **3375), ma Isaacson *et al.* (1985; 1994) hanno chiarito che esiste una categoria di l. intestinali associati a malassorbimento, di cui può essere dimostrata la natura T cellulare. Tali T-LNH possono svilupparsi, quali eventi primitivi, nel tenue, nel corso di precedente malattia celiaca («enteropathy-associated T-cell lymphoma», EATL). L. istologicamente analoghi, ma non associati alle classiche alterazioni della mucosa digiunale proprie della malattia celiaca, possono esordire in ogni sezione del tratto gastrointestinale ma di preferenza nel tenue (Domizio *et al.*, 1993); è probabile che una parte di tali casi siano EATL insorti in malattia celiaca latente. Altri casi ancora sono esempi del cosiddetto «epitheliotropic T-cell lymphoma» (Foucar *et al.*, 1984), un l. a basso grado di malignità, derivato verosimilmente da T-linfociti intraepiteliali della mucosa, CD8 positivi, che può insorgere in ogni sezione del tratto gastrointestinale, ma specialmente nel tenue (Chott *et al.*, 1992).

Il l. intestinale a cellule T può localizzarsi in ogni parte del tenue (in specie nel digiuno), raramente nello stomaco e nel colon; spesso si presenta in sedi multiple, con formazione di noduli ulcerati, placche, stenosi, più insolitamente in forma di grandi masse tumorali. Può infiltrare il mesentere ed i linfonodi mesenteriali.

Il riconoscimento che EATL deriva da una classe di T cellule associata al tubo digerente (Isaacson *et al.*, 1985) ne fa in qualche modo il pendent del MALT-linfoma intestinale a cellule B.

Reperti istocitologici

Le alterazioni istologiche del tenue sono molto varie nei diversi casi ed entro ogni singolo caso da zona a zona. Le cellule tumorali sono rappresentate da elementi linfoidi di diverse dimensioni, da poco più grandi dei normali piccoli linfociti a cellule di medie o di grandi dimensioni, immunoblasto-simili. La neoplasia può essere monomorfa o presentare commistione di cellule di varia grandezza od essere caratteristicamente pleomorfa con cellule anaplastiche bizzarre multinucleate. Le cellule linfomatose infiltrano estesamente la tonaca propria e spesso sono presenti in sede intraepiteliale, talora in misura preminente. Coesiste una componente infiammatoria con più o meno rilevante infiltrazione di granulociti eosinofili e di plasmacellule. Si possono rinvenire quadri granulomatosi simulanti la malattia di Crohn, specie se è presente estesa necrosi della mucosa (possibile causa di perforazione e di ulcerazione). Se era attiva la malattia celiaca, il quadro istologico tumorale si accompagna ai reperti propri della enteropatia, con atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrazione intraepiteliale di piccoli linfociti apparentemente normali (ma talora si può dimostrare la loro appartenenza al clone linfomatoso). Le alterazioni di tipo

celiaco possono mancare se l'enteropatia era in fase di latenza o di remissione.

I linfonodi mesenterici possono essere coinvolti dal linfoma, con infiltrazione spesso di modesta entità, prevalentemente intrasinusoidale e/o paracorticale; si può osservare necrosi.

Fenotipo e genetica molecolare

Il fenotipo delle cellule linfomatose è CD3+/-, CD7+, CD4 e CD8 negativi. Si osserva reazione positiva con l'AcMo HML-1 (Spencer *et al.*, 1988), che riconosce tipicamente la popolazione T linfocitica normale intraepiteliale (un reperto del genere si riscontra solo nella micosi fungoide e nella tricoleucemia). Le grandi cellule anaplastiche sono spesso CD30 positive. Numerose sono le cellule linfoidi in ciclo, Ki-67 positive.

Le indagini di genetica molecolare mostrano riarrangiamento clonale del gene della catena β di TCR, assenza di espressione di geni TCR γ , presenza del genoma EBV e di LMP-1 (Pan *et al.*, 1993).

Bibliografia

- Chott A., Dragosics B., Radaskiewicz T., *Am. J. Pathol.*, 1992, **141**, 1361-1371.
 Domizio P., Owbn R. A., Shepherd N. A. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1993, **47**, 429-432.
 Foucar K., Foucar E., Mitros F. *et al.*, *Cancer*, 1984, **54**, 54-60.
 Isaacson P. G., Norton P. G., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Isaacson P. G., O'Connor T. N. J., Spencer J. *et al.*, *Lancet*, 1985, **2**, 688-691.
 Pan L. X., Din T. C., Peng H. Z. *et al.*, *J. Pathol.*, 1993, **170**, 137-143.
 Spencer J., Cerf-Bensussan N., Jarry A. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1988, **132**, 1-5.

2.2.10. LINFOMA/LEUCEMIA DELL'ADULTO A CELLULE T

Denominazioni equivalenti

Rappaport: *Diffuse PDL; Mixed lymphocytic-histiocytic, or Histiocytic*. Lukes-Collins: *T-immunoblastic lymphoma*. UKC: *Pleomorphic small, medium and large types (HTLV-I+)*. WF: *Diffuse small cleaved cell; Mixed small and large cell; Diffuse large cell; Large immunoblastic lymphoma*. REALC: *Adult T-cell lymphoma/leukemia (ATLL)*.

Reperti istocitologici

La *Adult T-cell lymphoma/leukemia (ATLL)* è un l. T-periferico associato ad infezione da retrovirus HTLV-I (v. sopra *Etiologia*), con particolare distribuzione geografica (v. sopra *Epidemiologia*). Può presentare lesioni istologiche non univoche, in rapporto al sottotipo di diffusione e di crescita tumorale, e all'organo coinvolto.

Nella *forma tipica*, la normale architettura del parenchima linfonodale è completamente sovvertita, salvo la conservazione delle strutture vascolari e dei seni marginali. Cellule polimorfe e pleomorfe, con spiccate irregolarità nucleari, infiltrano diffusamente il parenchima e non vi è più traccia di follicoli o questi sono atrofici. Le cellule linfomatose sono in parte elementi grandi, con abbondante citoplasma fortemente basofilo (PAS-negativo, reazione finemente granulare per le idrolasi acide), grosso nucleo centrale ovoidale e vescicolare, prominenti nucleoli; in parte sono elementi di media grandezza con nucleo rotondo spesso a contorni incisi o multilobato o cerebriforme: sono pure presenti piccoli linfociti con nuclei irregolari picnotici. Si notano talora cellule plurinucleate Reed-Sternberg-simili o Hodgkin-simili. Raramente si riscontrano istiociti, plasmacellule, eosinofili; le fibre reticolari formano una fine rete.

Il raro tipo «linfomatoso» con crescita tumorale linfadenopatica isolata e senza espressione leucemica, presenta solitamente una proliferazione monomorfa di grandi cellule con cospicuo nucleolo.

Nelle *eruzioni cutanee* (nodulari o papulose) specifiche dell'ATLL si nota nel derma superficiale una infiltrazione perivasale di linfociti neoplastici senza manifesto epidermotropismo, benché in circa il 50% dei casi siano presenti piccoli aggregati linfoidi intraepiteliali di tipo Pautrier; all'infiltrazione linfoide possono essere associate plasmacellule e immagini pseudogranulomatose

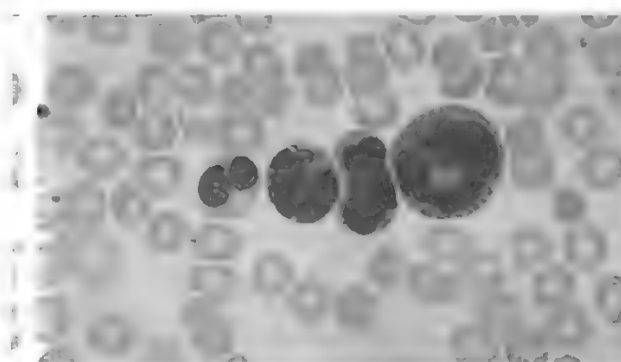


Fig. 40. Linfoma/leucemia dell'adulto a cellule T (ATLL). Sangue periferico, colorazione MGG. Morfologia delle cellule linfomatose, a nucleo iperlobulato.

(Takahashi *et al.*, 1988). Più rari sono i quadri cutanei simili al l. angiocentrico (McNutt *et al.*, 1990).

In alcuni casi si reperisce nel midollo osseo una modesta infiltrazione linfomatosa di tipo diffuso o parcellare (non paratrabecolare), con aspetti citologici analoghi a quelli linfonodali e cutanei. Nel polmone le lesioni ricordano quelle della granulomatosi linfomatosa (linfoma angiocentrico): si osservano infiltrati linfoidi a piccole cellule con nuclei irregolari.

Frequente è l'espressione leucemica, con elevata linfocitosi; nel sangue periferico i linfociti hanno spesso nucleo iperlobulato («flower cells») (fig. 40) e appaiono positivi al PAS (in forma granulare o in grossi blocchi) oltre che alle idrolasi acide. L'aspetto leucemico può essere indipendente dal coinvolgimento midollare.

Citogenetica

In più dell'80% dei casi, e soprattutto nella forma a decorso acuto, sono state descritte anomalie del braccio lungo di 7, 14, 15. Particolarmente caratteristici sono t(14;14)(q13;q32), inv(14)(q11;q32), nonché la trisomia di 3 o 7.

Immunofenotipo e genetica molecolare

L'immunofenotipo delle cellule linfomatose di ATLL è per lo più quello dei linfociti T helper attivati, CD4+ (v. sopra tab. VIII), con frequente perdita selettiva di CD2, CD3, CD5, CD7; i casi CD8+ sono rari; talora sono coespressi CD4 e CD8. Le cellule linfomatose infiltranti la cute possiedono immunofenotipo un po' diverso da quello reperibile nei linfonodi e nel sangue periferico, in quanto vi manca l'espressione di CD29 e di CD45RA (Nagatani *et al.*, 1990).

Dal punto di vista della genetica molecolare, si osserva riarrangiamento clonale di geni TCR e costante integrazione clonale del genoma di HTLV-I (Poiesz *et al.*, 1990; Chadburn *et al.*, 1990).

I livelli sierici di sIL-2R e di sCD30 sono usualmente elevati.

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London, pp. 218-252.
 Chadburn A., Athen E., Wiecezorek R., Knowles D., *Blood*, 1991, **70**, 1500.
 Jaffe E. S., *Surgical pathology of the lymph nodes and related organs*, 1995, Saunders, Philadelphia.
 McNutt N. S., Smoller B. R., Kline M. *et al.*, *Arch. Patol. Lab. Med.*, 1990, **114**, 170-175.
 Nagatani T., Matsuzaki T., Iemoto G. *et al.*, *Cancer*, 1990, **66**, 2380-2386.
 Poiesz B., Ruscetti F., Gazdar A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 7415.
 Takahashi K., Tanaka T., Fujita M. *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 1988, **124**, 390-404.
 Watanabe S., Mukai K., Shimoyama M., *Adult T cell leukemia/lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1281-1294.

2.2.11. LINFOMA A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE (CD30+) (A CELLULE T O NULL)

Denominazioni equivalenti

Rappaport: non menzionato (*Histiocytic, diffuse*). Lukes-Collins: *T-immunoblastic sarcoma*. UKC: *Large cell anaplastic (T and null types)*. WF: non menzionato (*Diffuse large cell, immunoblastic*). Altri: *Malignant histiocytosis*; *Sinusoidal large cell lymphoma*; *Regressing atypical histiocytosis*. REALC: *Anaplastic large cell (CD30+) lymphoma (ALCL, T and null types)*.

Introduzione

L'identificazione nella vasta congerie dei l. a grandi cellule della particolare entità nosologica denominata «linfoma a grandi cellule anaplastiche CD30+, a cellule T o null» (ALCL) è strettamente legata alla scoperta dell'antigene di attivazione CD30, reattivo con gli anticorpi Ki-1, BerH2, HRS-4. Il CD30 non è esclusivo di questo l. ed è reperibile anche in cellule di altri LNH di derivazione B e T e nelle cellule H-RS di alcuni sottotipi della malattia di Hodgkin, ma è peculiare dell'ALCL presentare un reperto positivo in oltre l'80% delle cellule linfomatose.

L'ALCL può insorgere come forma *primaria* oppure *secondaria* susseguente o simultanea ad altro tipo di LNH o a MH. Nella maggior parte dei casi, il l. presenta fenotipo di linea T cellulare (58%) od anche «null» (23%), raramente (7%) di linea B (v. a suo luogo). Il processo può interessare linfonodi e/o sedi extralinfonodali. La proliferazione linfomatosa è tipicamente *diffusa*.

Reperti citologici

Le cellule tumorali dell'ALCL appaiono spesso polimorfe (fig. 41, C): le loro dimensioni variano tra 10 e 50 µm; sono

rotonde, ovali o poligonali (nelle sezioni istologiche), hanno ampio citoplasma con basofilia di varia entità, talvolta intensa, talaltra debole (con il Giemsa il citoplasma assume di solito colorazione blu-grigiasta e nelle cellule esaminate in apposizioni si notano anche numerosi vacuoli sudanofili); il nucleo è pleomorfo e bizzarro, singolo o multiplo, ovale o rotondo, a contorni irregolari, con rete cromatinica piuttosto lassa ma con nodi di addensamento irregolarmente distribuiti; i nucleoli sono usualmente di medie dimensioni e multipli, talora grandi e solitari. Le mitosi sono numerose (60% di cellule Ki-67 positive). Un gruppo di casi mostra invece reperti citomorfologici relativamente monomorfi.

Reperti citochimici

Le cellule risultano positive alle reazioni per le ANAE e per la fosfatasi acida, sempre in forma focale (v. tab. VI, coll. **3231-3232).

Fenotipo

Le cellule dell'ALCL presentano nella maggior parte dei casi *markers* di linea linfocitaria T, con delezione selettiva di alcuni antigeni: solo una minoranza di casi esprime un fenotipo B o manca di dimostrabili antigeni di superficie T o B («null» cells) oppure esprime contemporaneamente antigeni T e B. I principali reperti sono riportati nella tab. VIII. Costante ed omogenea è la positività degli antigeni di attivazione CD25, CD30, HLA-DR, CD71 (Falini *et al.*, 1990). Un po' particolari sono i reperti nelle forme cutanee primitive dell'ALCL: EMA positivo, antigene linfocitico cutaneo HECA-452 positivo (De Bruin *et al.*, 1993).

Genetica molecolare

Nella maggior parte dei casi si riscontra riarrangiamento clonale di uno o più geni *TCR*; in una minoranza di casi sono riarrangiati geni

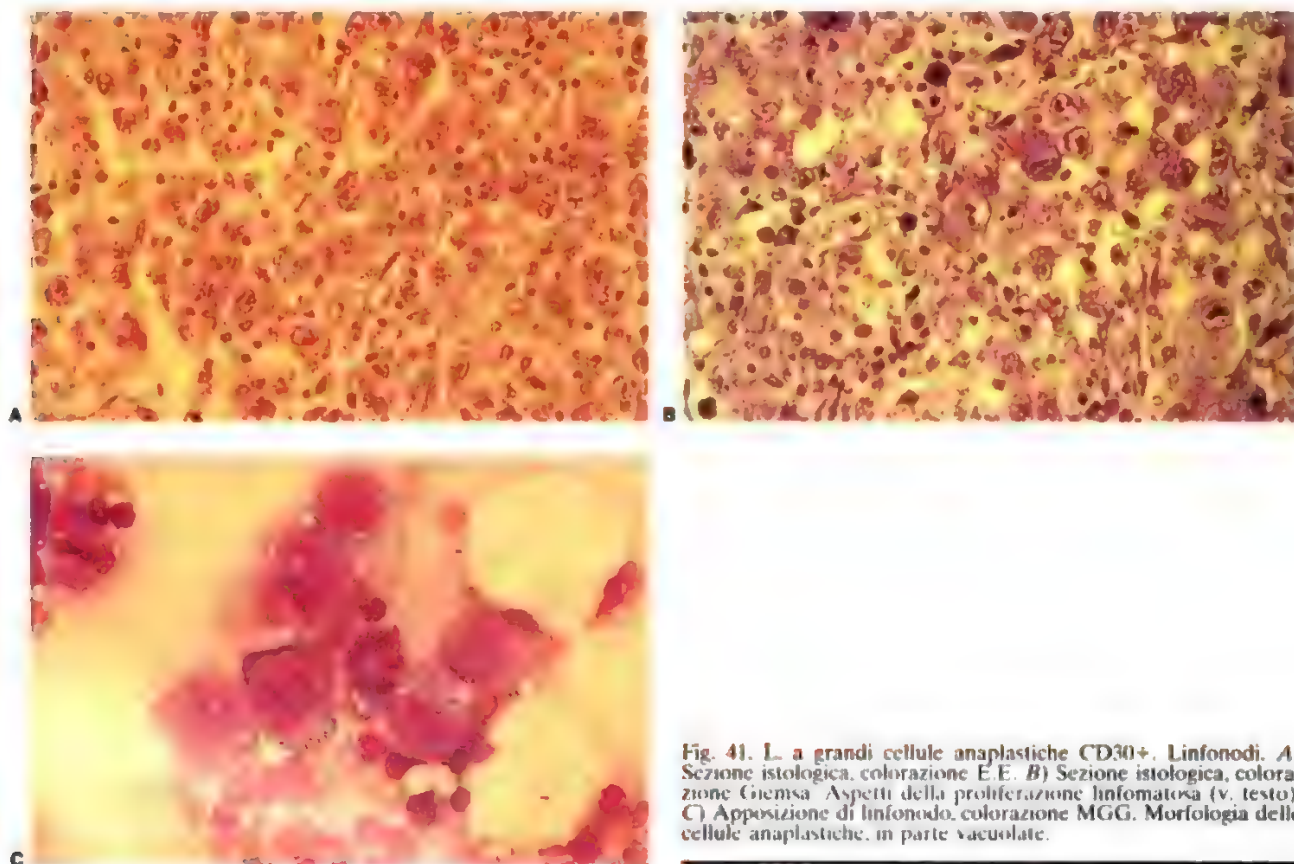


Fig. 41. L. a grandi cellule anaplastiche CD30+. Linfonodi. A) Sezione istologica, colorazione E.E. B) Sezione istologica, colorazione Giemsa. Aspetti della proliferazione linfomatosa (v. testo). C) Apposizione di linfonodo, colorazione MGG. Morfologia delle cellule anaplastiche, in parte vacuolate.

IgH oppure sia geni *TCR* che *IgH*; in almeno il 30% dei casi non è possibile osservare alcun riarrangiamento. La causa della possibile dissociazione fra genotipo e immunofenotipo è oscura. Limitatamente ai casi di ALCL-B alcuni studiosi (Herbst *et al.*, 1992) prospettano che la responsabilità di tale comportamento possa essere attribuita alla presenza di EBV nelle cellule linfomatose (30% dei casi). La presenza di HTLV-I in ALCL-T è controversa (Inghirami *et al.*, 1994). Nei casi positivi per l'uno o l'altro virus si potrebbe prospettare che questi potenti fattori di attivazione/differenziazione siano alti a sovrapporre un fenotipo cellulare tardivo ad un genotipo cellulare precoce (Stein e Dallenbach, 1992). Quanto alle eventuali alterazioni di protooncogeni in ALCL-T, sono stati messi in evidenza (e solo in una parte dei casi) alterazioni del *c-Kit* (che codifica per un recettore con attività tirosina-kinasica implicato nel controllo dello sviluppo ematopoietico) (Pinto *et al.*, 1994) e una sovraespressione della proteina codificata da *p53*, in genere non associata a mutazioni del gene (Inghirami *et al.*, 1994). In cellule di T-ALCL è stata reperita espressione di IL-9, di cui è noto il coinvolgimento nella linfomagenesi e nella proliferazione tumorale (Merz *et al.*, 1991).

Citogenetica

L'alterazione cromosomica di più frequente riscontro negli ALCL-T o *null* (soprattutto in pazienti giovani) è la t(2;5)(p23;q35) (Mason *et al.*, 1990; Yee *et al.*, 1996) che coinvolge geni *NPM* e *ALK* (v. *Patogenesi*), mentre negli analoghi L a cellule B (CD30 negativi) si osserva più spesso una rottura a livello di 6q14-23. Ciò fa ritenere che gli ALCL di tipo T o *null* siano processi diversi dalla malattia di Hodgkin, in cui la t(2;5) solitamente non viene osservata (Lamant *et al.*, 1996; Arber *et al.*, 1996).

Varianti istocitologiche

In base alle caratteristiche citomorfologiche ed al tipo di proliferazione, si distinguono alcune varianti (Chan *et al.*, 1989 e 1990; Chott *et al.*, 1990; Stein e Dallenbach, 1992; Mann *et al.*, 1995), di cui menzioniamo le più significative (fig. 41, A, B).

1. *Tipo comune*. - È la variante più frequente. Prevalge l'aspetto relativamente monomorfo di elementi di grandi dimensioni. Nelle sezioni istologiche si nota proliferazione di tipo diffuso; le cellule mostrano carattere coesivo. Le aree infiltrate sono circondate da fibre reticolari iperplastiche, da venule e da piccoli linfociti: in casi di coinvolgimento linfonodale solo parziale si osserva spesso una proliferazione intrasinusoidale, che nelle fasi precoci concerne soprattutto i seni marginali, simulando una istiocitosi maligna. Tali reperti possono richiamare anche la morfologia delle metastasi linfonodali di carcinomi e del melanoma.

2. *Variante ricca di cellule giganti*. - Sono presenti numerose grandi cellule tumorali plurinucleate, a morfologia bizzarra. Comporta più spesso fenotipo B che T.

3. *Variante «linfo-istiocitica» (linfo-monocito/macrofagica)*. - Oltre a grandi cellule linfoidi anaplastiche si notano piccoli linfociti, plasmacellule e numerosi elementi di tipo monocito-macrofagico a morfologia omogenea, con nucleo eccentrico, che possono talora costituire la quasi totalità della popolazione cellulare. I monociti/macrofagi non mostrano tendenza alla modulazione in cellule epitelioidi. Tali aspetti ricordano le iperplasie macrofagiche, in rapporto ad attivazione dei linfociti T, proprie della G.v.H.D. Questa variante è associata al solo tipo T-cellulare dell'ALCL.

4. *Variante macrofagica*. - Si differenzia dalla precedente varietà in quanto la morfologia dei macrofagi non è uniforme e non si nota una costante posizione eccentrica del nucleo; inoltre i macrofagi esplicano spesso intensa eritrofagocitosi. La tendenza dei macrofagi a circondare le cellule linfomatose conferisce alle sezioni istologiche un aspetto cribriforme, che si ritrova anche nei processi maligni di vera natura istiocitaria. È peculiare degli ALCL di linea T o «*null*».

5. *Variante ricca di granulociti neutrofili*. - La presenza di neutrofili in un infiltrato linfomatoso, in assenza di necrosi, è insolita; se ne hanno esempi nella papulosa linfomatosa e nella malattia di Hodgkin. Di recente (Mann *et al.*, 1995) è stata descritta una rara forma di *neutrophil-rich*, *Ki-1-positive* ALCL, sia di linea T che B, a cellule CD30 positive. Insorge in ambo i sessi, in età media di

circa 40 anni. Si tratta sempre di processi primari ad esordio in stadio I-IV, in sede linfonodale superficiale o profonda (retroperitoneale, non mediastinica) circoscritta o generalizzata, o in sede extralinfonodale circoscritta (cute, muscolo, polmone). È caratterizzata da proliferazione linfoide (grandi cellule pleomorfe con citoplasma talora vacuolato) in sede paracorticale o sottocapsulare, associata a diffusa infiltrazione di granulociti neutrofili, di varia entità (da 5 a > 50% della popolazione cellulare); la neutrofilia tessutale (talora congiunta a leucocitosi neutrofila periferica) è presumibilmente legata all'effetto di citochine (IL-8). La maggior parte dei casi, sottoposta a chemioterapia o a terapia combinata (CT+RT), raggiunge una prolungata RC.

6. *Linfoma a grandi cellule anaplastiche CD30+, Hodgkin-simile*. - È caratterizzato dalla presenza, in quantità variabile, di grandi cellule neoplastiche simili alle H-RS della malattia di Hodgkin, commiste alle cellule proprie della «forma comune» dell'ALCL. Le grandi cellule mostrano un aspetto proliferativo coesivo, talora intrasinusoidale o di tipo sinciziale; possono essere circondate da numerosi macrofagi. Le aree tumorali acquistano configurazione nodulare quando siano circoscritte e/o intersecate da fasci e bande di connettivo sclerotico; la capsula è ispessita (Pileri *et al.*, 1995). Sono notevoli le somiglianze con i sottotipi della MH a deplezione linfocitica («Hodgkin sarcoma») o di sclerosi nodulare (v. anche *Istologia* della malattia di Hodgkin, col. **3219) (Stein *et al.*, 1991). Questa variante, contemplata spesso quale vero e proprio sottotipo della MH oppure considerata quale variante dell'ALCL, viene ora proposta dalla classificazione REAL, in via dubitativa («provisional»), come forma nosologica *sui generis* (Pileri *et al.*, 1994; 1995).

Bibliografia

- Arber D. A., Sun L. H., Weiss L. M., *Human Pathol.*, 1996, 27, 590-594.
 Chan J. K. C., Buchanan R., Fletcher C. D. M., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1990, 14, 983-988.
 Chan J. K. C., Ng C. S., Hui P. K. *et al.*, *Histopathology*, 1989, 15, 11-34.
 Chott A., Kaserer K., Augustin I. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1990, 14, 439-448.
 De Bruin P., Blijards R., van Heerde P. *et al.*, *Histopathology*, 1993, 23, 127.
 Falini B., Pileri S., Stein H., *Human Pathol.*, 1990, 21, 624-629.
 Herbst H., Dallenbach F., Hummel M. *et al.*, *Blood*, 1991, 78, 1-10.
 Inghirami G., Macri L., Cesarman E. *et al.*, *Blood*, 1994, 83, 3581-3590.
 Lamant L., Meggetto F., Saati T. A. *et al.*, *Blood*, 1996, 87, 284-291.
 Mann K. P., Hall B., Kamino H. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, 19, 407-416.
 Mason D., Bertrand C., Rimokh R. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1990, 74, 161.
 Merz H., Houssian F. A., Orscheschek K. *et al.*, *Blood*, 1991, 78, 1311-1317.
 Pileri S. *et al.*, *Haematologica*, 1994, 79, 299-310.
 Pileri S. *et al.*, *Curr. Diagn. Pathol.*, 1995, 2, 57-58.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Pinto A., Gloghini A., Gattei V. *et al.*, *Blood*, 1994, 83, 785-792.
 Stein H., Dallenbach F., *Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 675-714.
 Stein H., Herbst H., Anagnostopoulos I. *et al.*, *Annals Oncol.*, 1991, 2, 33-38.
 Yee H. T., Ponzoni M., Merson A. *et al.*, *Blood*, 1996, 87, 1081-1088.

CARLO MAURI

PATOGENESI

SOMMARIO

- ISTOGENESI E ONTOGENESI DELLA MALATTIA DI HODGKIN (MH) col. 3303
 Premessa (col. 3303). - Attributi neoplastici delle cellule H-RS (col. 3303). - Istogenesi (col. 3304). - Ontogenesi delle cellule H-RS (col. 3305). - Patogenesi degli istotipi hodgkiniani (col. 3306).
 ISTOGENESI E ONTOGENESI DEI LINFOMI NON-HODGKIN (LNH) col. 3310
 Istogenesi (col. 3310). - Ontogenesi (col. 3311).

LINFOMI

CITOGENETICA E PATOLOGIA MOLECOLARE DEI LINFOMI

col. 3312

Introduzione (col. 3312). - **Traslocazioni e deregolazione di proto-oncogeni in LNH-B** (col. 3315). - **Attivazione di proto-oncogeni tramite mutazione** (col. 3317). - **Inattivazione di geni per delezione o mutazione cromosomica** (col. 3317). - **Altre anomalie cromosomiche** (col. 3318). - **Genomi virali** (col. 3318). - **Lesioni genetiche nei LNH-T** (col. 3318). - **Anomalie genetiche nella malattia di Hodgkin (MH)** (col. 3318).

SEDI DI ESORDIO, DIFFUSIONE METASTATICA, LEUCEMIZZAZIONE DEI LINFOMI

col. 3319

Generalità (col. 3319). - **Sedi di esordio e diffusione metastatica** (col. 3320): *Malattia di Hodgkin*. - *Linfomi non-Hodgkin (LNH)*. - **Leucemizzazione dei linfomi** (col. 3322).

ISTOGENESI E ONTOGENESI DELLA MALATTIA DI HODGKIN (MH)

Premessa

La natura della malattia di Hodgkin (MH) e delle cellule che la caratterizzano (H-RS e varianti), ed i rapporti tra queste e la concomitante componente «reattiva» sono state oggetto di innumerevoli studi e congetture (Mauri, 1996) fin dalla scoperta di questo processo morboso (Hodgkin, 1832).

L'aspetto «granulomatoso» del «tessuto sternberghiano» indusse molti studiosi, per decenni, a considerare la MH quale evento infiammatorio, di natura tubercolare o ad etiologia ignota (v. sopra *Etiologia*). Si ritiene oggi che si tratti di una neoplasia maligna, per l'inesorabile progressione clinica (in assenza di adeguata terapia) e per le caratteristiche morfologiche e biologiche delle cellule H-RS, che del processo costituiscono l'espressione più saliente. Una delle maggiori difficoltà che si incontrano nello studio di queste cellule può essere ascritta al fatto che la MH è l'unico esempio nella patologia dell'uomo in cui le cellule considerate neoplastiche (H-RS) costituiscono solitamente meno del 2% (e talora lo 0,1%) della popolazione cellulare totale comunque coinvolta nel processo patologico. L'eterogeneità delle componenti cellulari «reattive» e l'esiguità delle cellule H-RS rendono particolarmente ardue le indagini d'ordine citogenetico e molecolare, superabili entro certi limiti solo con le moderne tecniche di ibridazione *in situ* (FISH e similari) e di amplificazione con PCR (o tecniche affini).

Attributi neoplastici delle cellule H-RS

Vengono considerati tali: la capacità di proliferare, l'aneuploidia e talune anomalie citogenetiche, il carattere clonale, il reperto di alterazioni di oncogeni implicati nella linfomagenesi, l'eterotrasplantabilità, la capacità di sopravvivere *in vitro* in coltura continua. Il complesso dei rilievi raccolti nello studio di questi diversi settori induce ad aderire alla tesi della natura neoplastica delle cellule H-RS e quindi della MH, anche se non tutte le singole prove sperimentali possono essere considerate affidabili.

a) **Attività proliferativa.** - Le cellule H-RS sono dotate di attività proliferativa. L'indice mitotico (cellule in fase M) è basso (< 10%), ma l'esistenza di numerose cellule (soprattutto di tipo H) in fase S di replicazione del DNA o comunque in ciclo è attestata dalla marcatura con ³H-timidina (Quaghiotto *et al.*, 1978), dalla positività ai tests con gli AcMo Ki-67 (fig. 42) e MIB1 (Sacchi *et al.*, 1987; Abele *et al.*, 1997) e con l'anti-PCNA («proliferating cell nuclear antigen» (Hsu *et al.*, 1992), nonché dai reperti ottenibili con la citofluorimetria a flusso (Fridkamp *et al.*, 1993). La frequenza dei reperti positivi è nell'ordine dei livelli propri delle neoplasie linfoidi ad alta malignanza: il 20-30% delle cellule H e il 6-16% delle RS sono in fase S, la frequenza delle cellule H-RS in ciclo può toccare l'80%.

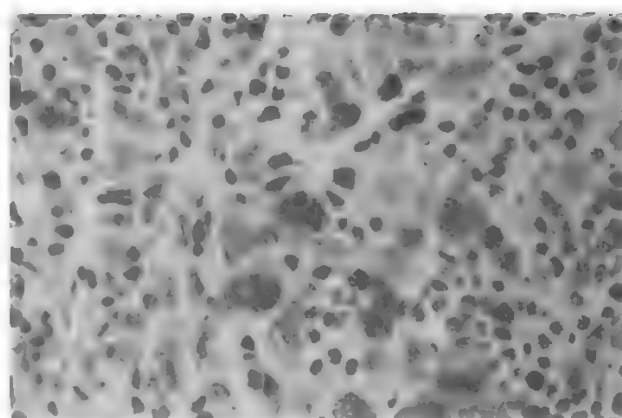


Fig. 42. Malattia di Hodgkin, sottotipo MC. Linfonodo (sezione al criostato), reazione Ki-67 (APAAP). Molte cellule H-RS presentano reazione positiva (colorazione rossa del nucleo).

b) **Aneuploidia e alterazioni citogenetiche.** - Le cellule H-RS sono tipicamente aneuploidi (spesso tetra- o octo-ploidi). In più del 50% dei pazienti si rinvenivano anomalie citogenetiche «non random»: traslocazioni o delezioni di vario tipo implicanti 1p, 4q, 6p, 12q, 13p, 14q nella insolita t(14;18) (Tilly *et al.*, 1991). Mancano tuttavia anomalie cromosomiche patognomoniche e costanti.

c) **Carattere clonale.** - La componente linfoide del tessuto «reattivo» appare prevalentemente policlonale ma nel suo ambito sono talora evidenziabili cloni emergenti che assommano al 2-10% delle cellule totali. Almeno in una parte dei casi si sono documentati nelle cellule H-RS aspetti clonali di riarrangiamento dei geni delle catene Ig o dei TCR. Altre prove di clonalità sono costituite da alterazioni citogenetiche «non random» identiche nell'ambito di ogni caso (presenza di identiche mutazioni puntiformi di p53) e dall'individuazione tra le cellule H-RS di una popolazione portatrice di EBV a carattere monoclonale (Inghirami *et al.*, 1994).

d) **Anomalie di oncogeni implicati nella linfomagenesi.** - Con varia frequenza a seconda delle casistiche è stata dimostrata iper-espressione dell'oncogene *bcl-2* in rapporto a t(14;18) (Le Brun *et al.*, 1994), di *c-myc*, *N-ras*, *c-fos*, *c-jun*, *c-fms*, *lek* e di altri oncogeni spesso implicati in processi tumorali (Hsu e Hsu, 1994). In materiale primario ed in linee cellulari MH-derivate (Trümper *et al.*, 1993) sono state notate mutazioni del proto-oncogene oncosoppressore *p53* (v. oltre). L'importanza causale di ogni anomalia cromosomica e del singolo oncogene nella patogenesi della MH non appare tuttavia ancora in chiara evidenza (Gruss e Kadin, 1996).

e) **Sopravvivenza in coltura continua.** - Solo nell'ultimo decennio si è riusciti ad ottenere linee cellulari MH-derivate a lungo sopravviventi in colture *in vitro* e presentanti in grado affidabile caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche simili a quelle offerte dalle cellule H-RS *in vivo*, sì da poter essere considerate da queste derivate (Drexler, 1993).

f) **Eterotrasplantabilità.** - Il trapianto di tessuto hodgkiniano nel topo nudo atimico non riesce facilmente (Kaplan e Gartner, 1977). Migliori risultati si ottengono con il trapianto in topini affetti da SCID (severe combined immunodeficiency disorder) di linee cellulari MH-derivate ed anche — ma raramente — di tessuto MH primario (Kapp *et al.*, 1993). Non è noto alcun modello animale di neoplasia linfoide primaria affine alla MH dell'uomo.

Istogenesi

Appare indubbio che l'oncotipo hodgkiniano emerga sempre in seno a strutture linfatiche (linfonodi, milza, timo, raramente aree linfoidi viscerali) ma è pure provato che l'evento neoplastico non insorge costantemente nella stessa area topografica di dette strutture. Nella maggior parte dei casi, e in particolare nei sottotipi istologici MC, NS e LD, il

processo inizia in ambito paracorticale T o comunque extrafollicolare, in seno ad una popolazione T attivata. Nel sottotipo istologico LP nodulare l'esordio appare invece costantemente circoscritto all'area follicolare e probabilmente è correlato con i cosiddetti *centri germinativi progressivamente trasformati* (Poppema *et al.*, 1979).

Ontogenesi delle cellule H-RS

È un problema annoso. Non vi è linea cellulare presente nelle normali strutture linfoidi in cui non si sia vista la possibile controparte normale delle cellule H-RS (Artusi *et al.*, 1987; Hsu e Hsu, 1994; Mauri, 1996).

Sono cadute ormai le ipotesi circa la derivazione delle cellule H-RS dalle *monocito-macrofagiche (istioidi)* (Kaplan e Gartner, 1977), così a lungo accreditate, oppure dalle *reticolari dendritiche* (Delsol *et al.*, 1993) o dalle *interdigitate* (Kadin, 1982). Si ritiene attualmente che le cellule H-RS siano di *natura linfocitaria*. Le indagini condotte su materiale hodgkiniano primario (biotico) e su linee MH-derivate sopravvissute in coltura, hanno in complesso provato che nella maggior parte dei casi il profilo antigenico delle cellule H-RS è molto simile a quello proprio di linfociti attivati e che in molti casi si può dimostrare presenza di antigeni di superficie ed espressione del gene *TCR β* compatibili con la linea T-cellulare (Griesser *et al.*, 1986; Herbst *et al.*, 1989) mentre in altri appaiono espressi antigeni di superficie di linea B e presenza di clg o slg monotipiche e di catene j (Pizzolo *et al.*, 1984; Casey *et al.*, 1989; Hsu e Hsu, 1994). La frequenza dei singoli *markers* linfocitari è tuttavia diversa nei diversi sottotipi istologici della MH, in parte anche nell'ambito di ogni singolo sottotipo. Sicché da tempo si discute se la cellula H-RS appartenga alla linea linfoide T o non piuttosto alla B oppure all'una o all'altra linea a seconda del sottotipo istologico e dei singoli casi.

Reperti favorevoli alla *natura B* delle cellule H-RS sono stati rinvenuti costantemente nel sottotipo istologico LP nodulare (Stein *et al.*, 1986; Pinkus e Said, 1988), talora nella forma LP diffusa, e solo in una minoranza di casi appartenenti agli altri sottotipi istologici della MH.

Più frequentemente, e in prevalenza nei sottotipi istologici MC, NS, LD, le cellule H-RS appaiono invece ascrivibili alla *linea linfocitaria T*.

Allo stato attuale si tende pertanto ad ammettere, non senza riserve (Roth *et al.*, 1994; Daus *et al.*, 1995), che le cellule H-RS (e loro varianti) possono trarre origine da differenti popolazioni linfoidi, riconducibili più spesso alla linea T e più raramente alla B; in qualche caso la linea appare indeterminata (*null*). Taluni AA. non escludono che talora nello stesso caso le cellule H-RS possano coesprimere *markers* sia T che B nella stessa cellula o in cellule diverse e che talvolta siano capaci di modulazione simil-monocito/macrofagica. Non mancano infine casi in cui il fenotipo è risultato diverso in differenti biopsie simultanee (circa il 28%) o consecutive (19%) (Chu *et al.*, 1992).

Stanno avanzando pure tesi che porterebbero ad uno smembramento delle forme tradizionalmente comprese nell'ambito della MH. Il sottotipo LP nodulare viene da alcuni considerato come un *LNH-B centro-follicolare* piuttosto che una variante istologica della MH. Incerta è pure la posizione nosologica del sottotipo LD o almeno della sua variante «*sarcomatosa*» con elevata espressione di CD30, di cui sono evidenti le affinità nei confronti di alcuni LNH a grandi cellule anaplastiche: in particolare sembra ardua una sua netta discriminazione dal cosiddetto «*LNH-T a grandi cellule CD30 positive Hodgkin-simile*» (v. col. **3302). Non pochi istopatologi propendono a considerare almeno una

parte di tali casi come reali LNH e non come varianti della MH.

Ignote sono le *controparti normali* delle cellule H-RS, sia di linea T- che B-derivate. In alcune forme particolari di MH di tipo follicolare, Ashton-Key *et al.* (1995) hanno dimostrato che le cellule H-RS derivano da cellule B situate in area mantellare.

In definitiva appare palese che l'intera casistica della MH, così com'è ancor oggi intesa, non può essere inquadrata in un unico modello onto- e isto-genetico.

Bibliografia

- Abele M. C., Valente G., Kerim S. *et al.*, *Haematologica*, 1997, **82**, 281-285.
 Artusi T., Bonacorsi G., Sarti M. *et al.*, in Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La malattia di Hodgkin*, 1987, Mucchi Ed., Modena, pp. 17-67.
 Ashton-Key M., Thorpe P. A., Allen J. P., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 1294-1299.
 Casey T. T., Olsson S. J., Cousar J. B., Collins R. D., *Blood*, 1989, **74**, 2624.
 Chilosi M., Pizzolo G., *Leuk. Lymph.*, 1995, **16**, 385.
 Chu W. S., Abbondanza S. L., Frizzera G., *Am. J. Pathol.*, 1992, **141**, 11-17.
 Daus H., Trümper L., Roth J. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 1590.
 Delsol G., Maggietto F., Brousset F. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1993, **142**, 1729-1738.
 Drexler H. G., *Leuk. Lymph.*, 1993, **9**, 1-25.
 Erdkamp F. L., Breed W. P., Schouten H. C. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1993, **4**, 75-80.
 Griesser H., Feller A., Lennert K. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1987, **40**, 157-160.
 Gruss H. J., Kadin M. E., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9**, 417-446.
 Herbst H., Tittleman G., Anagnostopoulos I. *et al.*, *Leuk. Res.*, 1989, **13**, 103-116.
 Hsu S. M., Hsu P. L., *Critical Rev. Oncogenesis*, 1994, **5**, 213.
 Inghirami G., Macri L., Rosati S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 9842.
 Kadin M. E., *Cancer Treat. Rep.*, 1982, **66**, 601-608.
 Kaplan H. S., Gartner S., *Internat. J. Cancer*, 1977, **19**, 511.
 Kapp H., Wolff J., Hummel M. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 1247.
 LeBrun D. P., Ngun B. J., Weiss L. M. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 223.
 Mauri C., *La Malattia di Hodgkin: una intuizione felice, 160 anni di controversie*. Atti e Memorie Accad. Naz. Sci. Lettere, Arti, Modena, 1996, Mucchi Ed., Modena, **12**, 3-48.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Am. J. Pathol.*, 1988, **133**, 211.
 Pizzolo G., Chilosi M., Vinante F. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1984, **50**, 415.
 Poppema S., Kaiserling E., Lennert K., *Histopathology*, 1979, **3**, 295.
 Quaglino D., De Pasquale A., Artusi T. *et al.*, *Haematologica*, 1978, **63**, 241-264.
 Roth J., Daus H., Trümper L. *et al.*, *Internat. J. Cancer*, 1994, **57**, 799.
 Sacchi S., Falini B., Tabilio A. *et al.*, in Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La malattia di Hodgkin*, 1987, Mucchi Ed., Modena, pp. 79-89.
 Stein H., Hausmann M. L., Lennert K. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1986, **86**, 292.
 Stein H., Hummel M., *Leuk. Lymph.*, 1993, **10** (Suppl.), 99.
 Tilly H., Bastard C., Delastre T. *et al.*, *Blood*, 1991, **77**, 1298-1304.
 Trümper L. M., Brady G., Bagg A. *et al.*, *Blood*, 1993, **81**, 3097.

Patogenesi degli istotipi hodgkiniani

La molteplicità dei quadri istopatologici osservabili nella MH, pur nel rispetto di alcune costanti (presenza di cellule H-RS o loro varianti in seno ad una composita popolazione cellulare «reattiva»), come pure la variabilità di alcune espressioni cliniche, ematologiche ed umorali della malattia, hanno trovato ultimamente plausibili interpretazioni nella scoperta della disomogeneità oncogenetica delle cellule H-RS e nella spiccata capacità di produrre citochine e fattori di varia natura sia da parte delle cellule H-RS che delle «reattive». Tali citochine comprendono fattori della più varia natura: interleuchine e ligandi con rispettivi recettori di membrana, antigeni di attivazione, molecole di ade-

LINFOMI

sione, fattori di crescita ed altre proteine ad effetto cellulostimolante o inibente (tab. XI). La vastissima letteratura in merito è illustrata in dettaglio in recenti rassegne di Gruss *et al.* (1994), Gruss e Dower (1995), Chilosi e Pizzolo (1995), Falini *et al.* (1995), Cohen e Cohen (1996) (v. CITOCHINE**); CITOCHINE**); INTERLEUCHINE [v.*; v.**]; ADESIONE, MOLECOLE DI**).

Imponente è la quantità e varietà di citochine e di altri fattori espressi dalle linee cellulari MH-derivate in coltura, mentre le cellule H-RS del materiale hodgkiniano «primario» ne esprimono un numero minore: soprattutto IL-1a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10;

TAB. XI. CITOCHINE E FATTORI DI VARIA NATURA COINVOLTI NEL PROCESSO HODGKINIANO (ED IN TALUNI LNH)

Classe e acronimo	Complessi recettoriali di membrana
Interleuchine	
IL-1a/LAF	IL-1R/tipo I e II
IL-2/TCGF	IL-2R/complesso catene $\alpha/p55$, $\beta/p75$, $\gamma/p64$
IL-4	IL-4R/catena γ
IL-5	IL-5R/catena β
IL-6	IL-6R
IL-8	IL-8R/tipo I e II
IL-9/TCGF III	IL-9R/multiple isoforme catena γ
IL-10	IL-10R
IL-11	IL-11R
IL-12	IL-12R complesso
Ligandi TNF	
TNF α/β (LT- α)	TNFR/tipo I e II
CD27L	CD27
CD30L	CD30
CD40L	CD40
Altre citochine	
IFN- α e - β	IFNR/tipo I
IFN- γ	IFNR/tipo II
MPC-1	MPC-1R/tipo I e II
TGF- β	Multipli TGF- β R
B7-1/BB-1	CD28
LIF	LIFR
Fattori di crescita	
GM-CSF (MIF)	α -GM-CSFR/catena β
G-CSF	G-CSFR
M-CSF	M-CSFR/c-fms
SCF	SCFR/c-kit
IL-3	α -IL-3R/catena β
PDGF	
Molecole di adesione e altri fattori	
ICAM-1/CD54	
LFA-1 (CD11a)	
LFA-3 (CD58)	
H-CAM (PGP-1) (CD44)	
L-Selectina	
VCAM-1	
E-Selectina (ELAM-1)	
TF	

CSF: colony stimulating factor; c β : common receptor component per interleuchina IL-3, IL-5 e Granulocyte Macrophage (GM)-CSF receptor complex; γ : common receptor component per IL-2, IL-4, IL-7 e IL-9 receptor complex; G-CSF: granulocyte CSF; IFN: interferone; LAF: lymphocyte activating factor; LAK: lymphocyte activated killer; LIF: leukemia inhibiting factor; MCP: monocyte chemotactic protein; M-CSF: macrophage CSF; MIF: migration inhibiting factor; PDGF: platelet derived growth factor; SCF: stem cell factor; TF: tissue factor; TNF: tumor necrosis factor.

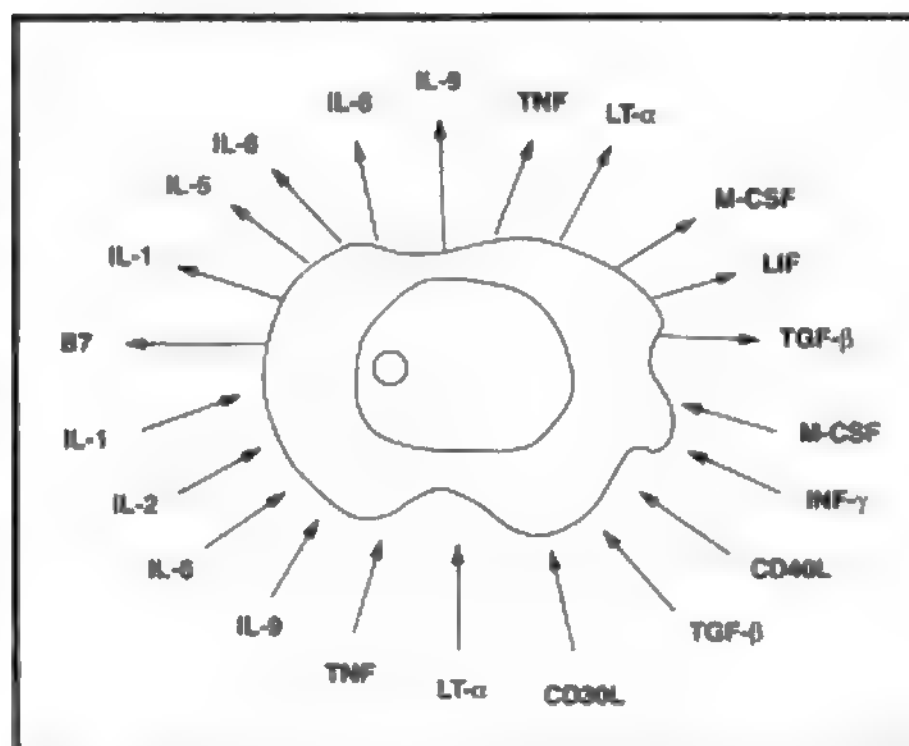


Fig. 43. Rappresentazione schematica delle citochine prodotte e dismesse dalle cellule H-RS e/o agenti su di esse. V. testo e tabb. XI e XII.

fattori di crescita e stimolanti quali IL-3 e M-CSF; ligandi della famiglia del TNF e/o loro recettori (TNF, CD27L, CD30L/CD30, CD40L/CD40) nonché B7-1, TGF- β /LT- α .

Tra le cellule «reattive» sono soprattutto i linfociti «memoria» (CD45RO positivi), attivati e proliferanti, ad esprimere numerose interleuchine (v.*; v.***) ed altri fattori: in particolare IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, TNF, B7, IFN γ , CD30L, CD40L. Fattori modulanti, stimolanti o inibitori di funzioni cellulari, sono infine prodotti e dismessi dai monociti/macrofagi (cellule epiteloidi), dai fibroblasti, dai granulociti neutrofili ed eosinofili e dalle mast-cellule.

Tutti questi tipi cellulari e in particolare le cellule H-RS (fig. 43) possono essere ad un tempo effettori e recettori di un complesso intreccio di stimoli di varia natura, che agiscono come segnale positivo oppure con effetto inibitore, in rapporto alla natura della cellula bersaglio ed alla attivazione differenziale subita ad opera di altre citochine. Ogni cellula recepisce il segnale proveniente dalle cellule adiacenti o dal microambiente grazie a recettori di membrana specificamente citochine-associati. Oltre a questo meccanismo «paracrina» degli stimoli, ne esiste uno «autocrino», che condiziona — in determinati casi — l'autoregolazione dell'attività cellulare.

Poiché è noto che attivazione, proliferazione e differenziazione delle cellule sono controllate per lo più da segnali intercellulari e che le citochine sono fattori di coordinamento delle risposte immunologiche e infiammatorie (Arai *et al.*, 1990), la MH appare quale un processo neoplastico che condiziona una risposta immunologica di tipo simil-infiammatorio (Ruco *et al.*, 1993; Gruss *et al.*, 1994).

Alla variabilità delle interazioni fra cellule neoplastiche H-RS e componenti cellulari «reattive» può essere ascritto non solo il polimorfismo dei quadri istologici della MH ma pure il pluralismo di alcune manifestazioni cliniche (ad es. presenza o assenza di sintomi generali) nonché la variabile entità di talune alterazioni bioumorali, immunologiche, ematologiche che caratterizzano la malattia (v. sotto *Quadri clinici*). La tab. XII elenca i principali eventi della MH in cui sono coinvolti citochine ed altri fattori.

Bibliografia

- Arai K., Lee F., Miyajima A. *et al.*, *Rev. Biochem.*, 1990, **59**, 783-836.
Chilosi M., Pizzolo G., *Leuk. Lymph.*, 1995, **16**, 385-395.

TAB. XII. RAPPORTI TRA ALCUNI EVENTI DELLA MALATTIA DI HODGKIN E LE PIÙ SIGNIFICATIVE CITOCINE COINVOLTE NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA

Parametri	Citochine / Molecole di adesione / Altri fattori
Plurinuclearità cellulare	IFN- γ , IL-5, IL-4
Attivazione linfocitaria T	IL-1, IL-6, IL-9, TNF, CD40L
Attivazione linfocitaria B	IL-1, IL-2, IL-6, TNF
Interazione cellulare T $\leftrightarrow$ H-RS	IL-2, IL-6, IL-9, TNF, TNF- β , CD30L, CD40L, B7
Fattori autocrini H-RS	IL-6, IL-9, TNF, TNF- β , M-CSF
Proliferazione fibroblastica	IL-1, TNF, TGF- β , IL-4
Sintesi di collagene	TGF- β , LIF, IL-4
Plasmacitosi	IL-6, IL-11
Eosinofilia	IL-5, GM-CSF, IL-2, IL-3
Accumulo/attivazione di neutrofili	IL-8, TNF, TGF- β , ICAM-1, VCAM-1, Selectine
Piastrinosi	IL-6, IL-11, LIF
Aspetti simil-granulomatosi delle lesioni «reattive»	IL-1, TNF, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectina
Coagulazione intravasale/necrosi	IL-1, TNF, TF
Deficienza della risposta immunologica	TGF- β , IL-9, IL-10, CD40L, IFN- γ
Induzione della risposta della fase acuta	IL-1, IL-6, TNF, IL-11, LIF
Sintomi generali B	IL-1, IL-6, TNF, TNF- β

Cohen M. C., Cohen S., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996, **105**, 589.
 Falini B., Pileri S., Pizzolo G. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 1.
 Gruss H. J., Dower J. K., *Blood*, 1995, **85**, 3378.
 Gruss H. J., Hermann F., Drexler H. G., *Critical Rev. Oncogenesis*, 1994, **5**, 473-538.
 Ruco L. P., Pittilio M., Dejana E., Baroni C. D., *J. Pathol.*, 1993, **171**, 131.

ISTOGENESI E ONTOGENESI DEI LINFOMI NON-HODGKIN (LNH)

Isto- e ontogenesi delle cellule linfomatose B e T costituiscono problemi in parte ancora aperti.

Istogenesi

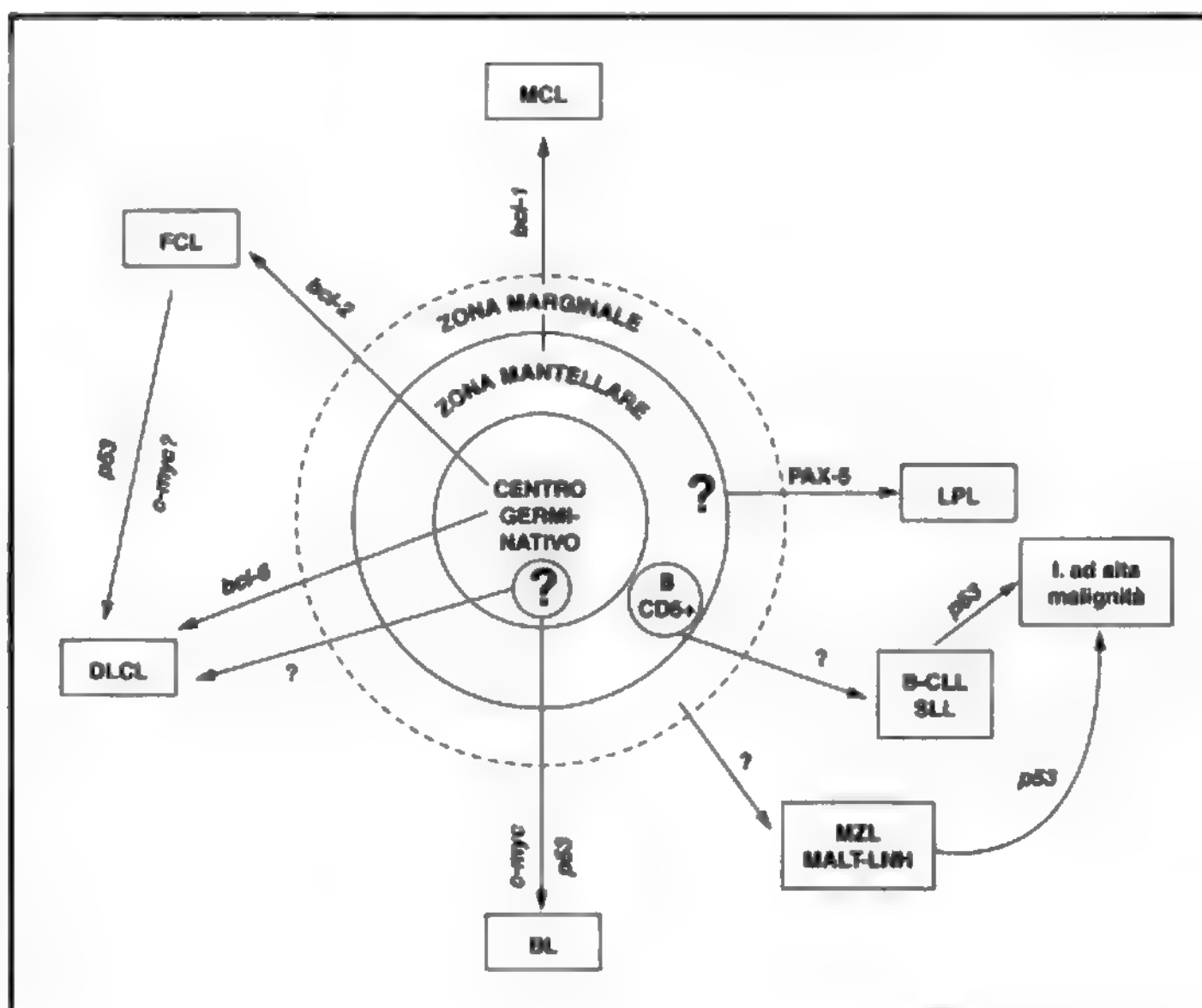
In merito all'istogenesi dei LNH, un piccolo gruppo deriva da cellule del compartimento linfoide centrale o comunque dal pool linfoide non ancora esposto ad antigeni (l. linfoblastico, forse taluni l. a piccole cellule), ma per la maggior parte i LNH traggono origine da cellule mature del compartimento linfoide periferico. Con particolare frequenza il processo si avvia in linfonodi, ma è pure notevole l'incidenza dell'esordio nella milza ed in altre aree extra-linfonodali soprattutto se ricche di strutture linfatiche (MALT primario e secondario).

I *LNH a cellule B* rappresentano un gruppo di elevata eterogeneità biologica e clinica. Possono originare in una delle strutture componenti i follicoli secondari (centro germinativo, aree mantellare, zona marginale) dei linfonodi e della milza nonché in aree linfoidi associate alle mucose (v. fig. 44).

Nel *centro follicolare* insorgono i l. centrofollicolari (FCL) di tipo misto (cb/cc) sia a struttura nodulare che diffusa, ed i l. a grandi cellule B a proliferazione diffusa (DLBCL), nonché (dubitativamente) il l. di Burkitt (BL).

Dall'*area mantellare* procedono i l. a cellule mantellari

Fig. 44. Schema della struttura di un follicolo secondario: aree accertate o ipotetiche da cui derivano i principali sottotipi di B-LNH periferici e oncogeni implicati nella loro genesi. DLCL: l. a grandi cellule, diffuso. FCL: l. centrofollicolare. MCL: l. a cellule mantellari. LPL: l. linfoplasmacitoide/immunocitoma. B-CLL/SLL: leucemia linfatica cronica a cellule B/l. a piccoli linfociti. MZL: l. a cellule della zona marginale. BL: linfoma di Burkitt.



(MCL), a proliferazione solitamente diffusa. Alquanto incerta è la derivazione topografica di l. a piccole cellule B quali la tricoleucemia e la leucemia linfatica cronica a cellule B/l. a piccoli linfociti (B-CLL/SLL): quest'ultima appare in rapporto ad una piccola popolazione linfoide B CD5+ verosimilmente situata in area mantellare.

Ancora non compiutamente definito è l'apporto alla linfomagenesi della *zona marginale* dei follicoli, che appare coinvolta nella genesi di particolari linfomi a cellule monocitoidi, linfonodali e splenici. L. sotto vari aspetti similari insorgono primariamente in sedi extralinfonodali in seno al tessuto MALT.

Qualche interrogativo sussiste tuttora circa il *cluster* di linfociti B presenti nella *midollare timica*, da cui trarrebbe origine il LNH-B primario del mediastino (Isaacson *et al.*, 1987).

Molti LNH a cellule T originano primariamente nell'area paracorticale dei linfonodi somatici, talora nella milza (manicotti pararteriolar, *Capillarhilsen*) ed anche in strutture linfoidei extralinfonodali.

Ontogenesi

Per quanto attiene all'ontogenesi delle cellule linfomatose, l'aspirazione ad identificare per ogni sottotipo di l. l'originaria e ben definita tappa dell'evoluzione differenziativo-maturativa di una linea linfoide normale, costituisce non di rado un problema ancora insoluto. A ciò concorrono cause diverse, biologiche e tecniche, nonché lacune cognitive circa taluni sottogruppi immunofenotipici minori.

Nelle figg. 45 e 46 riportiamo a titolo orientativo una proposta interpretativa dell'ontogenesi dei più comuni tipi di LNH.

Bibliografia

- Gaidano G. L., Dalla-Favera R., *Molecular biology of lymphomas*, in DeVita V., Helmann S., Rosenberg S. A. eds., *Cancer. Principles and practice of oncology*, 1997, Lippincott, Philadelphia, pp. 2131-2142.
Isaacson P. G., Norton A. J., Addis B. I., *Lancet*, 1987, 2, 1488-1490.
Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore. (Vari capitoli redatti da Trinchieri G., pp. 1-26; Knowles D. M. *et al.*, pp. 73-169; Sheihani K., pp. 197-214; Medeiros L. J. *et al.*, pp. 263-298).

CITOGENETICA E PATOLOGIA MOLECOLARE DEI LINFOMI

Introduzione

Il genoma dei l. è notevolmente più stabile di quello dei tumori solidi e non presenta instabilità *random* generalizzata. Ben definite anomalie cromosomiche non-*random* di vario tipo sono state tuttavia individuate nei LNH con diversa frequenza a seconda del tipo istologico, ed alcune di esse sono patognomoniche ed hanno valore diagnostico e prognostico.

L'enorme massa di notizie su questi argomenti, che è impossibile esporre in dettaglio in questa sede, è stata oggetto di numerose rassegne: si vedano in particolare i capitoli ad essi dedicati nel trattato diretto da Knowles (1992) e le sintesi di Gaidano *et al.* (1995) e di Gaidano e Dalla-Favera (1995; 1997).

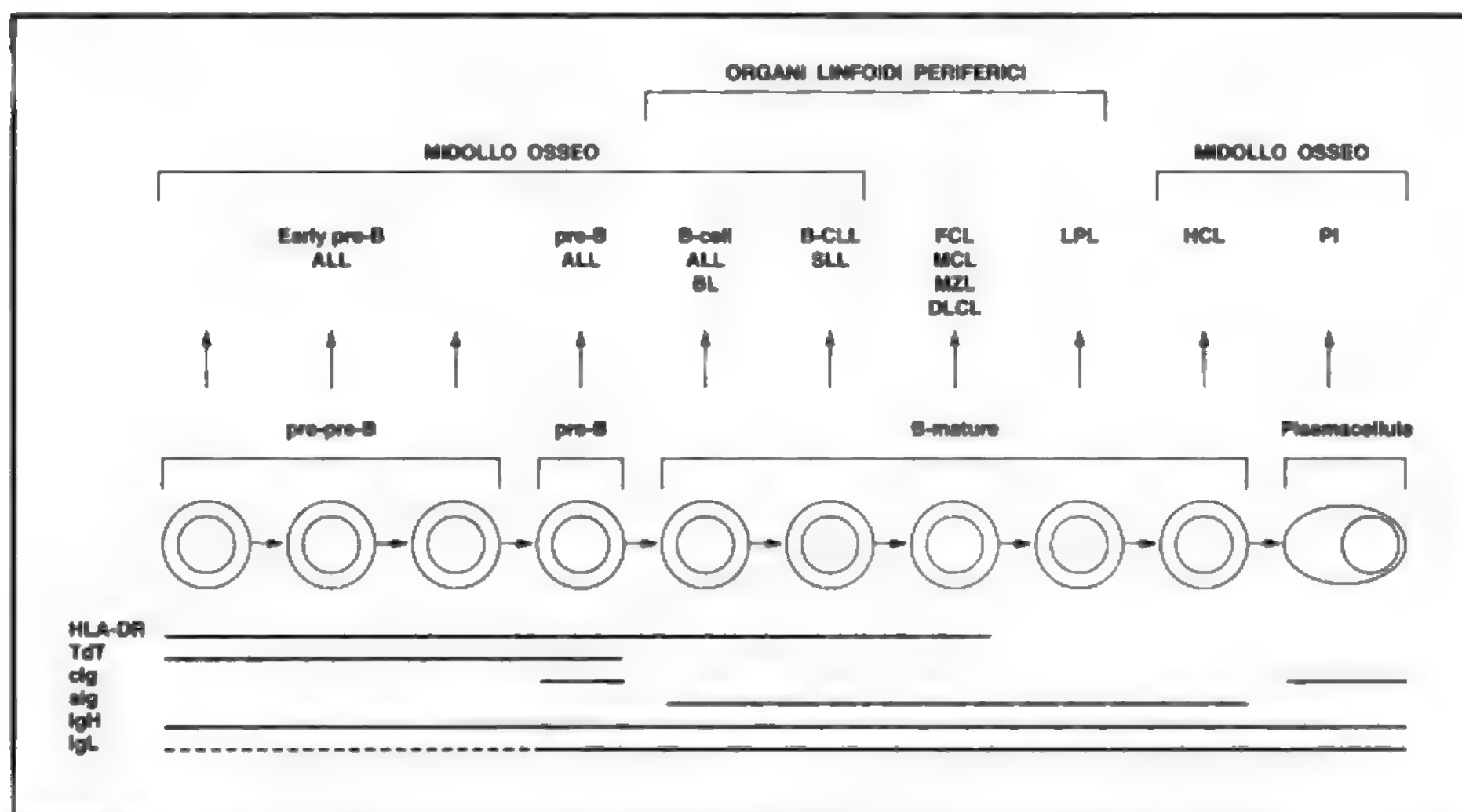


Fig. 45. Schema delle tappe differenziative/maturative della linea linfocitaria B: compartimentalizzazione anatomica e caratteristiche fenotipiche delle cellule linfoidei; livelli ontogenetici dei principali B-LNH.

ALL: leucemia linfocitica acuta; BL: l. di Burkitt; CLL: l. linfatica cronica; SLL: l. a piccoli linfociti; FCL: l. centrolinfoculare; MCL: l. a cellule mantellari; MZL: l. a cellule della zona marginale; DLCL: l. a grandi cellule, a proliferazione diffusa; LPL: l. linfoplasmacitoidale; PI: plasmacitoma; HCL: leucemia ricorrente; PI: plasmacitoma; HLA-DR: human lymphocyte antigen; TdT: deoxinucleotidiltransferasi terminale; cIg: immunoglobuline intracitoplasmatiche.

TAB. XIII. PRINCIPALI LESIONI GENETICHE REPERITE IN LINFOMI NON-HODGKIN

Oncogeni e antioncogeni	Anomalie cromosomiche strutturali	Frequenza (%)	Lesione funzionale	Tipo di linfoma
<i>c-myc</i>	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	30/80-100 100 5-20 ?	Deregolazione trascrizionale (DT) omotopica (O)	L. Burkitt endemico (80-100%) e sporadico (30%). L3 100% AIDS-BL FCL (cellule piccole o miste) 5-20% LNH-B diffuso LNH-B immunoblastico (< 20%) LNH «trasformato» (raro) AIDS-LNH-B a piccole cellule non clivate AIDS-LNH diffuso a grandi cellule
<i>lyt-10/NFKB-2</i>	t(10;14)(q24;q11)	1 15	perdita di una regione regolatrice	LNH-B a basso grado (rari SLL) L. cutaneo T-cellulare (CTCL)
<i>bcl-6</i>	t(3;...)(q27;...)	> 30 < 5	DTO	LNH-B diffuso (DLBCL <i>de novo</i> o trasformato) LNH-B follicolare
<i>bcl-1</i>	t(11;14)(q13;q32)	50-70	DT, sovraespressione di PRAD1 (ciclina D1)	LNH-B a cellule mantellari
<i>bcl-2</i>	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11)	70-90 90-100 100 20	DTO, sovraespressione di <i>bcl-2</i>	LNH-B follicolare (a cellule miste) DLBCL «trasformato» AIDS-LNH (DLCL) DLBCL <i>de novo</i>
<i>ras</i>	mutazioni puntiformi	?	attivazione costitutiva	AIDS-LNH
<i>p53</i>	mutazioni puntiformi	30-40 60 10-15 30 40 70-90 raro	inattivazione funzione trascrizionale	L. Burkitt (BL) AIDS-LNH (BL, DLCL) B-CLL/SLL Adult T cell L/L L. a cellule piccole non clivate MZL splenico L. «trasformato» CTCL; MZL/MALT-LNH
?	delezione 6q (del minima in 6q21-23 o 6q25-27)	20-30	perdita di loci putativi oncosoppressori	L. a cellule B di ogni istotipo e grado di malignità
<i>NPM/ALK</i>	t(2;5)(p23;q35)	40-80	DT eterotopica (gene di fusione)	ALCL-T CD30+
<i>PAX-5</i>	t(9;14)(p13;q32)	50	DTO	LPL
? <i>RBI</i>	del 13q14	20 50	perdita funzione trascrizionale	B-CLL/SLL B-CLL prolinfocitoide

Traslocazioni e deregolazione di protooncogeni in LNH-B

Protooncogene *bcl-2*. — La più frequente anomalia cromosomica rinvenuta in LNH-B è costituita da t(14;18)(q32;q21), che coinvolge l'unità trascrizionale *bcl-2* collocata in 18q21 ed espressa in condizioni normali in vari tessuti e nei linfociti B e T. La t(14;18) ne esalta la capacità trascrizionale: il *bcl-2* regola la sintesi di una proteina mitocondriale (26 kD) che svolge funzione anti-apoptica e promuove la sopravvivenza cellulare senza esplicare effetti ectoproliferativi. Nelle regioni occidentali la t(14;18) è presente in più del 70% dei l. centrofollicolari nodulari di ogni sottotipo e in una parte di quelli diffusi (Offit, 1992). Anche negli insoliti l. follicolari del tratto gastro-intestinale (compresi quelli di tipo «*poliposi linfomatosa multipla*») una iperespressione di *bcl-2* è presente nel 75% dei casi; il reperto può essere valorizzato per la differenziazione dai processi reattivi dei centri germinativi in seno al tubo digerente (in cui tale reperto manca costantemente) ed anche dai MALT-LNH del tubo digerente, in cui t(14;18) è per lo meno infrequente e forse del tutto assente (LeBrun *et al.*, 1992). In Giappone invece la sua frequenza è notevolmente più bassa.

Il riarrangiamento di *bcl-2* avrebbe luogo in cellule linfoide pre-B (Zelenetz *et al.*, 1992), ma ciò non comprometterebbe la progressione del linfoma fino alla fase matura propria dei l. follicolari. L'attivazione di *bcl-2* non sembra però sufficiente per un

completo svolgimento della linfomagenesi e si ritiene che al processo partecipino anche la selezione dei cloni alterati ad opera di una cronica stimolazione antigenica e lesioni cromosomiche addizionali, come del 6q27 (Gaidano *et al.*, 1992). Alla progressione di l. centrofollicolari verso forme altamente maligne contribuirebbe principalmente la mutazione dell'oncosoppressore *p53*, raramente un riarrangiamento di *c-myc*.

È interessante che in un ulteriore 20% di casi di l. follicolare si abbia — tramite traslocazioni diverse da t(14;18), quali t(2;18)(p11;q21) e t(18;22)(q21;q11) — una traslocazione di *bcl-2* (locus 18q21) in sedi prossime al locus 2p11 (*Ig_κ*) oppure al 22q11 (*Ig_λ*) del cromosoma partner, con analoga deregolazione dell'attività *bcl-2*.

La dimostrazione dell'attivazione di *bcl-2* contribuisce alla definizione diagnostica dei FCL ed assume valore prognostico peggiorativo nei l. a grandi cellule B. Il riarrangiamento di *bcl-2*, individuabile con PCR (*Polymerase Chain Reaction*) costituisce un importante marcatore genetico per valutare la malattia minima residua (Gaidano *et al.*, 1995).

Protooncogene *c-myc*. — Il protooncogene *c-myc* è una fosfoproteina nucleare, provvista di *domains* fondamentali che mediano l'omo- e l'eterodimerizzazione con specifiche proteine HLH-LZ (Gu *et al.*, 1993); *c-myc* viene reperito soprattutto in un comples-

so eterodimerico con la proteina basica MAX. L'interazione *c-myc*/MAX è necessaria perché *c-myc* svolga le funzioni di regolatore trascrizionale della sintesi di DNA e pertanto della proliferazione, differenziazione e progressione del ciclo cellulare. La traslocazione di *c-myc* nei LNH comporta effetti trascrizionali ad alti livelli.

Il coinvolgimento del protooncogene *c-myc* (8q24) si osserva in t(8;14)(q24;q32) e in altre traslocazioni (v. tab. XIII), presenti in numerose forme di LNH-B (in particolare nel BL e in L. immunoblastici plasmacitoidi), compresi LNH-AIDS correlati e LNH post-trapianto.

Protooncogene *bcl-1*. – In più del 50% di LNH-B mantellari e in taluni LNH-B con differenziazione linfoplasmatocitica è stata reperita la t(11;14)(q13;q32) (De Wolf-Peters e Pittaluga, 1994), che provoca giustapposizione al locus *IgH* (14q32) di sequenze di 11q13, sede del locus *bcl-1*. Il riarrangiamento di *bcl-1* comporta sovraespressione della ciclina CCND1, preposta alla regolazione del ciclo cellulare G₁-S.

Protooncogene *bcl-6*. – In più del 30% di LNH-B di tipo diffuso a grandi cellule e nel 20% di LNH AIDS-correlati, ma solo in meno del 5% di L. follicolari, figura un riarrangiamento del protooncogene *bcl-6* a seguito di t(3q27) in diverse traslocazioni reciproche che giustappongono il gene *bcl-6* ad uno dei geni codificanti per la sintesi delle catene immunoglobuliniche pesanti o leggere oppure ad altre sedi cromosomiche (9q13, 5q31, 1q21, 2q23, etc.). La spiccata promiscuità del break 3q27 costituisce un evento forse unico fra le traslocazioni proprie dei LNH a cellule B (Lo Coco *et al.*, 1994). È interessante che LNH caratterizzati da riarrangiamento di *bcl-6* insorgano elettivamente in sedi extralinfonodali, siano spesso privi di infiltrazione midollare ed abbiano prognosi relativamente favorevole (Offit *et al.*, 1994). È probabile che *bcl-6*, tramite una *Zinc finger protein*, partecipi al controllo della differenziazione e della proliferazione cellulare.

È da tenere presente che nei DLCL sono frequenti le anomalie aggiuntive, in più modi combinate, di altri oncogeni (*bcl-2*, *p53*, *c-myc*). A questa eterogeneità biologica, citogenetica e molecolare, fa da pendente l'eterogeneità morfologica e clinica dei DLCL.

Protooncogene *PAX-5*. – Un sottogruppo di L. linfocitici a piccole cellule con differenziazione linfoplasmatocitica (LPL), CD5 negative, mostra quale evento specifico la t(9;14)(p13;q32) (Offit *et al.*, 1994). Tale traslocazione coinvolge il protooncogene *PAX-5* situato nella regione genomica 9p13, codificante per un fattore trascrizionale specificamente preposto al controllo della proliferazione e differenziazione delle cellule B (Iida *et al.*, 1995). Si ritiene che la giustapposizione di *PAX-5* al locus *IgH* provochi deregolazione (attivazione) dell'espressione del gene.

Attivazione di protooncogeni tramite mutazione

Tale evenienza sembra limitata, nei L., alla famiglia *ras*. È di solito associata ad altre anomalie molecolari più specifiche dei singoli tipi di linfoma, e svolge certamente un ruolo nella progressione tumorale.

Inattivazione di geni per delezione o mutazione cromosomica

Le delezioni finora note e presumibilmente significative per la linfomagenesi, riguardano il braccio corto del cromosoma 17, il braccio lungo del cromosoma 6, il locus 13q14. Possono costituire la sola anomalia riscontrabile in determinati L. ma più frequentemente rappresentano un evento addizionale.

Il gene oncosoppressore *p53* (v. ANTIONCOGENI***) è situato nel segmento 17p13.1 e possiede funzione trascrizionale di inibitore della proliferazione cellulare. La compromissione di *p53* può avvenire per delezione monoallelica di variabili porzioni del braccio corto del cromosoma 17 comprendenti il locus 17p13.1, la cui perdita si associa spesso a mutazioni puntiformi dell'altro allele, inattivandone la funzione di legarsi al DNA e di espletare i suoi effetti normali (Hollstein *et al.*, 1991). Tali processi costituiscono la più comune anomalia genetica delle neoplasie in genere. Nell'ambito dei linfomi tali eventi sono stati reperiti, come evento unico, nel 60% dei LNH-B AIDS-correlati primitivi del S.N.C. Delezioni/mutazioni di *p53* sono osservate an-

che in LNH-B non AIDS-associati (L. di Burkitt sta endemico che sporadico, nel 30% dei casi) o di tipo T-cellulare (L. cutanei T periferici; ATLL). In L. d'altro tipo può essere rinvenuto quale evento addizionale di altre anomalie cromosomiche. Nel L. Burkitt la perdita funzionale o materiale del gene *p53* è associata ad attivazione di *c-myc*. Una mutazione di *p53* è presente in circa il 15% dei casi di B-CLL; la frequenza di inattivazione di *p53* subisce un incremento nei casi evolvuti verso la s. di Richter.

La perdita di 6q, soprattutto in due regioni di minima delezione denominate RMD-1 (mappata su 6q25-q27) e RMD-2 (mappata su 6q21-q23), è documentata in numerosi L. di linea B, talora quale alterazione cromosomica singola (nel 20% di AIDS-LNH), e più spesso associata ad altre anomalie. La del 6q21 è presente nel 20% dei L. centrofollicolari, specie se trasformati (Gaidano *et al.*, 1992). Nello SLL/CLL-B prolinfocitico la del 6q21 è associata spesso a progressione in L. di alto grado. Non è ancora chiara la conseguenza funzionale di 6q-, che appare associata a prognosi sfavorevole.

La delezione del segmento 13q14, presente nel 50% dei casi di L. a piccole cellule tipo SLL/CLL-B, coinvolge il gene oncosoppressore *RBI*, peraltro ancora poco noto (Liu *et al.*, 1995).

Altre anomalie cromosomiche

La letteratura segnala molteplici lesioni cromosomiche in L., in genere come eventi sporadici ed aneddotici.

Ricordiamo la trisomia 12, per la sua frequenza nella B-CLL (30-40% dei casi) e per la prognosi particolarmente severa che comporta (Offit *et al.*, 1991). In L. a piccoli linfociti maturi con interessamento extralinfonodale (probabilmente MALT-LNH) è stata descritta la t(11;18)(q21;q21) (Leroux *et al.*, 1993), che potrebbe caratterizzare un sottotipo di LNH-B di basso grado, intermedio tra L. linfocitico e MALT-LNH. La rottura in 10q24 è presente nel 7% di LNH-B di basso grado: coinvolge spesso il gene *lyt-10* (Neri *et al.*, 1991) (v. oltre). La t(9;14)(p13;q32) interessante 9p13, è presente in una frazione di L. linfoplasmatocitoidi (Offit *et al.*, 1992); la rottura in 1p32-36 e in 1q21-23, reperita in vari LNH, appare associata a più breve sopravvivenza mediana (Offit *et al.*, 1991).

Genomi virali

Per quanto attiene ai retrovirus ed ai virus di tipo erpetico implicati nella linfomagenesi e alla loro azione su protooncogeni, v. sopra *Etiologia*.

Lesioni genetiche nei LNH-T

Scarse sono le lesioni genetiche finora documentate nei LNH-T. Riarrangiamento di *c-myc*, delezione o mutazioni di *p53*, riarrangiamenti del gene *lyt-10/NFKB-2* sono stati reperiti anche in casi di LNH-T periferici, specie in L. cutanei.

Nel 50% dei casi di LNH-T CD30+ e di ALCL è presente la t(2;5)(p23;q35), che comporta fusione del gene NPM(5q25) con il gene ALK(2p23) (Morris *et al.*, 1994).

Anomalie genetiche nella malattia di Hodgkin (MH)

Le conoscenze circa le alterazioni cariotipiche e genetiche nella MH sono scarse (Haluska *et al.*, 1994). Benché nel tessuto primario di MH siano state reperite alterazioni cariotipiche eterogenee attribuibili con certezza a cellule H-RS, non è stata individuata alcuna anomalia citogenetica non-random specifica del L. In qualche caso di MH sono state reperite di recente (Trümper *et al.*, 1993) mutazioni dell'oncosoppressore *p53*. Ne deriverebbe l'accumulo nel nucleo delle cellule H-RS di fosfoproteine stabili che, con proteine di tipo selvaggio, formano etero-oligomeri inattivi (Gupta *et al.*, 1993). Una via alternativa di inattivazione dell'effetto soppressivo dell'accrescimento cellulare (Mormand *et al.*, 1992) potrebbe essere sostenuta dall'espressione in cellule H-RS di livelli abnormemente elevati della proteina MDM2, con conseguente occultamento del domain funzionale di *p53* di tipo selvaggio e blocco della sua

fisiologica attività di fattore oncosoppressore. Nella stessa cellula H-RS sono stati talora riscontrati sia abnorme accumulo di MDM2 sia mutazioni di *p53* (Chilosi *et al.*, 1994). È dubbio se nell'inattivazione di *p53* sia implicato l'EBV.

Riarrangiamento dell'oncogene *bcl-2* in associazione a t(14;18) è stato rinvenuto in qualche caso di MH, soprattutto nel sottotipo a prevalenza linfocitica (LP). Si tende ad interpretarlo come evento di «evoluzione clonale» di MH in un LNH follicolare.

Bibliografia

- Chilosi M., Doglioni C., Menestrina F. *et al.*, *Blood*, 1994, **84**, 4295.
 De Wolf-Peters C., Pittaluga S., *Ann. Oncol.*, 1994, **5** (Suppl. 1), 535-537.
 Gaidano G. L., Dalla-Favera R., *Molecular biology of lymphoid neoplasms*, in Mendelsohn J., Howley P. M., Israel M. A., Liotta L. A. eds., *The molecular basis of cancer*, 1995, Saunders, Philadelphia, pp. 251-279.
 Gaidano G. L., Dalla-Favera R., *Molecular biology of lymphomas*, in DeVita V., Hellmann S., Rosenberg S. A. eds., *Cancer. Principles and practice of oncology*, 1997, Lippincott, Philadelphia, 2131-2142.
 Gaidano G. L., Hauptschein R. S., Parsa N. Z. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 1781.
 Gaidano G. L., Pastore C., Volpe G., *Haematologica*, 1995, **80**, 1995.
 Gu W., Cechova K., Tassi V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 2935.
 Gruss H. G., Kadin M. E., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9**, 417-446.
 Gupta R. K., Patel K., Bodmer W. F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 2817.
 Haluska F. G., Brubsky A. M., Canellos G. P., *Blood*, 1994, **84**, 1005.
 Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C., *Science*, 1991, **253**, 49.
 Iida S., Rao P., Butler M. *et al.*, *Blood*, 1995, **86** (Suppl. 1), 430a.
 Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore.
 Le Brun D. P., Kamel O. W., Clearly M. L. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1992, **140**, 1327-1335.
 Leroux D., Seité P., Hillion J. *et al.*, *Genes Chromosom Cancer*, 1993, **7**, 54-58.
 Liu Y., Hermanson M., Grander D. *et al.*, *Blood*, 1995, **86**, 1911.
 Lo Coco F., Ye B. H., Lista F. *et al.*, *Blood*, 1994, **83**, 1757.
 Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C. *et al.*, *Cell*, 1992, **69**, 1237.
 Morris S. W., Kirstein M. N., Valentine M. B. *et al.*, *Science*, 1994, **263**, 1281.
 Neri A., Chang C. C., Lombardi L. *et al.*, *Cell*, 1991, **67**, 1075.
 Offit K., *Leuk. Lymph.*, 1992, **7**, 275-282.
 Offit K., Lo Coco F., Louie D. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 74.
 Offit K., Parsa N. Z., Filippa D. A. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 2594.
 Offit K., Wong G., Filippa D. A. *et al.*, *Blood*, 1991, **77**, 1508-1515.
 Trümper L. H., Brady G., Bagg A. *et al.*, *Blood*, 1993, **81**, 3097.
 Zelenetz A. D., Chen T. T., Levy R., *J. Exper. Med.*, 1992, **176**, 1137.

SEDI DI ESORDIO, DIFFUSIONE METASTATICA, LEUCEMIZZAZIONE DEI LINFOMI

Generalità

I l. si sviluppano costantemente nell'ambito di *preesistenti strutture linfatiche*, con particolare frequenza in *linfonodi* ma anche in sedi *extralinfonodali* (24-48% dei casi, in larga prevalenza LNH). Non vi è tuttavia accordo generale sulla *definizione di sede extralinfonodale*, se vi si debbano comprendere o meno gli organi linfoidi centrali (midollo osseo, timo) e, tra le strutture linfoidi periferiche, la milza e l'anello di Waldeyer comprese le tonsille. Le placche di Peyer del digiuno e le altre strutture linfoidi di tipo MALT primario e secondario sono da tutti considerate extralinfonodali. Milza e tonsille vengono spesso assimilati ai linfonodi: l'anello di Waldeyer è in genere considerato — in stadiazioni di LNH — come organo linfonodale ed invece quest'ultimo extralinfonodale in stadiazioni di MH.

Isaacson e Norton (1994) considerano quali extralinfo-

nodali i l. che si presentano all'esordio con esclusiva o maggiore massa neoplastica in una sede non linfonodale, ed elencano le seguenti localizzazioni, in ordine decrescente di frequenza: tratto gastro-intestinale, cute, anello di Waldeyer, ghiandole salivari, timo, annessi oculari, tiroide, polmone, testicolo; a rigore dovremmo aggiungervi milza e midollo osseo. In linea di massima seguiremo il loro criterio.

I diversi sottotipi di l. insorgono in *sedi anatomiche preferenziali* non univoche e sono caratterizzati da *peculiari modalità di disseminazione metastatica* e di *diffusione territoriale*. Anche da questo punto di vista la MH si distingue per più aspetti dai LNH, ma pure nell'ambito di questi ultimi l'eterogeneità dei comportamenti è notevole.

Sedi di esordio e diffusione metastatica

Malattia di Hodgkin

Notevolmente diverse da caso a caso sono la frequenza dell'insediamento hodgkiniano primario nelle varie stazioni linfonodali e la frequenza delle sedi successivamente coinvolte dal processo morboso, in rapporto con plurimi possibili meccanismi di disseminazione.

Le sedi linfonodali più spesso colpite all'esordio sono le sovraclaveari e laterocervicali, le mediastiniche anteriori alte, le ascellari; seguono la celiaca, le lombo-aortiche e le iliache; più raramente sono interessate le inguinali. I distretti mesenterici, ipogastrici, presacrali mediani, epitrocleari, poplitei sono coinvolti solo occasionalmente, sia all'esordio che in fase di successiva disseminazione. La diffusione non è peraltro mai ubiquitaria e spesso nemmeno vasta, tranne che in fase terminale.

Tra gli organi extralinfonodali primariamente coinvolti figura in primo luogo la milza, indi il timo, mentre insolitamente interessati sono polmone e stomaco, raramente fegato e cute, eccezionalmente muscolatura scheletrica e mammella.

Frequente è la *diffusione* del processo hodgkiniano per *continuità* ad organi adiacenti a masse linfomatose, tramite il tessuto connettivo lasso perilinfonodale e periviscerale. Più importante è tuttavia la *disseminazione* dalla sede linfonodale iniziale ad altre stazioni linfatiche, che in più del 90% dei casi non appare casuale, ma segue, per *contiguità*, note vie linfatiche efferenti ed è pertanto entro certi limiti prevedibile. A seguito di sistematiche indagini clinico-radiologiche e laparotomiche (Kaplan, 1980) sono state individuate *modalità preferenziali di propagazione interlinfonodale*: tali il coinvolgimento di linfonodi cervicali inferiori e sovraclaveari del lato sinistro, stazioni para-aortiche lombari superiori e/o linfonodi dell'ilo splenico, milza; del pari tipica è l'associazione di localizzazioni nelle sedi cervicali inferiori e sovraclaveari destre e nei linfonodi mediastinici ed ilo-polmonari. Anche se ricerche successive non sempre hanno confermato la regolarità di queste modalità di diffusione preferenziale da parte delle localizzazioni linfonodali primarie del lato sinistro o destro del collo, è indubbio che l'interessamento sottodiaframmatico presenta una correlazione inversa con quella mediastinica.

Per spiegare taluni quadri di propagazione metastatica di tipo non contiguo né per continuità (circa il 10% dei casi) è necessario invocare una diffusione metastatica per *via linfatica retrograda* (in rapporto ad inversione del flusso linfatico interstazionale, in specie nel dotto toracico) oppure — e molto più frequentemente — per *via ematica*. È stato documentato che nel 10% dei casi (una percentuale sorprendentemente analoga a quella della disseminazione per vie non contigue) e soprattutto nelle fasi avanzate di malattia, è possibile osservare la presenza di cellule H-RS

nella parete e nel lume dei vasi sanguigni linfonodali, splenici e viscerali.

Tali eventi sono in parte correlati al *sottotipo istologico* della MH: il sottotipo PL esordisce in stazioni cervicali alte nel 44-70% dei casi e raramente si diffonde al mediastino; i sottotipi MC e LD tendono anch'essi a risparmiare all'esordio il mediastino ma mostrano elevata frequenza alla precoce disseminazione ematogena; il sottotipo NS viene reperto all'esordio nel mediastino con frequenza 15 volte superiore rispetto a tutti gli altri sottotipi globalmente considerati. È presumibile che frequenza di disseminazione ematogena e particolari orientamenti dello *homing* delle cellule H-RS siano anche in rapporto alla presenza negli endoteli venulari di *molecole di adesione* intercellulare, quali ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, di cui le cellule H-RS sembrano prive (Cordell *et al.*, 1992).

Linfomi non-Hodgkin (LNH)

L'origine dei LNH è uni- o pauci-stazionale ed ha luogo, in larga prevalenza, in una struttura linfoide periferica: nel 75% dei casi è coinvolta la linea B (in sedi linfonodali o extralinfonodali, MALT comprese) e nel 25% dei casi la linea T (più spesso in sede linfonodale che extralinfonodale). È insolito che l'esordio avvenga in organi linfoidi centrali, diversamente dalle leucemie.

Mentre nella MH le sedi di esordio sono relativamente costanti e quelle di diffusione metastatica appaiono spesso prevedibili, i LNH mostrano a questo riguardo eterogeneità di comportamento di gran lunga maggiore.

Tali eventi sono certamente in rapporto con le caratteristiche morfo-biologiche ed ontogenetiche delle cellule neoplastiche, ma i nessi tra parametri citologici, sedi di esordio e quadri di disseminazione dei LNH possono essere tracciati solo per linee generali, giacché — per motivi in buona parte ancora ignoti — pure nell'ambito di entità nosologiche apparentemente univoche o molto simili si possono osservare situazioni anatomico-cliniche anche notevolmente diverse.

La migrazione delle cellule linfomatose al di fuori delle sedi di origine ed il loro stazionamento metastatico avvengono con modalità plurime.

Sono proprie dei LNH sia la *propagazione per contiguità* ad altre stazioni linfonodali (tramite vasi linfatici efferenti) e l'*invasione per continuità* di organi adiacenti, sia — e pressoché costantemente — la *disseminazione per via ematica*. Quest'ultimo processo può realizzarsi con due distinte modalità: *tramite i vasi linfatici efferenti ed il dotto toracico* che sbocca nella vena succlavia sinistra, oppure *per immissione diretta nel circolo venoso*. Il comportamento dei linfociti linfomatosi ricorda gli eventi propri del ricircolo dei linfociti normali, di cui la fig. 47 fornisce uno schema delle *vie percorse* e della *distribuzione quantitativa del traffico* (Pabst, 1988).

In condizioni fisiologiche le caratteristiche dello *homing* delle popolazioni linfocitarie B e T dipendono largamente (almeno nel topo) dal compartimento da cui traggono origine.

Si è osservato che mentre i linfociti non attivati circolano indifferentemente in tutti i distretti linfoidi, i B attivati affluiscono preferenzialmente ai tessuti MALT, quelli T attivati ai linfonodi periferici; le cellule memoria antigene-specifiche ritornano preferenzialmente nei compartimenti di origine (MALT, linfonodi periferici) (Butcher, 1990). Il diverso comportamento dei linfociti circolanti ed il loro *homing* non casuale sono in rapporto alla presenza, alla stimolazione o all'inibizione di particolari molecole glicoproteiche (*molecole di adesione cellulare*, CAM) espresse sui linfociti e/o sulla membrana («*addressine*», Ad) degli endoteli attivati propri delle venule postcapillari ad endotelio alto (*high endothelial venules*, HEV) presenti nella paracorticale dei linfonodi periferici

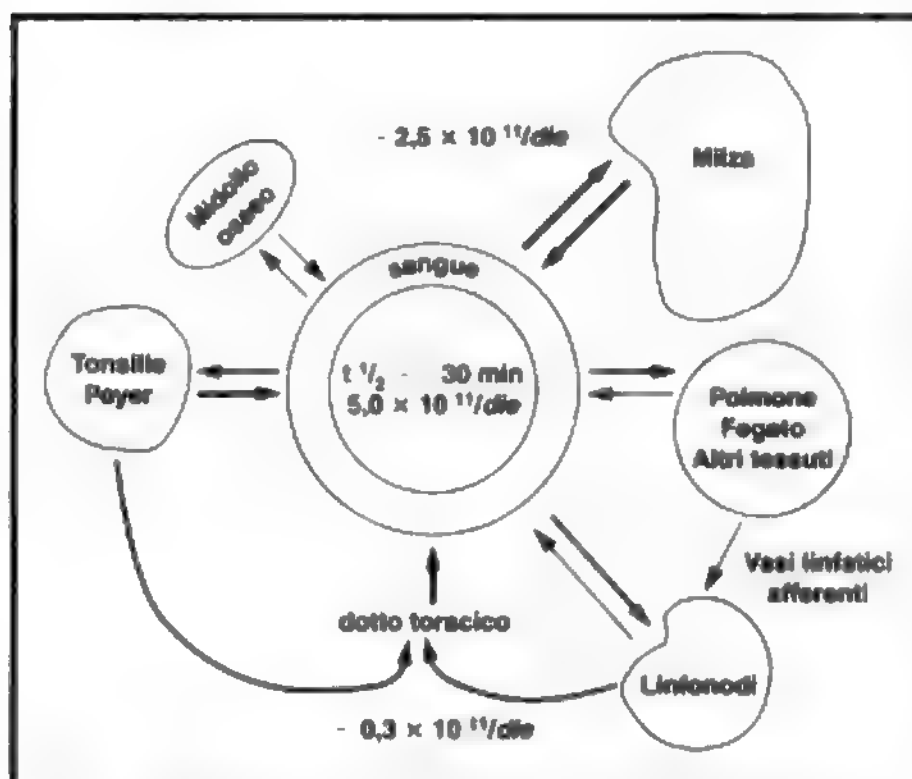


Fig. 47. Rappresentazione schematica del traffico linfocitario tra sangue periferico e organi linfoidi in un giovane adulto. Lo spessore delle frecce indica l'entità del traffico. (Da Pabst R., *Immunology to day*, 1988, 9, 43, ridisegnata).

(PNAd) e nelle aree T-cellulari delle strutture mucose MALT (MAd), ed in parte atte a stabilire pure legami con molecole della *matrice extracellulare* (ECM): laminina, fibronectina, vitronectina, collagene I e IV, ac. ialuronico, proteoglicani, trombospondina, etc. (*substrate adhesion molecules*, SAM). Per più dettagliate notizie sulle molecole di adesione, si rinvia alla corrispondente voce (V. ADESIONE, MOLECOLE DI*, coll. **69-88).

Molte notizie sul ricircolo dei linfociti e sulle funzioni delle CAM derivano da ricerche svolte su topini normali o immunodeficienti e su neoplasie solide e L. murini, e si sono riscontrate notevoli concordanze con quanto si è potuto appurare con indagini sull'uomo normale, su soggetti affetti da flogosi croniche e nel cancro, mentre gli studi sui linfomi dell'uomo sono ancora incompleti.

È probabile (Inghirami e Knowles, 1992) che analogamente alla situazione fisiologica, anche nei LNH la migrazione e la distribuzione dei linfociti linfomatosi siano in rapporto con la presenza ed il grado di espressione di varie molecole di adesione cellulare, oltre che con fattori solubili atti ad attivare le cellule endoteliali (IL-1, TNF, INF γ). La carenza di studi sistematici su ampie casistiche non consente ancora di avanzare interpretazioni generali dei fenomeni in questione. Qualche orientamento comunque comincia ad emergere (Terpe *et al.*, 1994; Teral *et al.*, 1998): a) i LNH di alto grado a prognosi sfavorevole mostrano spiccata iper-regolazione di CD44-3v e di CD44-6v ed una iporegolazione delle integrine α_5 e β_4 ; b) la positività di CD44-3v e di CD44-6v può pertanto essere valorizzata nella DD tra LNH altamente o debolmente aggressivi; c) l'espressione della molecola intracellulare di adesione ICAM-1 è variamente positiva o negativa nei LNH, non correlata con il sottotipo istologico ma con la disseminazione del L (i pazienti con espressione negativa o debole presentano più spesso stadio IV, coinvolgimento extralinfonodale, infiltrazione midollare) e con la prognosi (più favorevole nei pazienti positivi).

Leucemizzazione dei linfomi

In qualche caso avanzato di MH, singole cellule H-RS (in genere nuclei nudi) sono state reperite nel sangue periferico, ma veri e propri quadri di *leucemizzazione* hodgkiniana non sono stati ancora sicuramente osservati.

La presenza nel sangue periferico di cellule linfomatose è invece un evento pressoché costante nei LNH-B, ma non infrequente anche nei LNH-T. La massa della popolazione linfomatosa circolante varia però ampiamente da tipo a tipo di LNH, da caso a caso ed in rapporto alla fase del

LINFOMI

TAB. XIV. FREQUENZA (%) DI LEUCEMIZZAZIONE IN LNH

(Da Bain e Catovsky, 1995, ed altre fonti bibliografiche)

Linfoma	Coinvolgimento midollare all'esordio	Coinvolgimento sangue periferico	
		all'esordio	nel corso di malattia
L. linfocitico (SLL)	52	mai	incostante
L. splenico a l. villosi (SLVL)	> 80	100	100
Immunocitoma (LPL)	63	< 50	60
Tricoleucemia (HCL)	100	100	100
L. centrofollicolare (FCL, cb/cc)	35	14	< 30
L. mantellare (MCL)	59	insolito	25
L. zona marginale (MZL)	38	insolito	insolito
MALT-LNH	1-2	raro	raro
L. a grandi cellule, centroblastico	16	2	3
L. a grandi cellule, immunoblastico	28	< 5	13
L. Burkitt endemico	16	raro	insolito
sporadico	< 30	insolito	5-10
AIDS-BL	24-76	frequente	frequente
Micosi fungoide (MF)	raro	insolito	insolito
Sindrome Sézary (SS)	insolito	18	48
ATLL	100	80	100
T-linfoblastico	30-60	insolito	frequente

decorso (tab. XIV). Spesso è quantitativamente modesta e non costante nel tempo. Nel 30-40% dei pazienti linfomatosi con reperti emocromocitometrici apparentemente normali la presenza di una componente di linfociti con caratteristiche clonali è svelabile solo mediante indagini immunocitologiche e citofluorometriche. Si reputa che l'analisi del «clonal excess» possa svelare la presenza nel sangue periferico di una popolazione linfoide monoclonale dello 0,1% della totalità dei linfociti circolanti. La piccola frazione di cellule linfomatose nel circolo periferico è rivelatrice del «traffico» circolatorio dei linfociti linfomatosi ma non significa che il l. abbia subito una trasformazione leucemica. Tale diagnosi richiede: a) la presenza di una concentrazione ematica di cellule linfomatose convenzionalmente fissata ad un livello di almeno $5,0 \times 10^9/L$; b) la presenza di infiltrazione midollare di blasti non inferiore al 25%, in forma diffusa o iuxta-trabecolare. Il solo reperto di infiltrazione linfomatosa del midollo osseo non comporta il giudizio di leucemizzazione del l., ma nella fase leucemica il midollo osseo è sempre infiltrato, con rare eccezioni (sindrome di Sézary). In taluni casi è il reperto citoematologico che induce al sospetto di LNH.

Non è nota la *patogenesi* dell'evoluzione leucemica di un LNH. Si suppone che l'espressione sugli elementi linfoidei di integrina $\alpha 5$ sia codeterminante della leucemizzazione (Möller *et al.*, 1992).

È da sottolineare infine il *significato prognostico dell'espressione leucemica nel l.* La presenza di screezio leucemico o di quadro ematico francamente leucemico all'esordio di LNH a basso grado di malignità non assume di solito significato prognostico peggiorativo, a meno che il

midollo osseo non sia largamente infiltrato e la concentrazione di cellule linfomatose nel sangue periferico non sia massiccia ($> 50 \times 10^9/L$), e ciò in particolar modo nel l. centrofollicolare (Romaguera *et al.*, 1991) e nel l. mantellare (Zucca *et al.*, 1994). Al contrario la tardiva leucemizzazione di un l. siffatto e tutte le espressioni leucemiche, sia precoci che tardive, in l. ad alto grado di malignità sono sempre associate a rapida progressione del l. Soprattutto i l. leucemizzati di tipo linfoblastico o indifferenziato comportano sempre prognosi severa.

Bibliografia

- Butcher E. C., *Am. J. Pathol.*, 1990, **136**, 3-11.
 Carlos T. M., Harlan J. L., *Blood*, 1994, **84**, 2068-2101.
 Cohen M. B., Griebing T. L., Ahaghotu C. A. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1997, **107**, 56-63.
 Cordell J. L., Pulford K., Turley H. *et al.*, *J. Clin. Pathol.*, 1994, **47**, 143-147.
 Hynes R. O., *Cell*, 1992, **69**, 11.
 Inghirami G., Knowles D. M., *The immune system: Structure and function*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 27-72.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Kaplan H. S., *Hodgkin's disease*, 1980, 2 ed., Harvard Univ Press, Cambridge.
 Moller P., Eichelmann A., Koretz K., Mechttersheimer G., *Leukemia*, 1992, **6**, 256-264.
 Nakamura S., Suchi T., Koshikawa T. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 284-296.
 Picker L., *Ann. Rev. Immunol.*, 1992, **10**, 561-591.
 Romaguera J. E. R., McLaughlin P., North L. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1991, **9**, 762-769.
 Teral M. J., Lopez-Guillermo A., Bosch F. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1998, **16**, 35-40.
 Terpe H. J., Koopmann R., Imhof B. A., Günther U., *J. Pathol.*, 1994, **174**, 89-100.
 Zucca E., Fontana S., Raggero E. *et al.*, *Leuk. Lymphoma*, 1994, **13**, 105-110.

CARLO MAURI

STADIAZIONE E DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

SOMMARIO

Generalità (col. 3324). - **Indagini raccomandate per accertare la diagnosi e l'estensione dei linfomi** (col. 3326): **Tipi di stadiazione**. - **Anamnest.** - **Esame obiettivo**. - **Esami di laboratorio**. - **Diagnostica per immagini**. - **Osteomieliobiopsia**. - **Esame istocitologico di materiale biopsico**. - **Esame citologico dei versamenti**. - **Rachicentesi ed esame citologico del liquor**. - **Criteri di stadiazione** (col. 3344): **Graduazione dello stato di validità e valutazione dei fattori prognostici pre-trattamento**.

Generalità

Lo studio dell'estensione anatomica dei l. è stato approfondito negli anni '60 grazie ad esami radiologici sistematici (comprendenti anche la linfografia oleosa bipedale addomino-pelvica) e ad interventi laparotomici associati a splenectomia ed a multiple biopsie di linfonodi e di visceri addominali. Ne emerse che gli esami clinico-radiologici tradizionali sottostimavano nella MH almeno del 30% la frequenza di localizzazioni addominali clinicamente silenti, accertate invece dagli interventi invasivi.

Poiché all'epoca l'unico trattamento potenzialmente eradicante dei linfomi era quello radioterapico (impostato tecnicamente su irradiazioni «involved field») e la (mono) chemioterapia del tempo esplicava efficacia notevolmente inferiore, apparve necessario standardizzare gli esami routinari clinico-radiologici-laboratoristici utili per la definizione diagnostica della neoplasia e completarli con esami invasivi (laparotomia, splenectomia) atti ad accertare adeguatamente sede ed entità delle localizzazioni sottodiaframmatiche, sì da collocare la malattia nel suo esatto stadio di diffusione. Tali procedure tendevano in primo luogo

a chiarire le indicazioni della radioterapia rispetto alla chemioterapia e a suggerire una erogazione delle radiazioni ionizzanti tecnicamente ottimale (irradiazione a campi allargati, a mantellina sopradiaframmatica e ad Y rovesciata sottodiaframmatica; v. LINFOMI, VIII, 1965-1966; fig. 34). In secondo luogo avevano lo scopo di acquisire elementi prognostici attraverso l'elaborazione di un semplice sistema di stadiazione. Infine si confidava di facilitare, in tal modo, la corretta comparazione dei trials terapeutici condotti da istituzioni diverse.

La normativa elaborata dalla Ann Arbor Conference (Carbone *et al.*, 1971; Rosenberg *et al.*, 1971) tenne originariamente presente la sola MH, ma in seguito fu estesa anche ai LNH (Rosenberg *et al.*, 1977), benché le esigenze diagnostiche e terapeutiche delle due classi di l. non fossero certamente omogenee, *in primis* per la frequenza nei LNH di localizzazioni in sedi non contigue e precocemente disseminate e per il non insolito e spesso primario coinvolgimento di aree extralinfonodali. Nuove acquisizioni nel campo della chemioterapia antitumorale e della radioterapia, lo sviluppo sorprendente della diagnostica per immagini e non ultima l'esperienza clinica hanno modificato nel successivo trentennio numero, tipologia ed importanza degli esami consigliati in origine, ma le linee cardinali impostate ad Ann

Arbor appaiono valide ancor oggi, sia per lo studio diagnostico dei pazienti linfomatosi che per le previsioni prognostiche deducibili dalla stadiazione della malattia.

Indagini raccomandate per accertare la diagnosi e l'estensione dei linfomi

I procedimenti proposti dalla Ann Arbor Conference (1971), emendati secondo la prassi odierna, sono elencati nella tab. XV. È opportuno aggiungere qualche commento.

Tipi di stadiazione

Nella formulazione originale venivano previsti due distinti tipi di stadiazione: a) *stadiazione « clinica » (SC)*, rivolta soprattutto ad accertare la natura del l. e a delinearne l'estensione ricorrendo ad interventi non invasivi, eccetto quelli di exeresi biotica (linfonodo o altra sede linfomatosa) necessari per l'imprescindibile diagnosi istopatologica; b) *stadiazione « patologica » (SP)*, rivolta al completamento dello studio circa l'estensione del processo morboso in sedi profonde, in primo luogo in campo addominale, ricorrendo alla laparotomia esplorativa, con splenectomia e biopsie multiple epatiche e linfonodali addominali. La SP offre maggiori garanzie di accertare la reale estensione del processo in campo addominale poiché anche le attuali pur affinate tec-

TAB. XV. INDAGINI RACCOMANDATE PER ACCERTARE LA DIAGNOSI E L'ESTENSIONE (STADIAZIONE) DEI LINFOMI (MH E LNH)

(Ann Arbor Conference, 1971; normativa modificata secondo la prassi attuale)

Esami clinici e di laboratorio

1. *Anamnesi dettagliata.*
2. *Esame obiettivo accurato*, con particolare riguardo alle sedi e al numero delle linfadenomegalie superficiali, all'anello di Waldeyer, al volume della milza e del fegato, alla dolenzia di segmenti scheletrici, a lesioni cutanee.
3. *Esami laboratoristici routinari*: VES; emocromocitometria con attento esame della morfologia linfocitaria nel sangue periferico, completato in casi di sospetto LNH da indagini citochimiche e dalla tipizzazione immunofenotipica dei linfociti circolanti; LDH; sideremia, transferrinemia, ferritinemia, cupremia; beta-2-microglobulinemia; uricemia; tests di funzionalità epatica e renale; protidemia totale ed elettroforesi del siero; anti-HIV.
4. *Esami laboratoristici eventuali od opzionali*: dosaggio Ig; immunoelettroforesi del siero; crioglobulinemia; frazioni del complemento; elettroliti; test di Coombs, aptoglobina; fibrinogenemia; idrossiprolinuria; tests sierologici per EBV.
5. *Monitoraggio immunologico*: tests cutanei: Mantoux con tubercolina vecchia o PPD; eventualmente Candida, Varidasi, immunizzazione verso neoantigeni (DNCB).

Esami diagnostici per immagini

6. *Esami radiologici routinari*: Rx torace (2 proiezioni); TC toraco-addomino-pelvica; ecografia addominale e/o di organi superficiali (linfonodi in sedi superficiali-profonde del collo, tiroide, parotidi, testicoli, di cui clinicamente si possa sospettare l'interessamento).
7. *Esami radiologici eventuali od opzionali*: RM; Rx scheletro (rachide, pelvi, estremità prossimali degli arti; aree scheletriche clinicamente sospette); Rx tubo digerente completo; urografia; scintigrafia whole body (^{67}Ga -citrato), scintigrafia dello scheletro total body ed altre tecniche scintigrafiche; PET; linfografia oleosa bipedale addomino-pelvica con mezzo di contrasto oleoso.

Esami invasivi routinari

8. *Biopsia chirurgica all'esordio* (ai fini della diagnosi istopatologica) di uno o più linfonodi superficiali o profondi o di qualsiasi lesione extralinfonodale primaria solitaria di sospetta natura linfomatosa, oppure in corso di malattia, qualora si sospetti un processo di trasformazione o un secondo tumore.
9. *Osteomielobiopsia e agoaspirato midollare.*
10. *Rachicentesi* (ed esame citologico del liquor) limitatamente ai LNH ad alta malignità o in caso di sospetta localizzazione meningo-encefalica.

Esami invasivi eventuali od opzionali

11. *Laparotomia con splenectomia e biopsie multiple* dei lobi epatici destro e sinistro, dei linfonodi addominali o di altre lesioni sospette.
12. *Laparoscopia* (eventuale) con *biopsie multiple* del fegato (e/o della milza).
13. *Paracentesi di ogni versamento* (pleurico, pericardico, addominale) con esame citologico del sedimento.
14. *Endoscopia gastroduodenale e/o coloscopia* (con biopsie).

Graduazione dello stato di validità e valutazione di fattori prognostici pre-trattamento

15. *Performance status*
16. *Indici prognostici*

niche di diagnostica per immagini non permettono certamente di svelare le minime localizzazioni occulte dei l., mentre ciò è più facilmente raggiungibile con l'esame istologico seriato della milza, di linfonodi o di biopsie epatiche o di qualsiasi altra lesione viscerale sospetta. La sistematica applicazione di almeno due moderni metodi diagnostici radiologici riduce tuttavia notevolmente le discrepanze tra le due modalità di stadiazione.

Bisogna tenere anche presente che esistono remore alla esecuzione completa dei procedimenti invasivi di stadiazione, che possono trovare anche precise *controindicazioni*: gravidanza, età inferiore ai 15 anni o superiore ai 65, rischio operatorio, insufficienza funzionale di alcuni apparati, mancato consenso dei pazienti. La *splenectomia* è sconsigliabile in particolare in bambini (specie di età inferiore ai 6 anni), onde non aggravare l'immunodepressione propria dei l. e causare gravi sepsi. L'atto operatorio in sé non è esente da possibili complicazioni minori e maggiori (mortalità < 0,75%). Infine sembra che la splenectomia diagnostica (per lo meno in casi di MH) costituisca un fattore di rischio per quanto attiene allo sviluppo di leucemie acute secondarie o di mielodisplasia in soggetti successivamente sottoposti a terapia combinata, in particolare se di età superiore ai 40 anni (Tura *et al.*, 1993). Per tali motivi e per lo sviluppo delle tecniche radioterapiche e per l'efficacia eradicante raggiunta da molti schemi di chemioterapia antitumorale (impiegata ora sovente anche negli stadi I-IIA sopra-diagrammatici, che erano appannaggio della radioterapia), le indicazioni e l'utilità della stadiazione laparotomica e degli interventi invasivi in genere sono state molto ridimensionate. L'intervento chirurgico in campo toracico viene effettuato solo in casi di massa mediastinica o polmonare primaria isolata, ai fini della diagnosi istopatologica, qualora fallisse l'agobiopsia TC-guidata. Nella MH la laparotomia può essere prospettata ancor oggi in stadio clinico

I-IIA, se si presume che i reperti con essa ottenibili possano influenzare la programmazione terapeutica. Ne sono invece esclusi tutti gli stadi B e gli stadi IIIA-IV di tutti i sottotipi istopatologici della MH, in quanto per essi è sempre prevista la polichemioterapia citostatica. Inoltre negli stadi B la presenza di segni generali di malattia, se gravi, impongono di non frapporte indugi all'inizio della terapia. La laparotomia esplorativa è del resto attuabile, se ritenuta utile (accertamento della guarigione), in un secondo tempo, in fase di *restaging* a conclusione della terapia. Nei LNH le remore ad effettuare procedimenti invasivi a fini prognostici sono ancora più forti che nella MH, sia per il fatto che in molti casi la sola stadiazione clinica rivela già all'esordio una disseminazione avanzata della malattia (stadi III-IV), sia perché si tratta per lo più di pazienti anziani, sia infine perché nella programmazione terapeutica dei LNH predomina largamente il ricorso alla chemioterapia e la radioterapia ha in genere posizione solo ancillare. Rari sono i casi di LNH SC IA candidabili alla sola radioterapia, in cui possa essere indispensabile ottenere una convalida con la stadiazione patologica.

Anamnesi

Si deve appurare in particolare l'epoca di esordio di eventuali linfadenomegalie superficiali o di segni e sintomi di localizzazioni linfonodali profonde (addominali o mediastiniche) e/o di epato-splenomegalia nonché di eventuali «*sintomi sistemici*», quali febbre ricorrente o febbre conclamata (continua, intermittente, ondulante), sudorazione (notturna, al collo e alla nuca), rilevante calo ponderale (> 10% negli ultimi 6 mesi), prurito grave «*sine causa*»; se venga avvertito in stazioni linfonodali dolore indotto da alcolici; se il paziente sia un soggetto a rischio per AIDS.

Esame obiettivo

Importante è apprezzare esattamente sede, numero, caratteristiche semeiologiche dei *linfonodi superficiali* (dimensioni, superficie, con-

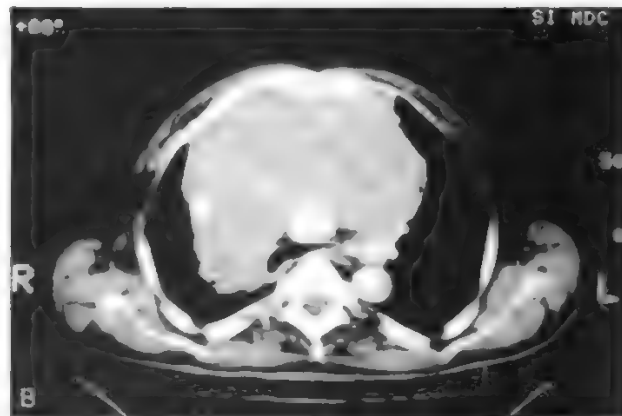


Fig. 48. Malattia di Hodgkin. Torace. A) Radiografia. Voluminosa massa (*bulky*) mediastinica a sviluppo asimmetrico. B) TC. L'esame TC consente di valutare con maggiore precisione le dimensioni della massa linfadenopatica del mediastino anteriore e medio ed i rapporti che questa contrae con la parete toracica e le strutture vascolari, che appaiono dislocate. La parete della vena cava superiore è verosimilmente infiltrata dal l.

sistenza, spostabilità, dolenzia spontanea o provocabile): ne possono discendere elementi significativi per la diagnosi differenziale tra i vari tipi di l. e tra questi e le linfadenomegalie non linfomatose. In presenza di segni di *sindrome mediastinica* (v. MEDIASTINO, IX, 545-666; *4902-4931), l'esame clinico può rilevare reperti per discriminare situazioni anatomopatologiche diverse e consente di identificare almeno tre principali *modelli sindromici* (sindrome mediastinica anteriore, media, posteriore), e di cogliere elementi differenziali nei confronti di masse occupanti spazio di natura non linfadenomegalica (cfr. Mauri e Mauri jr., 1990). I rilievi clinici e le conseguenti illazioni diagnostiche dovranno ovviamente essere convalidati dalle procedure di diagnostica per immagini in campo mediastinico. Importante è pure valutare i segni diretti ed indiretti di *linfadenomegalie addominali* in sede retroperitoneale (linfedema degli arti inferiori, quadri di compressione ureterale, etc.) o mesenterica o inguino-addominale, nonché l'*organomegalia addominale* ed ogni segno che faccia sospettare un coinvolgimento di sedi extralinfonodali. Se si può frapporre un certo lasso di tempo (almeno alcuni mesi) tra la diagnosi e l'inizio della terapia, si potrà apprezzare la *velocità di crescita della massa linfomatosa*.

Esami di laboratorio

Possiamo distinguere due gruppi: 1) uno routinario da cui non si deve prescindere e che oltre alla VES e all'emocromocitometria comprende l'attento esame delle caratteristiche morfologiche dei linfociti circolanti, con eventuale ricorso — se si sospetta un LNH — ad esami citochimici (v. sopra tab. VI) ed allo *screening* preliminare di tipizzazione linfocitaria (B, T, NK) sul sangue periferico.

L'esame routinario comprende pure alcune indagini sul siero (LDH, sideremia, transferrinemia, ferritinemia, cupremia, beta2-microglobulinemia, anticorpi anti-HIV). 2) Un secondo gruppo consta di ogni altro esame che possa essere utile per valutare particolari situazioni biologiche e cliniche e lesioni d'organo e apparato.

Diagnostica per immagini

Numerosi sono gli esami di cui disponiamo (v. RADIODIAGNOSTICA, XII, 2318-2382; RADIOLOGIA, XII, 2423-2434; TOMOGRAFIA A RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE, XIV, 2417-2468; TOMOGRAFIA ASSIALE COMPUTERIZZATA, XIV, 2469-2548); della maggior parte di essi sono noti i pregi, i limiti e le indicazioni, per cui vengono applicati secondo opportuni criteri. Altri sono invece in fase sperimentale per cui la loro collocazione nei protocolli diagnostici non è ancora definita. Imprescindibili in ogni caso sono l'esame radiografico standard del torace e la TC toraco-addominale.

1. Per quanto attiene all'*esame del torace* (figg. 48-51), la *radiografia standard* (Rx) nelle due proiezioni ortogonali è il procedimento più semplice per evidenziare linfadenomegalie ilo-mediastiniche, presenza di localizzazioni linfomatose nel parenchima polmonare, versamenti pleurici. Anche con le nuove apparecchiature «dedicate» (AMBER, apparecchiature digitalizzate) è tuttavia difficile evidenziare masse di non grande volume situate nell'angolo cardio-frenico, in sede subcarenale, tracheobronchiale, aorto-polmonare. Il reperto di «opacità» ai lati dell'ombra mediastinica, che è propria delle adenomegalie linfomatose, deve essere analizzato nei riguardi della sede, forma, dimensioni, simmetria o asimmetria, pulsatilità, al fine di arguire da quale formazione anatomica la

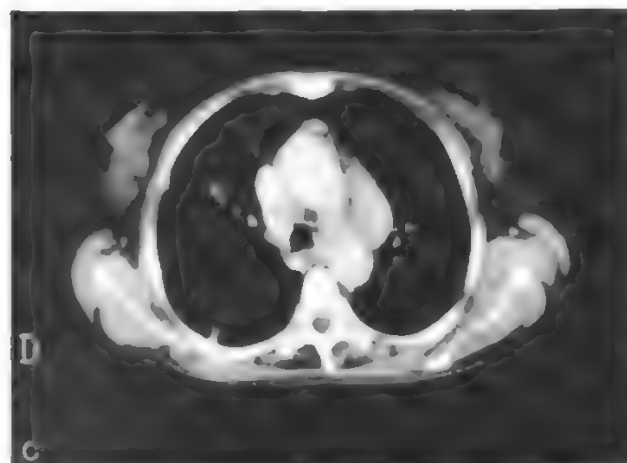
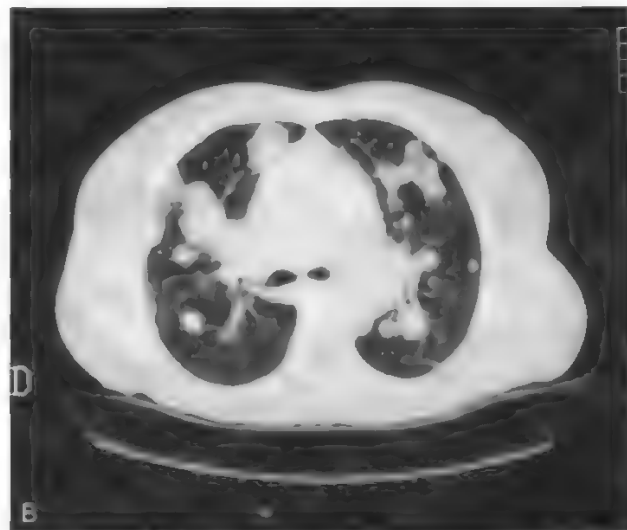


Fig. 49. Malattia di Hodgkin. Torace. A) Radiografia. Multiple formazioni nodulari a margini sfumati situate nei campi polmonari medio-inferiori, meglio valutabili (B) all'esame TC. C) Lo studio TC del mediastino rivela inoltre linfadenomegalie retrocavali e della finestra aorto-polmonare.

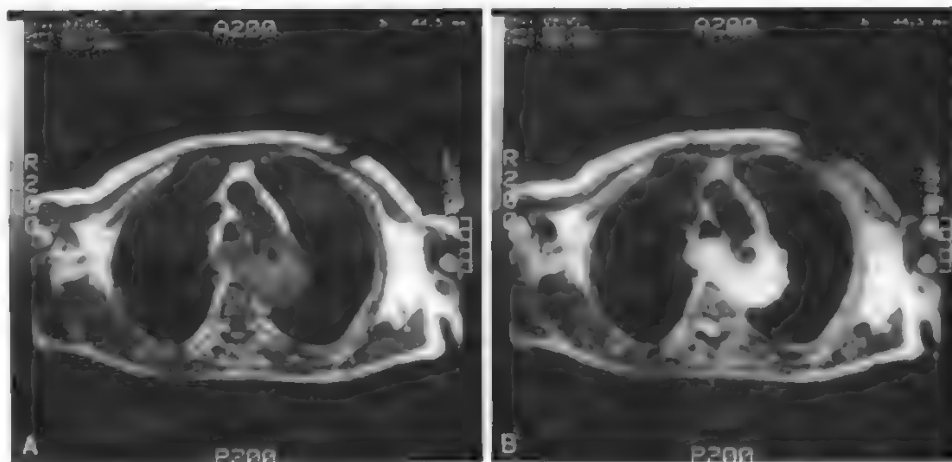


Fig. 50. LNH. Torace. All'esame con RMN si nota linfadenomegalia del mediastino posteriore, ipointensa nelle sequenze pesate in T_1 (A) ed iperintensa in T_2 (B).

massa tragga origine e quale possa esserne la natura (cfr. in Guernelli, 1979; Mauri e Mauri jr., 1990).

Informazioni aggiuntive importanti a questo riguardo vengono fornite dalla Tomografia Computerizzata (TC) toracica, che più compiutamente rivela la sede delle masse linfomatose, i loro rap-

porti con le normali strutture mediastiniche, nonché sede e volume di lesioni parenchimali polmonari eventualmente presenti; le apparecchiature TC più recenti (*Helical TC*, *TC spirale*; v. TOMOGRAFIA ASSIALE COMPUTERIZZATA**) permettono di ottenere immagini di ampi volumi corporei in pochi secondi, in assenza di movimenti

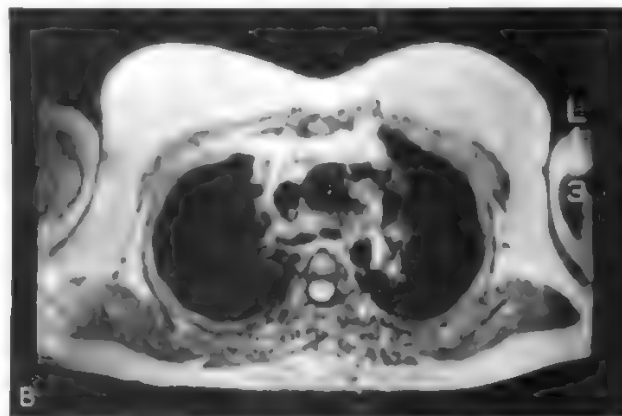
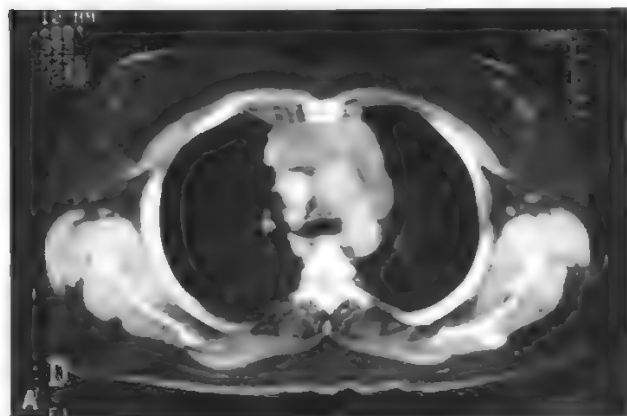


Fig. 51. Torace. Valutazione post-RT. A) LNH-T a grandi cellule anaplastiche Ki-1 positive. TC. Al restaging dopo terapia di una localizzazione linfomatosa *bulky* del mediastino anteriore, presenza di un'area a densità disomogenea, d'incerta interpretazione. B) RMN. All'esame RM (sequenza T_2) tale area appare in larga parte iperintensa e pertanto riferibile a residuo di malattia. C) Malattia di Hodgkin. RM (sequenza T_2). Torace. Presenza nel mediastino anteriore di un tessuto a bassa intensità di segnale, riferibile a fibrosi post-attinica (pregressa massa linfomatosa).

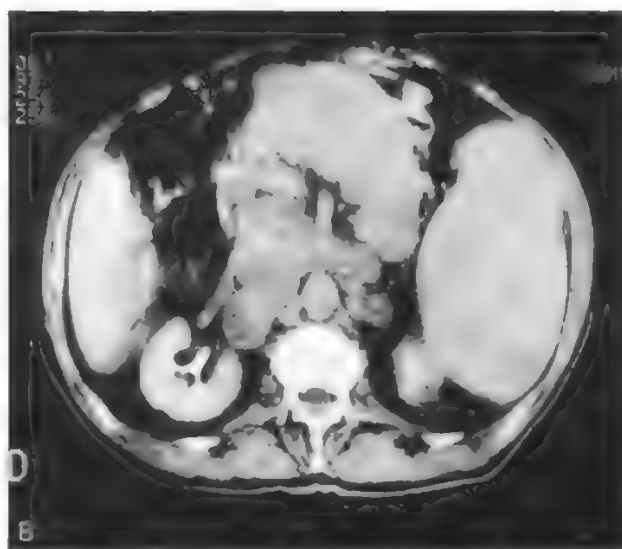
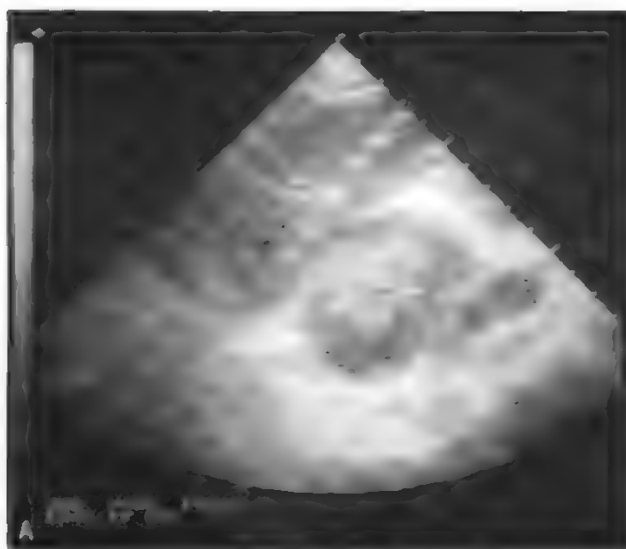


Fig. 52. LNH. A) Ecografia. Addome. Si apprezzano numerose e voluminose masse linfonodali ad ecogenicità disomogenea in sede retroperitoneale alta. B) TC. Addome (stesso caso). L'esame TC documenta la presenza di numerosi linfonodi ingranditi in sede paraaortico-paracavale e di masse linfonodali in sede mesenterica. Voluminosa splenomegalia con aree ipodense di infiltrazione linfomatosa.

respiratori; utilizzando mezzo di contrasto iodato è possibile valutare i singoli organi e distretti nelle fasi di massima opacizzazione vascolare e/o parenchimale. Attualmente quindi la TC eguaglia la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) per quanto riguarda l'apprezzamento dei rapporti tra masse linfomatose mediastiniche e trachea, vasi, pericardio, superfici pleuriche, parete toracica. La RMN permette peraltro una più affidabile valutazione della massa linfomatosa residua dopo trattamento radio e/o chemioterapico, con più sicura discriminazione tra fibrosi reattiva (bassa intensità di segnale) e persistenza di malattia attiva (elevata intensità di segnale) (fig. 51) (Spiers *et al.*, 1997).

Le espressioni morfologiche delle localizzazioni linfomatose intratoraciche sono varie sia nella MH che nei LNH, ma non sono patologiche per alcun tipo di linfoma (Au e Leung, 1997; Lee *et al.*, 1997), eccettuati — in parte — i MALT-LNH polmonari primitivi.

2. Per la diagnostica delle localizzazioni linfomatose addominali, la tomografia computerizzata (TC) rappresenta l'indagine principe: in virtù della sua ottima risoluzione spaziale, consente una soddisfacente visualizzazione di tutti i linfonodi, anche di dimensioni millimetriche (figg. 52 e 53). La TC tuttavia, avendo come criterio discriminativo tra normale e patologico solo le dimensioni e la densità dei linfonodi, non riconosce l'infiltrazione neoplastica in linfonodi di volume normale e non discrimina tra natura reattiva o linfomatosa o cancerosa metastatica dei linfonodi aumentati di volume. È accertato però che l'iperplasia reattiva dei linfonodi non comporta di solito aumenti diametrici superiori a 15 mm; masse linfonodali di diametro > 30 mm non sono state mai osservate nelle linfoadenomegalie di natura benigna.

La risonanza magnetica nucleare (RMN) può essere usata come esame di seconda istanza nello studio di casi dubbi in quanto l'intensità di segnale risulta diversa tra linfonodi normali e patologici; la RMN non è comunque in grado di discriminare linfonodi infiammatori da forme neoplastiche se non utilizzando particolari mezzi di contrasto linfo-tropi attualmente in fase sperimentale.

L'ecografia non viene usata routinariamente per lo studio delle adenomegalie addominali in quanto evidenzia le lesioni retroperitoneali ma in misura inferiore quelle mesenteriche ed iliache profonde. L'ecografia tuttavia è in grado di identificare in modo soddisfacente linfoadenomegalie addominali in soggetti con particolare deficienza di tessuto adiposo (in cui la TC non consente buone visualizzazioni).

La TC è l'esame di scelta anche per rivelare eventuali alterazioni di strutture extralinfonodali come, ad esempio, fegato, milza, reni, surreni, pancreas, muscoli, parete del tubo digerente, di cui

evidenzia le localizzazioni linfomatose ed anche le lesioni secondarie (ad esempio idronefrosi o ectasia delle vie biliari da compressione estrinseca) (figg. 53 e 54). È probabile che la TC sottovaluti l'incidenza di localizzazioni del fegato e della milza, come del resto anche l'ecografia, che ben evidenzia le lesioni locali sotto forma di aree ipoecogene ma non rivela forme di infiltrazione diffusa. Questo limite della diagnostica per immagini pare essere in parte superato con la TC spirale (*Helical TC*) e soprattutto con RMN: infatti l'utilizzo di nuove sequenze rapide (da eseguirsi in una fase di apnea inspiratoria) e di mezzi di contrasto (paramagnetici a distribuzione extracellulare e superparamagnetici a localizzazione monocito/macrofagica) hanno aperto nuovi orizzonti nel riconoscimento di queste localizzazioni. In particolare sono state impiegate microsferule di vari metal-chelati comprendenti molecole cristalline, quali gadolinio (Gd^{3+}), ossido di ferro (Fe^{2+} , Fe^{3+}) e manganese (Mn^{2+}), rivestite da macromolecole di destrano, albumina, polilisine od altri polimeri (Van Beers *et al.*, 1997).

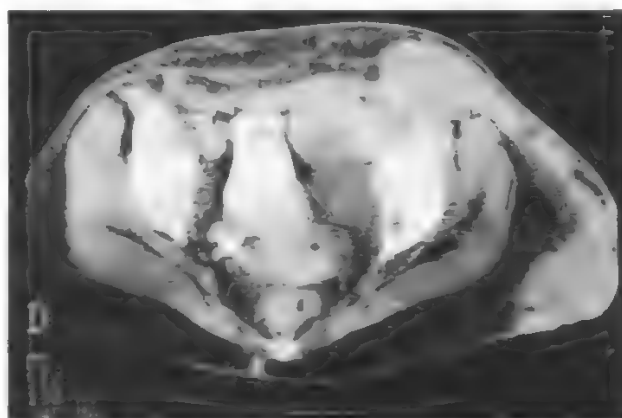


Fig. 53. LNH. TC. Addome e pelvi. Voluminosi pacchetti linfonodali in sede iliaca esterna ed inguinale sinistra. Rilevante ispessimento ed iperdensità del tessuto adiposo sottocutaneo nella regione glutea di sinistra.

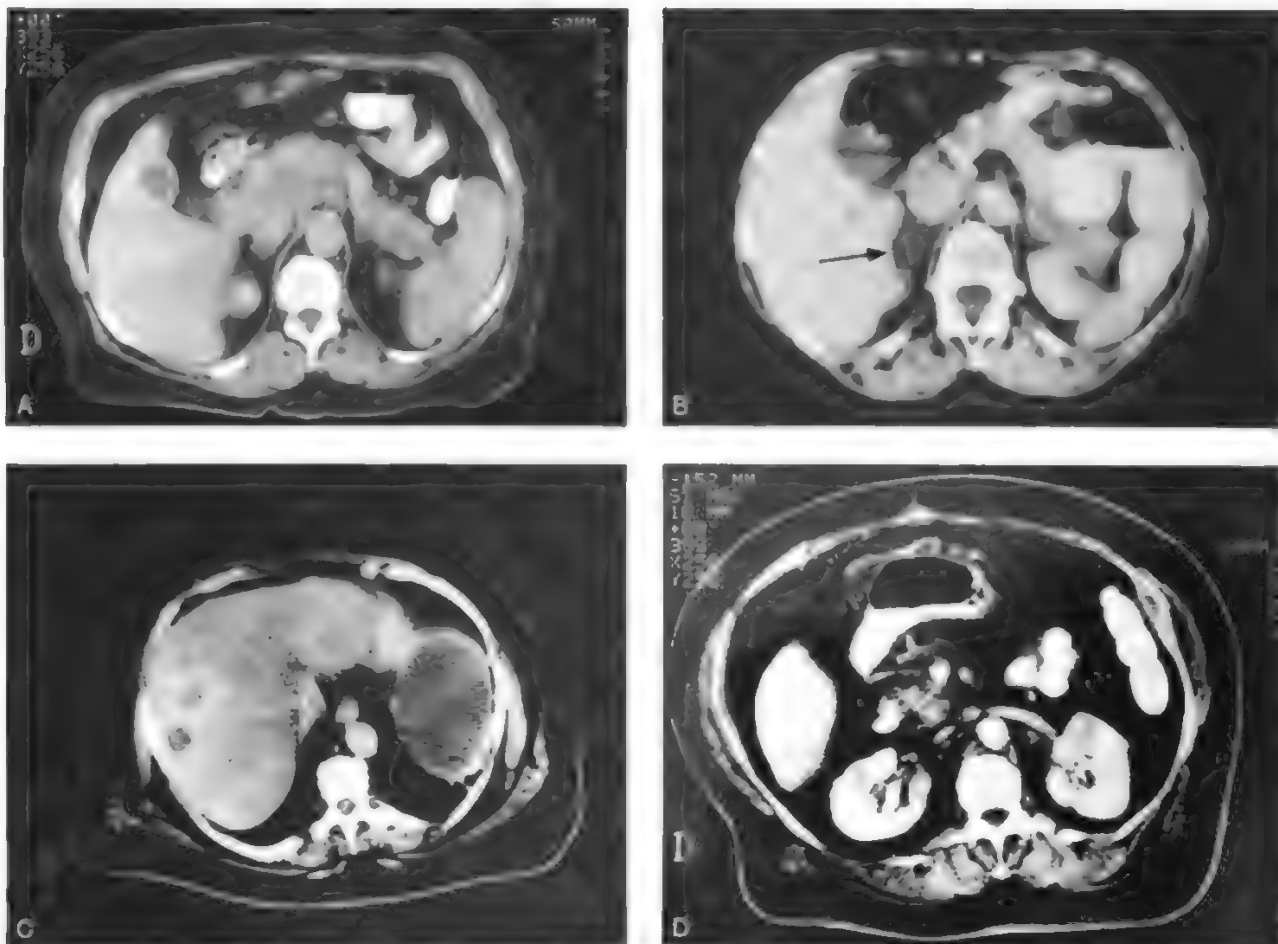


Fig. 54. LNH. TC, addome. A) Aumento di volume a densità lievemente disomogenea della testa del pancreas. B) Processo espansivo ipodenso del surrene destro. C) LNH addominale ipersplenomegalico (splenectomizzato). Presenza di due lesioni rotondeggianti ipodense del lobo destro del fegato. Raccolta liquida nella loggia splenica, quale esito di splenectomia. D) Multiple formazioni espansive tondeggianti ipodense in entrambi i reni.

Per quanto concerne l'insolita localizzazione *renale* di linfomi, la RMN non aggiunge sostanziali reperti a quelli ottenibili con la TC, tranne che in caso di invasione diffusa del rene, in cui la TC mostra spesso solo ingrandimento globale del viscere mentre la RMN fornisce nelle sequenze pesate in T1 un segnale ipointenso rispetto alla corticale controlaterale (si tratta di neoplasie scarsamente vascolarizzate), con debole rinforzo dopo infusione del mezzo di contrasto con gadolinio (Semelka *et al.*, 1996).

Con l'avvento della TC, la *linfografia addomino-pelvica bipedale con mezzo di contrasto oleoso*, che è stata così preziosa per l'esplorazione delle localizzazioni linfomatose addominali negli anni '60-'70, è divenuta un esame quasi obsoleto (Guermazi *et al.*, 1996), sia per talune difficoltà tecniche di esecuzione, sia per i limiti di visualizzazione delle stazioni linfonodali che le sono propri.

3. L'esame radiologico del tubo digerente (fig. 55) appare superfluo in assenza di una sintomatologia d'organo: fanno eccezione le localizzazioni linfomatose all'anello di Waldeyer, che in circa il 20% dei casi comportano anche lesioni intestinali clinicamente silenti (Saul e Kapadia, 1985). In presenza di disturbi gastro-intestinali l'esame radiologico (Rx con doppio mezzo di contrasto o con il clisma del tenue, o TC addominale) va sempre completato con quello *endoscopico* (gastro-duodenale, colon) eventualmente eseguito con *video endoscopia* (Palazzo *et al.*, 1993): va tenuta presente — nel caso di linfomi generalizzati o di apparente recidiva di un linfoma già trattato — la possibilità che si tratti di un secondo tumore (carcinoma o neoplasia maligna stromale) «leio-

miosarcoma») invece che di una ulteriore localizzazione linfomatosa.

La TC è talora indispensabile per valutare la diffusione extraluminale della neoplasia. L'utilità della RMN in quest'ambito di indagini è *sub judice*.

I vari tipi di linfoma presentano nel tubo digerente localizzazioni di frequenza diversa e con differenti espressioni anatomico-radiologiche, spesso indistinguibili da quelle di un carcinoma se non per la più frequente presentazione multicentrica (Levine *et al.*, 1997).

L'esofago, raramente sede di linfoma, può offrire immagini di masse ulcerate o polipoidi, occasionalmente quadri multinodulari simil-varicosi. Nello stomaco, preferenzialmente interessato nella metà distale, i reperti sono polimorfi (processi infiltrativi con parziale conservazione delle pliche e della motilità della parete, o polipoidi o nodulari o ulcerativi, più raramente di tipo simil-linite plastica stenotizzante) (v. sotto figg. 72 e 73). Le localizzazioni al tenue (figg. 55 e 74) sono talora associate a lesioni digiunali per m. celiaca o IPSID (v. oltre) o interessano preferenzialmente l'ileo distale, con o senza contemporaneo coinvolgimento dei linfonodi mesenterici: il lume può avere calibro normale od essere stenotizzato od anche dilatato (per distruzione della tonaca muscolare propria e/o dei plessi nervosi autonomi), con reperti di singoli o multipli segmenti di ispessimento circolare della parete per una lunghezza di 1,5-7,5 cm oppure di noduli a sviluppo intraluminare; alla TC le aree infiltrate appaiono ipodense (Balthasar *et al.*, 1997). Nell'insolito interessamento del *grosso intestino* (ceco, colon, retto)

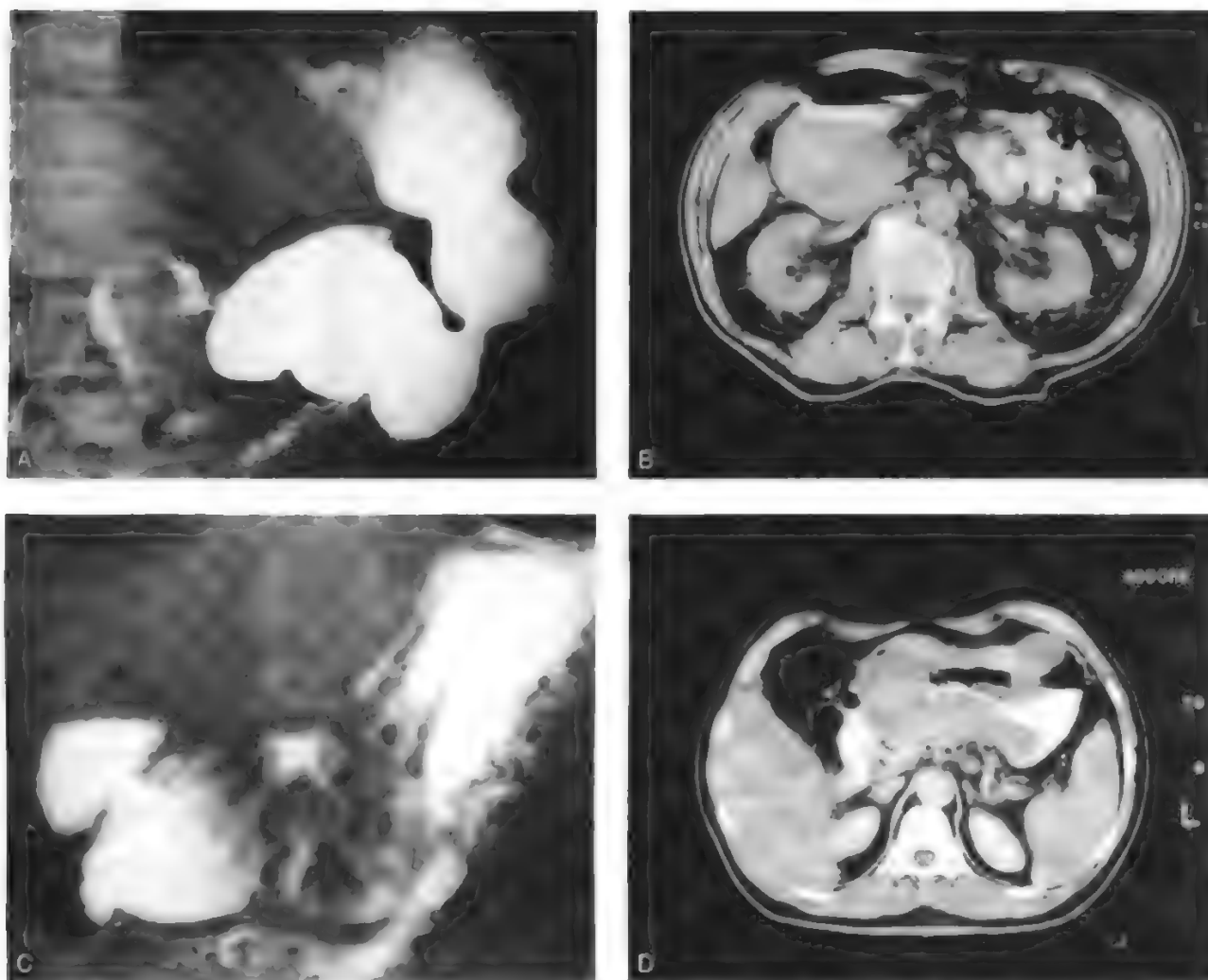


Fig. 55. LNH-B. Tubo digerente. A) Radiografia del tubo digerente. Deformazione del bulbo duodenale e riduzione di calibro della seconda e terza porzione del duodeno. B) TC (stesso caso di A). Voluminosa massa a media densità, che ingloba il duodeno e oblitera i piani di clivaggio nei confronti della testa pancreatica. C) Radiografia. Massa linfomatosa ulcerata dell'angulus gastrico. D) LNH-T a grandi cellule, CD30+. TC. Addome. Spiccato ispessimento a margini irregolari delle pareti del corpo e dell'antrum gastrico.

(v. sotto figg. 73 e 88) il l. può raggiungere cospicuo volume o presentarsi con quadri infiltrativo-ulcerativi o multinodulari, che richiamano la poliposi familiare. I l. primari della regione ano-rettale sono di solito AIDS-correlati (maschi omosessuali).

4. Nel sospetto di *lesioni scheletriche focali*, l'esame di base è tuttora lo studio Rx tradizionale, che viene spesso completato da esame con TC o, meglio, con RMN (figg. 56, 66-68). Tale metodica risulta infatti più sensibile ed in grado di svelare e valutare l'entità di un eventuale interessamento delle parti molli adiacenti. Per l'esame scintigrafico dello scheletro, v. oltre.

5. Presenza ed entità di infiltrazione linfomatosa del *midollo osseo* (figg. 56, 61, 68) possono essere attendibilmente apprezzate con la RMN (Tardivon *et al.*, 1995). L'esame è particolarmente probante nella MH perché consente di esplorare ampie sezioni dello scheletro, ed è utile nella tricoleucemia ed in altri LNH di basso grado per rivelare l'infiltrazione residua dopo terapia.

6. La RMN costituisce l'indagine principe per lo studio di localizzazioni linfomatose al S.N.C. (fig. 57), per la maggiore sensibilità e la migliore definizione d'immagine in confronto alla TC. La RMN consente inoltre rilievi più affidabili per valutare eventuali lesioni del seno cavernoso, delle meningi e dei nervi cranici, nonché dei contigui tessuti molli (Musumeci e Tesoro-Tess, 1994).

7. Sia la TC che la RMN documentano chiaramente le localizzazioni al *rino- e all'orofaringe* (figg. 58 e 70), quelle *orbitali* (v. sotto fig. 69) e le lesioni scheletriche che possono conseguire alla propagazione per continuità dei linfomi di queste aree e delle linfonodali del collo.

8. Localizzazioni in *distretti superficiali* come *tiroide, parotidi, testicolo* (fig. 59), vengono studiati elettivamente con ecografia (v.***) ed in particolare con *eco-color-Doppler*, talora con RMN. Nel sospetto di *localizzazione mammaria* è d'obbligo l'esame mammografico completato da ecografia. TC e RMN possono essere impiegate per esplorare *stazioni linfonodali superficiali del collo*, se i linfonodi sono situati in aree mal accessibili alla palpazione, se di piccole dimensioni, adiacenti alla loggia vascolare oppure collocati al di sotto del muscolo sternocleidomastoideo, in sede retrofaringea o nella regione tracheofaringea (v. sotto fig. 76). L'ecografia può essere di utile complemento per svelare l'invasione delle pareti vascolari e per lo studio *color-Doppler* delle afferenze vascolari linfonodali. Nella DD tra linfadenopatie benigne e neoplastiche (comprese le linfomatose) della regione cervicale, l'ecografia *color-Doppler* può offrire utili criteri discriminativi, d'ordine morfologico (aspetti diversi della vascolarità ilare radiale centro-nodale e periferica) e dinamico (analisi delle onde sonore, indici di resistenza e pulsatilità, apice di velocità sistolica) (Na *et al.*, 1997).

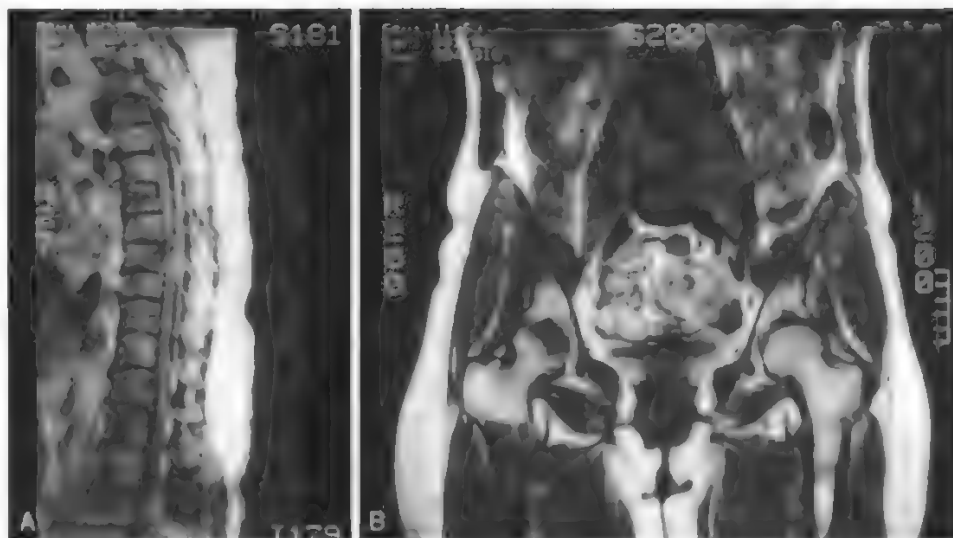


Fig. 56. LNH. Rachide. RMN (sequenze pesate T₁). A) Sequenza sagittale del rachide dorso-lombare. Numerose arcole ipointense riferibili a lesioni sostitutive linfomatose del corpo vertebrale di tutti i metameri dorso-lombari. B) Sequenza coronale del rachide lombare e del bacino. Diffusa ipointensità di segnale dei corpi vertebrali lombari e della diafisi femorale destra; altre arcole di infiltrazione linfomatosa ossea interessano le ali iliache e la testa femorale destra.

9. Nell'esame di lesioni infiltrative linfomatose dei tessuti molli e del muscolo (figg. 53, 60 e 61) la radiografia standard planare fornisce raramente risultati significativi. Reperti importanti si ottengono spesso con la TC ed ancor più con la RMN, in cui il tessuto linfomatoso offre segnale ipointenso nelle sequenze pesate in T₁ ed invece spiccatamente iperintenso in T₂ (Lee *et al.*, 1997). La scintigrafia con ⁶⁷Ga mostra ipercaptazione del radionuclide in queste localizzazioni (v. oltre).

10. Scintigrafia (v. SCINTIGRAFIA, XIII, 2199-2225; *6518-6521). - La scintigrafia epatosplenica con solfuro di ^{99m}Tc può fornire qualche nozione circa il volume dei visceri e l'eventuale presenza di aree fredde, ma è spesso soggetta a false positività o a false negatività, in rapporto a variazioni del flusso ematico intraparenchimale dell'isotopo, ed è pertanto oggi scarsamente impiegata. Maggior valore va ascritto alla scintigrafia oncologica positiva con ⁶⁷Ga citrato, sia a livello scheletrico che linfonodale e splenico, perché è alta a individuare localizzazioni anche di modeste dimensioni. Non di rado la scintigrafia con ⁶⁷Ga od anche con ^{99m}Tc MDP rivela nello scheletro localizzazioni linfomatose prima che si manifestino segni di lesione

radiologicamente apprezzabili. Il whole body scan con ⁶⁷Ga dà risultati positivi nell'80% di linfonodi superficiali sede di localizzazione linfomatosa, purché abbiano diametro > 3 cm. Tale esame non è invece indicato per lo studio delle linfadenopatie addominali in quanto il ⁶⁷Ga viene captato anche dalle anse intestinali. È una indagine utile per evidenziare infiltrazioni in tessuti molli e in muscoli scheletrici nonché masse linfomatose residue dopo terapia, e per differenziare la malattia residua dalla fibrosi reattiva soprattutto in regione mediastinica (Front *et al.*, 1992) benché trovi limiti nella

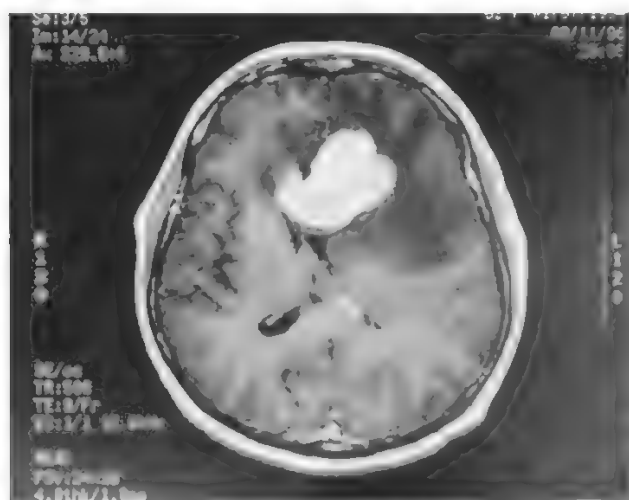
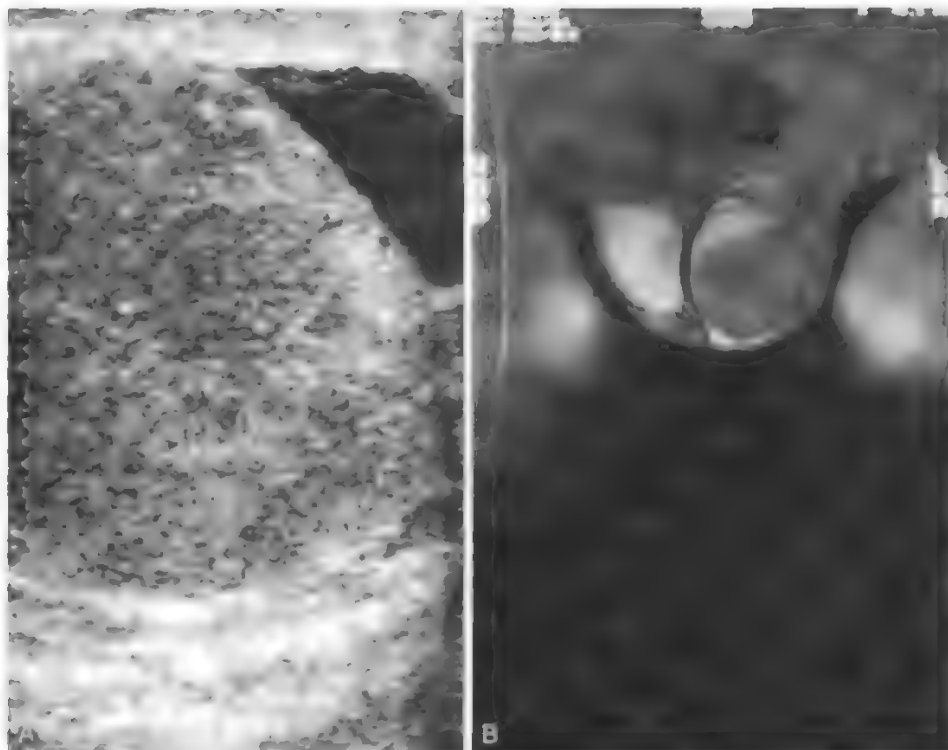


Fig. 57. LNH ad alto grado di malignità. RMN cerebrale. Processo espansivo iperintenso in T₂ interessa la regione frontale sinistra e si estende controlateralmente attraverso il corpo calloso. Esteso edema perilesionale ed effetto massa sulle strutture della linea mediana.



Fig. 58. LNH. TC. Rinofaringe. Ispessimento delle pareti laterali e posteriori del rinofaringe; compressione degli spazi adiposi parafaringei.

Fig. 59. LNH del testicolo. A) LNH a grandi cellule. Ecografia. Testicolo notevolmente ingrandito a struttura disomogeneamente ipoecogena: appaiono infiltrati anche l'albuginea ed il funicolo spermatico. È inoltre presente idrocele di modesta entità. B) LNH-B di basso grado. RMN. Notevole aumento di volume del testicolo sinistro, nel cui contesto è presente un'ampia area ipointensa a limiti sfumati.



sensibilità non grandissima del procedimento e nel fatto che non tutti i tipi di cellule linfomatose sono atte ad assumere il gallio, sia in esordio di malattia che dopo terapia (Front *et al.*, 1993); a questo fine la RMN, con indagini opportunamente pesate, è certamente superiore, specie se distanziata nel tempo (6 mesi) dalla fine della terapia oppure se la RMN viene attuata con impiego di mdc paramagnetico con gadolinio (Forsgren *et al.*, 1994).

Al fine di migliorare lo staging, in casi di LNH-B, è stato introdotto di recente la radioimmuno-scintigrafia con frammenti *Fab* dell'AcMo LL2 marcato con ^{111}Tc , sembra con buoni risultati (Gaspardini *et al.*, 1995).

11. *Tomografia a emissione di positroni (PET)*. — Di recente introdotta per la stadiazione ed il monitoraggio dei linfomi (specie dei LNH) (Wahl *et al.*, 1993), la PET (v. TOMOGRAFIA A EMISSIONE DI POSITRONI) sembra trovare utili indicazioni — secondo studi condotti con l'impiego del fluorodesossiglucosio (FDG) — per l'individuazione di localizzazioni linfomatose di piccole dimensioni (anche < 1 cm di diametro), d'infiltrazione di tessuti molli e di masse muscolari e di aree di malattia residua post-terapia, con affidabilità forse superiore alla TC e alla RMN (Newman *et al.*, 1994).

Osteomiobiosi

L'esame del midollo osseo su strisci (agoaspirato) sarà sempre utilmente associato a quello istologico su sezioni (BOM [con ago di Yamshidi]). Il primo consente un migliore apprezzamento delle fini caratteristiche morfologiche delle cellule, il secondo documenta l'entità e la topografia dell'infiltrazione linfomatosa (nodulare, paratrabecolare, diffusa), l'eventuale carattere coesivo della proliferazione, la ricchezza di fibrille argentofile o di connettivo collagene. Il BOM è un procedimento tassativo per la stadiazione dei linfomi. Sede abituale della biopsia osteomidollare è la cresta iliaca (spina iliaca superiore posteriore o anteriore). È consigliabile effettuare il prelievo bilateralmente, soprattutto nella MH, benché i pareri non siano unanimi nel valutare l'utilità del doppio prelievo (Jaffe, 1993). Talora sarà opportuno procedere a biopsia mirata in aree scheletriche che appaiono alterate all'esame radiologico o scintigrafico.

Esame istocitologico di materiale biptico

Per lo studio citologico su strisci di sangue periferico e di midollo osseo e su apposizioni di materiale linfonodale, la routine prevede

la colorazione con May-Grünwald-Giemsa (MGG), eventualmente completata da indagini citochimiche (v. sopra tab. VI). Per lo studio istologico di linfonodi, organi e tessuti extralinfonodali (inclusi in paraffina o resina dopo fissazione con metodi diversi o sezionati al criostato) si ricorre alle colorazioni con ematossilina-eosina (EE), Giemsa, Unna-Pappenheim, alle colorazioni per il connettivo collagene e per le fibre elastiche, all'impregnazione argentea del reticolo fibrillare. Sempre nei LNH e spesso nella MH, sul materiale biopsiato dovranno essere effettuati esami immunocitochimici di vario tipo, citogenetici e di genetica molecolare. Tra le indagini complementari particolare rilievo potranno assumere talora le ricerche microbiologiche e virali.

Esame citologico dei versamenti

I versamenti nel cavo pleurico, pericardico o peritoneale in corso di linfomi sono tutt'altro che insoliti: nella MH conseguono spesso a

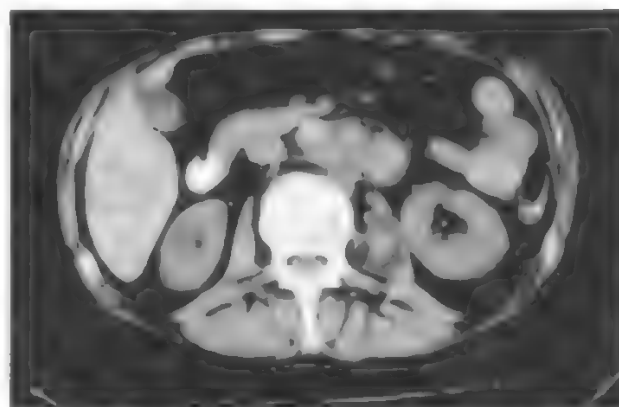


Fig. 60. Malattia di Hodgkin. TC addome. Alterata densità del muscolo ileo-psoas sinistro, per infiltrazione linfomatosa; linfonomegalie retroperitoneali.

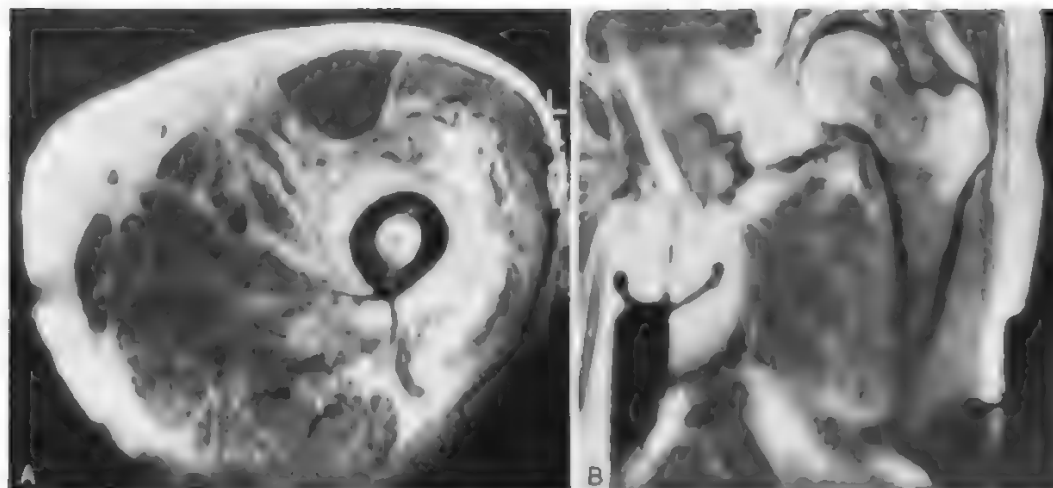


Fig. 61. LNH-B a grandi cellule. A) RMN (sequenza assiale T₂). È bene evidente il tessuto neoplastico iperintenso che circonda la diafisi femorale sinistra ed infila i fasci muscolari adiacenti. Anche il canale midollare è occupato da tessuto neoplastico. B) RMN (sequenza coronale T₂). La sequenza dimostra l'estensione della concomitante infiltrazione midollare (tessuto ipointenso che occupa la regione del collo femorale e tutta la diafisi).

processi di ostruzione linfatica, nei LNH traggono più frequentemente origine in una infiltrazione linfomatosa delle sierose. Gli esami con TC e RMN del torace definiscono bene la morfologia della superficie pleurica (Carlsen *et al.*, 1993) e facilitano l'esecuzione di agobiopsie mirate di noduli o placche pleuriche (Celikoglu *et al.*, 1992).

Tuttavia molto spesso già l'esame citologico del sedimento del liquido pleurico fornisce utili elementi di diagnosi.

Rachicentesi ed esame citologico del liquor

Sono esami tassativi solo in LNH ad alta malignità ed in linfomi a proliferazione diffusa con interessamento midollare e/o testicolare, oltre che, ovviamente, in tutti i casi con accertata o sospetta le-

sione epidurale o encefalica o con segni clinici di meningosi linfomatosa/leucemica.

Criteri di stadiazione

La stadiazione formulata nella Ann Arbor Conference (1971), ancor oggi seguita nelle sue linee fondamentali, contempla 4 gradi (stadi) di diffusione del processo linfomatoso, con le caratteristiche e le sottodivisioni illustrate e commentate nella tab. XVI.

La predetta codificazione degli stadi di malattia è tuttora valida per quanto attiene alla malattia di Hodgkin. Essa viene sostanzialmente applicata pure per la stadiazione dei

TAB. XVI. CLASSIFICAZIONE IN STADI DELLA MALATTIA DI HODGKIN E DEI LINFOMI NON HODGKIN

(Ann Arbor Conference, 1971^a; Cotswolds Meeting, 1990^b)

Stadio ¹	Sedi interessate ²
I	Una singola regione linfonodale (I) o un singolo organo o sede extralinfonodale (I _E) ³
II ⁴	Due o più regioni linfonodali situate dallo stesso lato del diaframma (II) oppure una o più regioni linfonodali e un organo o sede extralinfonodale (in forma localizzata) poste dallo stesso lato del diaframma (II _E)
III ⁵	Più regioni linfonodali situate da entrambi i lati del diaframma (III). Tale interessamento linfonodale può eventualmente associarsi a compromissione localizzata della milza (III _s) o di un organo extralinfonodale (III _E) o di entrambi queste sedi (III _{Es})
IV	Interessamento diffuso o disseminato di una o più sedi extralinfonodali con o senza contemporanea compromissione linfonodale

1. Ogni stadio viene sottoclassificato in A e B a seconda dell'assenza o della presenza di almeno uno dei seguenti sintomi: dimagrimento maggiore del 10% del peso corporeo nei 6 mesi precedenti la diagnosi, febbre superiore a 38° (torale) non imputabile a processi infettivi o altrimenti spiegata, sudorazione inspiegata, specie se notturna.

2. Le sedi interessate vengono indicate con lettere maiuscole: N (linfonodi), L (polmone), O (osso), H (fegato), M (midollo osseo), D (cute), S (milza), P (pleura), K (rene). Quando l'interessamento extralinfonodale è confermato biotipicamente, il conseguente simbolo va seguito dal segno + (es. D+).

3. Organi extralinfonodali sono considerate tutte le possibili sedi all'infuori dei linfonodi (v. testo, col. 3319). Secondo una prassi consolidata (per quanto riguarda l'anello di Waldeyer è considerato sede linfonodale nella MH, sede extralinfonodale nei LNH). L'interessamento del fegato o del midollo osseo comporta sempre il collocamento della malattia in stadio IV.

4. Nello stadio II il numero delle regioni anatomiche linfonodali interessate sarà indicato con un sottoscritto (ad es. II₁). Le «regioni» (o «sedi» o «stazioni») linfonodali unitarie da considerare nella classificazione in stadi sono: 1) cervicale: sovraclaveare, occipitale e preauricolare; 2) sottoclaveare; 3) ascellare e pettorale; 4) mediastinica (tutte le diverse sedi topografiche dei linfonodi mediastinici sono considerate come unica regione linfonodale); 5) ilare polmonare (viene considerato quale interessamento indipendente da quello mediastinico, qualora sia bilaterale, va classificato di per sé quale stadio II, 6) epitrocleare e brachiale; 7) paraaortica; 8) splenica; 9) mesenterica e mesocolica; 10) iliaca; 11) inguinale e femorale; 12) poplitea.

5. Lo stadio IIIA può essere suddiviso in stadio III₁A, quando in ambito addominale sono interessati solo i linfonodi alti (ilo splenico, celiaci, ilo epatico) oltre alla milza, e in stadio III₂A, quando siano interessati i linfonodi lombosacrali, iliaci, mesenterici, mesocolici (con o senza interessamento di quelli addominali).

NB. Nel caso di un grande linfonodo o agglomerato di linfonodi: superficiale o mediastinico o addominale il cui diametro massimo supera 10 cm (7 cm se in sede ascellare) (Carlsen *et al.*, 1993). Una massa mediastinica viene definita «bulky» se in un radiogramma postero-anteriore del torace (a livello dello spazio interombrilico) il suo diametro trasversale massimo è uguale o superiore a 1/3 del diametro trasversale del torace. Lo stato «bulky» viene designato con il suffisso X (es. II₁X).

^a Carbone P. P. *et al.* Cancer Res., 1971, 31, 1860. ^b Lister T. A. *et al.* J. Clin. Oncol., 1990, 7, 1631.

TAB. XVII. CLASSIFICAZIONE IN STADI DEI LNH PROPOSTA DAL NCI (1989)

A) Linfomi non aggressivi (a basso grado di malignità)	
Stadio I	Malattia localizzata (stadi I e II di Ann Arbor)
Stadio II	Malattia disseminata (stadi III e IV di Ann Arbor)
B) Linfomi aggressivi (a grado di malignità intermedio o alto)	
Stadio I	Malattia localizzata linfonodale o extralinfonodale (stadi I e II di Ann Arbor)
Stadio II	Due o più localizzazioni linfonodali o una extralinfonodale con interessamento dei linfonodi regionali, con assenza dei seguenti fattori prognostici peggiorativi: <i>performance status</i> ≤ 70 , sintomi sistemici, masse voluminose (<i>bulky</i> , diametro > 10 cm), LDH > 500 U, interessamento di tre o più sedi extralinfonodali
Stadio III	Stadio II più uno qualsiasi dei fattori prognostici peggiorativi.

linfomi non Hodgkin, sebbene ciò sia da tutti ritenuto insoddisfacente, soprattutto a causa della elevata incidenza nei LNH di localizzazioni extralinfonodali (anche come evento primario), e pure perché la distinzione fra I e II stadio, di così cospicuo rilievo nella MH ai fini della programmazione terapeutica e della prognosi, è molto meno significativa nei LNH, in cui — a differenza dalla MH — terapia e prognosi sono più strettamente correlate al tipo istologico che non allo stadio di diffusione del linfoma. Per i LNH può pertanto essere tenuta presente pure la classificazione in stadi proposta dal National Cancer Institute (NCI 1989), riportata nella tab. XVII. Una classificazione in stadi per i LNH nell'età pediatrica (Murphy, 1978) figura nella tab. XVIII. Stadiazioni particolari sono state infine elaborate per i linfomi cutanei T periferici, per il linfoma di Burkitt, per i linfomi/leucemie linfocitici a piccole cellule, per la tricoleucemia (HCL), per l'Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL), per il plasmacitoma extramidol-

TAB. XVIII. SISTEMA DI STADIAZIONE CLINICA DEI LNH NELL'INFANZIA

(Murphy S. B. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1989, 7, 186)

Stadio	Estensione della malattia
I	Singolo tumore (extralinfonodale) o singola area anatomica linfonodale (con esclusione del mediastino o dell'addome).
II	Singolo tumore (extralinfonodale) con interessamento linfonodale regionale. Due o più aree linfonodali dalla stessa parte del diaframma. Due singoli tumori (extralinfonodali) con o senza interessamento linfonodale regionale dalla stessa parte del diaframma. Tumore primario del tratto gastrointestinale, usualmente nell'area ileocecale, con o senza interessamento dei soli linfonodi mesenterici associati.
III	Due singoli tumori (extralinfonodali) dai lati opposti del diaframma. Due o più aree linfonodali sopra e sotto il diaframma. Tutti i tumori primari intratoracici (mediastinici, pleurici, timici). Ogni malattia estensiva intraddominale primaria.
IV	Qualunque delle situazioni suddette associate ad interessamento del SNC e/o del midollo osseo.

lare. Ne riferiremo a suo luogo, nei capitoli dedicati alla descrizione dei quadri clinici di questi linfomi.

Graduazione dello stato di validità e valutazione dei fattori prognostici pre-trattamento

a) *Performance status*. — In possesso di tutti gli elementi riguardanti la diagnosi, le sedi coinvolte dal linfoma e l'entità della massa neoplastica, è necessario procedere ad una valutazione clinica complessiva dello stato di validità del paziente, inteso come risposta globale dell'organismo al processo neoplastico. Si presume di trarne utili orientamenti circa la programmazione terapeutica e la capacità del paziente di superare l'impatto tossico di terapie aggressive.

I criteri per la graduazione dello stato di validità (*performance status*, PS) sono stati codificati per primi da Karnofsky e Burchenal (1949) e successivamente meglio definiti e completati dall'Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG) (Oken e Creech, 1982) (v. tab. XIX). Ambedue le classificazioni appaiono attualmente insufficienti per un esauriente apprezzamento delle condizioni fisiche e psichiche del paziente linfomatoso, non valutano adeguatamente l'importanza dell'età (per i LNH soprattutto di quella avanzata) e non tengono conto di altre condizioni morbose pregresse o concomitanti, dell'atteggiamento psicologico di fronte alla malattia e di altre variabili, sicché è auspicabile una rielaborazione dei criteri sulla base di un più rigoroso approccio multifattoriale.

b) *Indice prognostico pre-trattamento*. — Ai fini di una razionale programmazione terapeutica è pure importante prevedere probabilisticamente quale risposta si potrà ottenere con una determinata terapia e in una determinata classe di linfomi e quale rischio di decesso per tossicità da terapia incomba sul paziente. Numerosi sono i fattori prognostici d'ordine clinico e biologico, valutati con analisi univariata circa il potenziale significato prognostico riconoscibile come variabile indipendente rispetto a parametri indicativi dell'effetto terapeutico (frequenza di RC, di sopravvivenza esente da malattia, di sopravvivenza globale per adeguati lassi di tempo). I fattori clinici sfavorevoli comprendono: sesso maschile, età (> 60 anni), cattivo *performance status*, presenza di sintomi sistemici B, diffusa disseminazione del linfoma in sedi linfonodali ed extralinfonodali (stadi I-II vs III-IV) con particolare riguardo ad alcune di queste localizzazioni (midollo osseo, fegato, polmone, S.N.C., milza, tubo digerente), massa linfomatosa valutata come bulky. Fattori biologici associati a cattiva risposta terapeutica sono taluni isotipi

TAB. XIX. GRADUAZIONE DEL PERFORMANCE STATUS PROPOSTO DALL'EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP (1982)

Grado ECOG ¹	Gradi corrispondenti di Karnofsky ²
0 Paziente fisicamente attivo, in grado di svolgere senza restrizioni la normale attività preterapia	100-90
1 Paziente limitato nell'attività fisica massima; può essere seguito in ambulatorio e svolgere un lavoro di entità leggera o di tipo sedentario	80-70
2 Paziente ambulatoriale ed in grado di accudire sé stesso, ma incapace di svolgere ogni attività lavorativa. Resta alzato per più del 50% delle ore di veglia	60-50
3 Paziente in grado di accudire sé stesso solo parzialmente e costretto a letto per più del 50% delle ore di veglia	40-30
4 Paziente grave costretto a letto e non in grado di accudire sé stesso	20-10
5 Morto	0

¹ Oken M. M., Creech R. H., *Am. J. Clin. Oncol.*, 1982, 3, 649-655.² Karnofsky D. A., Burchenal J. H., *The clinical evaluation of chemotherapeutic agents*, in Meleis J. S. ed., *Evaluation of chemotherapeutic agents*, 1949, Columbia University Press, New York, pp. 191-205.

LINFOMI

TAB. XX. INDICE PROGNOSTICO PER I LINFOMI AGGRESSIVI ELABORATO DAL GELA

(Coiffier B. et al., Groupes d'étude des lymphomes agressifs (GELA), *J. Clin. Oncol.*, 1991, 9, 211-219)

Indice	Variabili sfavorevoli				Gruppo di rischio	CR %	RFS 3 anni %	Sopravv. globale 3 anni %
	Massa tumorale ≥ 10 cm	Localizz. extralinf. ≥ 2	Stadio III-IV	LDH $> 1 \times$ v.n.				
1	no	no	no	no	basso	93	87	88
2	presenti 1 o 2 fattori sfavorevoli			no	intermedio	83	73	71
2	no	no	no	sì	alto	62	53	41
3	sì	sì	sì	no				
3	presenti da 1 a 3 fattori sfavorevoli			sì				

CR = risposta terapeutica completa; RFS = relapse free survival (sopravvivenza senza recidiva)

TAB. XXI. RAPPORTI TRA GRUPPI DI RISCHIO DEFINITI DALL'INDICE PROGNOSTICO INTERNAZIONALE (IPI) E FREQUENZE (%) DI CR, DI RFS E DI SOPRAVVIVENZA GLOBALE, IN LINFOMI AGGRESSIVI

(Shipp M. A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 987-94, modificata)

Gruppo di rischio	N. dei fattori di rischio*	Risposta completa (%)	Relapse free survival (%)		Sopravvivenza globale (%)	
			2 anni	5 anni	2 anni	5 anni
IPI, tutti i pazienti						
Basso	0 o 1	87	79	70	84	73
Basso-intermedio	2	67	66	50	66	51
Intermedio-alto	3	55	59	49	54	43
Alto	4 o 5	44	58	40	34	26
IPI, aggr. per l'età ≤ 60						
Basso	0	92	88	86	90	83
Basso-intermedio	1	78	74	66	79	69
Intermedio-alto	2	57	62	53	59	46
Alto	3	46	61	58	37	32
IPI, aggiustamento per l'età > 60						
Basso	0	91	75	46	80	56
Basso-intermedio	1	71	64	45	68	44
Intermedio-alto	2	56	60	41	48	37
Alto	3	36	47	37	31	21

* I fattori di rischio considerati sono: età (≤ 60 anni vs > 60 anni), performance status (0 o 1 vs ≥ 2) (ECOG), stadio (I-II malattia localizzata vs III-IV malattia avanzata), numero delle localizzazioni extralinfonodali (≤ 1 vs > 1), concentrazione sierica di LDH ($\leq 1 \times$ v.n. vs $> 1 \times$ v.n.)

del linfoma (malignità intermedia/alta), alcuni immunofenotipi, alcune anomalie cromosomiche e lesioni di protooncogeni, elevata concentrazione di talune interleuchine, elevata concentrazione sierica di LDH e/o di $\beta 2$ microglobulina e diminuita concentrazione sierica di albumina, valorizzata da Gobbi et al. (1985) soprattutto per la prognosi della MH. L'analisi multivariata ed altri complessi metodi statistici (Gobbi et al., 1989) hanno permesso di discriminare nell'ambito di questi parametri un ristretto gruppo di fattori di elevatissima significanza statistica. Su questa base sono stati elaborati diversi indici prognostici. Tra i più favorevolmente accolti segnaliamo quelli dovuti al G.E.L.A. (Coiffier et al., 1991) (tab. XX) e all'International Non-Hodgkin lymphoma prognostic factor project (Shipp et al., 1993) (tab. XXI), che si avvalgono ambedue di 4 variabili maggiori, non del tutto identiche nei due indici. L'equazione elaborata da Gobbi et al. (1994) per stimare la sopravvivenza mediana in soggetti affetti da MH, contempla invece 6 variabili (stadio, età, istotipo, sintomi B, concentrazione sierica di albumina, sesso). Distribuzione delle aree di coinvolgimento linfomatoso). Anche questi relativamente semplici consentono di discriminare i pazienti che probabilmente si otterranno buone risposte terapeutiche con schemi di chemioterapia standard, da quelli che richiedono trattamenti più aggressivi (chemioterapia sopramassimale, combinata da trapianto di midollo osseo o di cellule staminali, in fase di prima remissione completa).

Bibliografia

- Au V., Leung A. N., *Am. J. Radiol.*, 1997, 168, 93-98.
 Balthazar E. J., Noordhoorn M., Megibow A. J., Gordon R. B., *Am. J. Radiol.*, 1997, 168, 675-680.
 Bruneton J. N., Schneider M., *Radiology of lymphomas*, 1986, Springer, Berlin.
 Carbone P. P., Kaplan H. S., Musshoff K. et al., *Cancer Res.*, 1971, 31, 1860-1862.
 Carlsen S. E., Bergin C. J., Hoppe R. T., *Am. J. Roentgenol.*, 1993, 160, 1191-1195.
 Celikoglu F., Teirstein A. S., Krellenstein D. Y., Strauchen J. A., 1992, 101, 1357-1360.
 Forsgren G., Nyman R., Glimelius B. et al., *Acta Radiol.*, 1994, 35, 564-569.
 Front D., Bar-Shalom R., Epelbaum R. et al., *J. Nucl. Med.*, 1993, 34, 2101-2104.
 Front D., Ben-Haim S., Israel O., *Radiology*, 1992, 182, 359-363.
 Gasparini M., Bombardieri E., Tondini C., *Tumori*, 1995, 81, 173-178.
 Gobbi P. C., Comelli M., Grignani G. E. et al., *Haematologica*, 1994, 79, 241-255.
 Gobbi P. G., Giendarini A., Crema A. et al., *Cancer*, 1985, 55, 389-393.
 Gobbi P. G., Gobbi P. G., Mazza P., Zinzani P. L., *Haematologica*, 1989, 74, 29-38.
 Guermazi A., Ferme C., de Kerviler E. et al., *Radiology*, 1996, 199, 283-284.

- Guernelli N., *Le neoformazioni del mediastino*, 1979, Ed. C.E.L.I., Bologna.
- Jaffe J., *Blood*, 1993, **82**, 2251.
- Lee K. S., Kim Y., Primack S. L., *Am. J. Radiol.*, 1997, **168**, 338-345.
- Lee V. S., Martinez S., Coleman R. E., *Radiology*, 1997, **203**, 237-244.
- Levine M. S., Rubesin S. E., Pantongrag-Brown L. et al., *Am. J. Radiol.*, 1997, **168**, 165-172.
- Lister T. A. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1990, **7**, 1630.
- Mauri C., Mauri C. I. jr., *Diagnostica delle malattie dei linfonodi*, in Beretta Anguissola A. ed., *Medicina Clinica*, Cg Ed. Med. Scient., Torino, 1990, **6**, 663-726.
- Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La Malattia di Hodgkin*, 1987, Mucchi Ed., Modena, p. 121.
- Murphy S. B., *N. Engl. J. Med.*, 1978, **299**, 446.
- Murphy S. B., Fairclough D. L., Hutchinson R. E. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1989, **7**, 186.
- Musumeci R., Tesoro-Tess J. D., *Curr. Opin. Oncol.*, 1994, **6**, 464-469.
- Na D. G., Lim N. K., Byun H. S. et al., *Am. J. Radiol.*, 1997, **168**, 1311-1316.
- Newman J. S., Frances I. R., Kaminski M. S., *Radiology*, 1994, **190**, 111-116.
- Palazzo L., Roseau G., Ruskone-Fourmestreaux A. et al., *Endoscopy*, 1993, **25**, 502-508.
- Rosenberg S. A., *Cancer Treat. Rep.*, 1977, **61**, 1023-1027.
- Rosenberg S. A., Boiron M., De Vita V. et al., *Cancer Res.*, 1971, **31**, 1862-1863.
- Saul S. H., Kapadia S. B., *Cancer*, 1985, **56**, 157-166.
- Semelka R. C., Kelekis N. L., Burdeny D. A. et al., *Am. J. Radiol.*, 1996, **166**, 823-827.
- Spier A. S. D., Husband J. E. S., MacVicar A. D., *Radiology*, 1997, **203**, 369-376.
- Tardivon A. A., Munck J. N., Shapeero L. G., *Ann. Oncol.*, 1995, **6**, 1249-1257.
- Tura S., Fiacchini M., Zinzani P. L. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 925-930.
- Van Beers B. E., Galler B., Pringot J., *Radiology*, 1997, **203**, 297-306.
- Wahl R. L., Quint L. E., Cieslack R. D. et al., *J. Nucl. Med.*, 1993, **34**, 1190-1197.
- Wernecke K., Vassallo P., Rutsch F. et al., *Radiology*, 1992, **181**, 375-383.

CARLO MAURI E CLAUDIA MAURI

QUADRI CLINICI

SOMMARIO

MALATTIA DI HODGKIN	col. 3351
Sintomatologia e storia naturale (col. 3351). - Reperti ematologici ed ematochimici (col. 3361). - Segni e patogenesi della immunopatia hodgkiniana (col. 3362). - Diagnosi (col. 3363).	
LINFOMI NON-HODGKIN	col. 3363
1. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B	col. 3363
1.1. LINFOMI NON-HODGKIN DA PRECURSORI CELLULARI B	col. 3363
1.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLASTICO B	col. 3363
Premessa (col. 3363). - Quadro clinico (col. 3364). - Prognosi (col. 3364).	
1.2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B PERIFERICHE	col. 3364
1.2.1. LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA B/LEUCEMIA PROLINFOCITICA B/LINFOMA LINFOCITICO A PICCOLE CELLULE	col. 3364
Premessa (col. 3364). - Quadro clinico (col. 3365). - Prognosi (col. 3366). - Diagnosi differenziale (col. 3367).	
1.2.2. LINFOMA LINFOPLASMACITOIDE/IMMUNOCITOMA	col. 3368
Quadro clinico (col. 3368). - Decorso (col. 3370). - Diagnosi differenziale (col. 3370).	
1.2.3. LINFOMA DELLE CELLULE MANTELLARI	col. 3370
Quadro clinico (col. 3370). - Decorso (col. 3371).	
1.2.4. LINFOMI DEL CENTRO FOLLICOLARE	col. 3371
Quadro clinico (col. 3372). - Decorso (col. 3372).	

1.2.5. LINFOMA DELLA ZONA MARGINALE/MALT-LNH	col. 3373
Premessa (col. 3373). - Linfoma della zona marginale (MZBL) a insorgenza primaria linfonodale (col. 3373). - MALT-linfomi (col. 3373): Linfomi gastrointestinali primitivi. - Malattie immunoproliferative del tenue, di tipo MALT. - MALT-linfomi delle ghiandole salivari. - MALT-linfomi del polmone. - MALT-linfomi della tiroide. - MALT-linfomi dell'orbita (bulbo oculare e annessi oculari). - Altre localizzazioni di MALT-linfomi. Linfoma splenico primario a cellule B della zona marginale (col. 3384).	
1.2.6. TRICOLEUCEMIA (HAIRY CELL LEUKEMIA)	col. 3385
Esordio (col. 3386). - Decorso (col. 3386). - Prognosi (col. 3386). - Varietà clinico-ematologiche (col. 3386).	
1.2.7. PLASMACTOMA	col. 3387
Plasmactoma primario extramidollare (col. 3387).	
1.2.8. LINFOMA DIFFUSO A GRANDI CELLULE B	col. 3389
Premessa (col. 3389). - Forma primitiva (col. 3389). - Forme secondarie (col. 3390). - Varianti anatomico-cliniche dei linfomi a grandi cellule B (col. 3391): Linfoma a grandi cellule B, ricco in linfociti T. - Linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino. - Linfoma primario delle cavità corporee, AIDS-correlato.	
1.2.9. LINFOMA LINFOBLASTICO DI BURKITT	col. 3392
Premessa (col. 3392). - Quadro clinico (col. 3392). - Decorso (col. 3394). - Linfoma linfoblastico a cellule B ad alta malignità, Burkitt-simile (col. 3394).	
2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE T (O NK)	col. 3395
2.1. NEOPLASIE DERIVATE DA PRECURSORI T-CELLULARI	col. 3395
2.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLASTICO T	col. 3395
Quadro clinico (col. 3395). - Decorso (col. 3396).	
2.2. NEOPLASIE DERIVATE DA CELLULE LINFOLDI T-PERIFERICHE	col. 3396
2.2.1. LINFOMI A CELLULE T-PERIFERICHE NON ALTRIMENTI SPECIFICABILI	col. 3396
Quadro clinico (col. 3396). - Decorso (col. 3397).	
2.2.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA T. LEUCEMIA PROLINFOCITICA T	col. 3398
Leucemia linfatica cronica T (col. 3398). - Leucemia prolinfocitica T (col. 3398).	
2.2.3. LEUCEMIE A GRANDI LINFOCITI GRANULATI	col. 3399
Premessa (col. 3399). - Leucemia a LGL-T CD3 positive (col. 3399). - Leucemia a LGL-NK CD3 negative (col. 3400).	
2.2.4. MICOSI FUNGOIDE-SINDROME DI SÉZARY E ALTRI LINFOMI CUTANEI PRIMITIVI	col. 3401
Premessa (col. 3401). - Micosi fungoide (col. 3401): Forma classica. - Forma eritrodermica. - Forma fungoide d'emblée. - Sindrome di Sézary (col. 3404). - Particolari forme linfoproliferative cutanee primitive a cellule T periferiche (col. 3404).	
2.2.5. LINFOMA EPATO-SPLENICO A CELLULE T _H	col. 3407
2.2.6. LINFOMA SOTTOCUTANEO PANNICULITICO A CELLULE T	col. 3408
2.2.7. LINFOMA A CELLULE LINFOEPITELIIDI (LINFOMA DI LENNERT)	col. 3408
2.2.8. LINFOMA ANGIOIMMUNOBLASTICO	col. 3409
Premessa (col. 3409). - Quadro clinico (col. 3409). - Decorso (col. 3410).	
2.2.9. LINFOMA ANGIOCENTRICO	col. 3410
Premessa (col. 3410). - Forme cliniche (col. 3410). - Prognosi (col. 3412). - Diagnosi differenziale (col. 3412). - Linfoma angiotropico a grandi cellule (col. 3412).	
2.2.10. LINFOMA PRIMITIVO INTESTINALE A CELLULE T ASSOCIATO AD ENTEROPATIA	col. 3413
Introduzione (col. 3413). - Quadro clinico (col. 3414). - Prognosi (col. 3414).	

LINFOMI

2.2.11. LINFOMA/LEUCEMIA DELL'ADULTO A CELLULE T col. 3414

Introduzione (col. 3414). - **Quadri clinico-ematologici** (col. 3415): *Forma acuta/subacuta*. - *Forma cronica*. - *Forma «linfomatosa»*. - *Forma «smoldering»*.

2.2.12. LINFOMA A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE CD30 POSITIVE (A CELLULE T O NULL) col. 3416

Introduzione (col. 3416). - **T-ALCL CD30+ primario** (col. 3417). - **T-ALCL CD30+ secondario** (col. 3419).

MALATTIA DI HODGKIN

La malattia di Hodgkin (MH) è una neoplasia non frequente, che predilige il sesso maschile (fa eccezione il sottotipo istologico NS) e presenta una caratteristica distribuzione per età di tipo bimodale (fig. 62). Per quanto attiene alla valutazione della morbidità e mortalità per MH ed ai rapporti statistici tra età, sesso, sottotipi istologici nelle diverse etnie ed aree geografiche, v. sopra *Epidemiologia*.

Sintomatologia e storia naturale

Il quadro clinico d'esordio è variabile da caso a caso, per la possibile presentazione in stadi diversi di diffusione della malattia, con diverse localizzazioni e con assenza o presenza di *sintomi generali*, in rapporto anche al sottotipo istologico (tab. XXII). Febbricola o rialzi termici elevati ed irregolari o ciclico-ondulanti (tipo Pel-Ebstein, con cicli di 5-15 giorni), sudorazione notturna (specie alla nuca), prurito generalizzato o distrettuale, astenia profonda, calo ponderale si osservano frequentemente negli stadi III-IV con sottotipo istologico sfavorevole (MC/LD), sia all'esordio

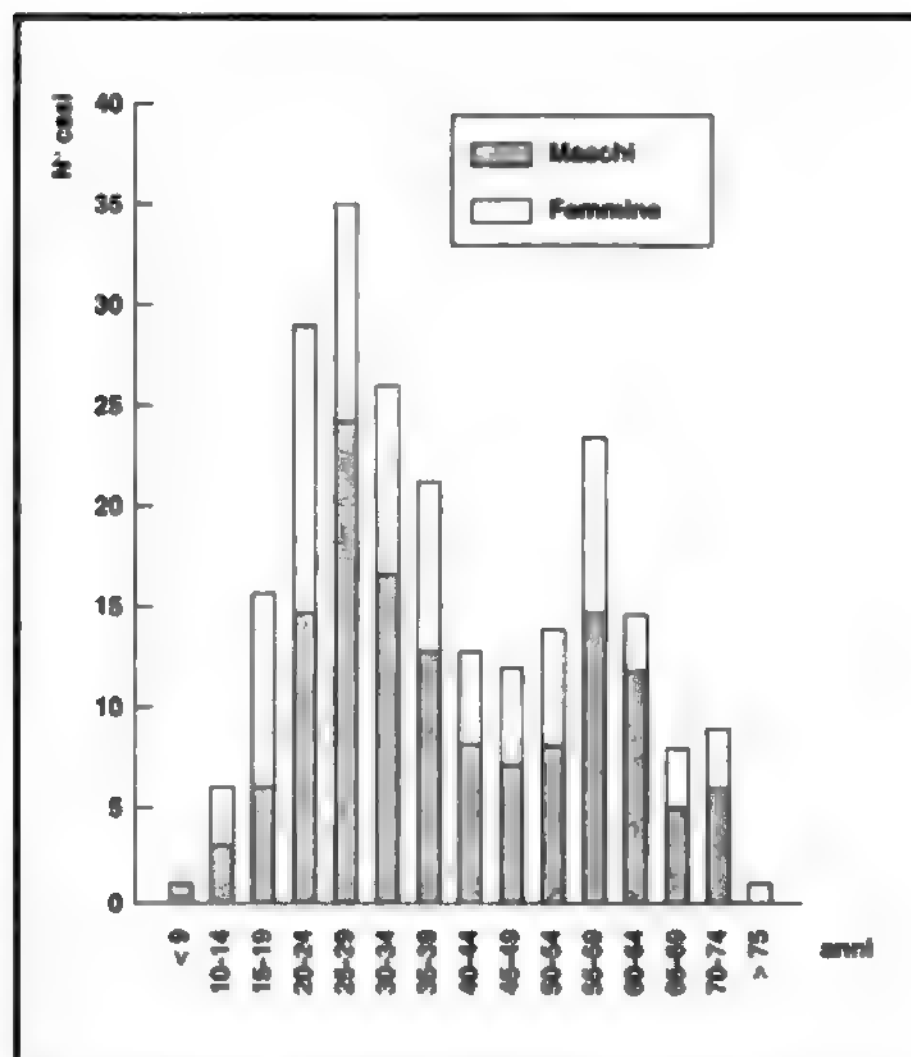


Fig. 62. Malattia di Hodgkin. Distribuzione della casistica tra le varie classi di età, nei due sessi.

TAB. XXII. MALATTIA DI HODGKIN: CARATTERISTICHE DI ESORDIO NEI DIVERSI SOTTOTIPI ISTOLOGICI (IN 516 CASI DI MH RECLUTATI DAL GISL)

(Gruppo Italiano Studio Linfomi, Coordinatore C. Mauri, dati al 1996)

	LP %	NS %	MC %	LD %	Tutti %
Stadio					
I	25	11	16	16	14
II	55	54	38	37	48
III	15	24	31	32	26
IV	5	11	13	16	11
Sintomi generali	17	41	40	63	40
Sesso					
M	80	45	59	63	52
F	20	55	41	37	47
Età media alla diagnosi (anni)	44	33	41	42	40
Indice Prognostico del GELA^(a)					
rischio basso	71	40	39	11	41
rischio intermedio	24	49	48	72	58
rischio alto	5	10	12	17	11
Indice Prognostico Internazionale					
rischio basso	86	83	68	65	78
rischio basso/intermedio	11	12	20	18	15
rischio intermedio/alto	3	3	5	12	4
rischio alto	—	1	6	6	2
VES elevata (> 15)	37	78	71	89	73
LDH elevata	10	17	16	23	16

^(a) GELA = Gruppo Europeo Linfomi. LP = linfoma plasmocitico; NS = sclerosi nodulare; MC = cellularità mista; LD = deplezione linfocitica.

LP = plasmocitoma; NS = sclerosi nodulare; MC = cellularità mista; LD = deplezione linfocitica.

che in corso di malattia, ma possono essere presenti anche in stadi e con sottotipi istologici più favorevoli. In caso di localizzazione addominale clinicamente silente la febbre intermittente-remittente può costituire per qualche tempo l'unico segno di malattia. In fasi più avanzate la febbre assume andamento continuo.

Costante è la precoce comparsa di *linfadenomegalie* superficiali e/o profonde (l'esordio in sede extralinfonodale esclusiva è eccezionale). Limitato in genere, all'inizio, ad una o a poche stazioni linfonodali, nelle fasi ulteriori il processo morboso tende a generalizzarsi, con interessamento a tappe successive di stazioni linfonodali contigue (od anche non contigue), della milza e di vari organi ed apparati (v. sopra *Diffusione dei linfomi*, col. **3320). La frequenza delle singole localizzazioni è assai varia ed è in rapporto anche con il sottotipo istologico della MH (tab. XXIII). Tra le localizzazioni superficiali prevalgono le latero-cervicali e le sovraclaveari (specie del lato sinistro del collo). Frequente è pure la localizzazione al mediastino. Le localizzazioni profonde addominali comprendono in varia misura le stazioni linfonodali retroperitoneali e quelle agli ili splenico, epatico, renali, solo eccezionalmente le mesenteriche.

I *linfonodi superficiali* hanno dimensioni variabili da caso a caso; in genere quelli interessati per primi conservano volume inferiore rispetto alle localizzazioni successive. Caratteristiche sono la rapi-

dità dell'accrescimento (però senza mai assumere dimensioni vistose) e le spontanee variazioni di volume. I linfonodi hanno consistenza dura e superficie liscia, sono indolenti (ma caratteristica — per quanto infrequente — è la loro spiccata dolorabilità spontanea dopo ingestione di alcoolici); mobili e isolati all'inizio, tendono successivamente a confluire in pacchetti a superficie bozzuta e ad aderire ai tessuti finitimi.

La *localizzazione mediastinica* è frequente e può costituire la manifestazione iniziale primaria e isolata della malattia (specie in giovani donne con MH di sottotipo NS). Le masse linfonodali mediastiniche ledono le strutture viciniori (vasi, nervi, vie aeree, esofago, ecc.) provocando una polimorfa sintomatologia (*sindrome mediastinica*) diversa da caso a caso (v. SINDROME MEDIASTINICA, IX, 602-613).

Una massa linfomatosa neoformata in sede mediastinica appare all'esame radiologico standard (fig. 63) come un'opacità densa e omogenea ai lati dell'ombra mediastinica con cui è fusa, occupandone gli spazi circostanti. Le masse linfomatose sono situate per lo più nel mediastino antero-superiore od anche nell'anteriore-medio oppure in area prettamente timica (fig. 64), più raramente nel mediastino medio e all'ilo polmonare, eccezionalmente nel mediastino posteriore. La massa ha sviluppo asimmetrico, forma globosa, limiti netti oppure un po' sfumati, contorni policiclici festonati o mammellonati. Non raro è tuttavia anche il reperto di margini poco incurvati o del tutto rettilinei, qualora le masse linfonodali dislochino all'esterno la vena cava superiore oppure se il connettivo lasso mediastinico è invaso dal processo neoplastico. Tali opacità sono prive di pulsilità intrinseca. La *tomografia computerizzata* (TC) fornisce reperti più esatti circa le dimensioni delle masse

TAB. XXIII. MALATTIA DI HODGKIN. LOCALIZZAZIONI ALL'ESORDIO PER SOTTOTIPO ISTOLOGICO (IN 516 CASI DI MH RECLUTATI DAL GISL)

(Gruppo Italiano Studio Linfomi, Coordinatore C. Mauri)

Localizzazioni	LP %	NS %	MC %	LD %	Tutti %
linfonodali					
laterocervicali	60	59	59	42	58
sovraclaveari	40	64	51	47	58
ascellari	22	39	36	37	37
mediastinici	12	70	48	47	58
ilo polmonare	5	18	21	31	18
anello Waldeyer	7	1	1	—	1
inguinali	20	22	26	26	23
lombo-aortici	12	15	33	47	22
celiaci	5	7	8	16	8
mesenterici	12	■	■	16	6
ilo renale	2	1	2	5	2
ilo splenico	2	5	6	—	5
ilo epatico	5	3	7	10	5
extralinfonodali					
polmone	3	5	1	5	3
pleura	—	1	2	5	2
fegato	3	2	4	—	2
milza	7	11	17	21	13
pancreas	—	—	—	—	—
stomaco	—	—	1	5	0,6
intestino	2	—	—	—	0,2
scheletro	—	0,5	0,6	—	0,4
cute	—	1	0,6	—	0,4
S.N.C.	—	0,3	—	—	0,2
midollo osseo	—	■	■	16	5

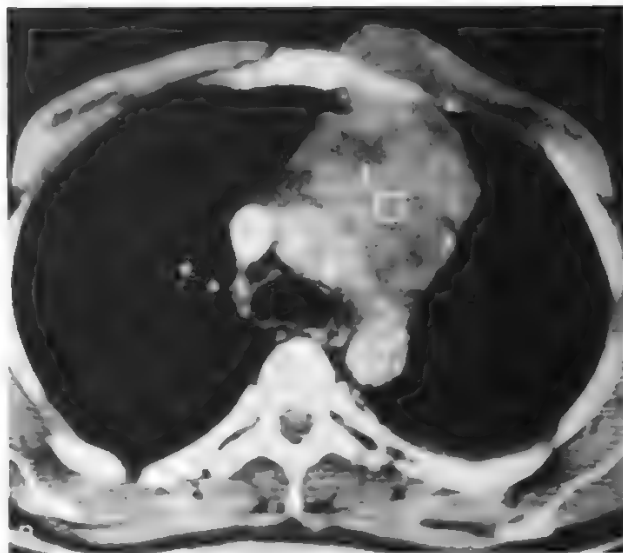


Fig. 63. Malattia di Hodgkin. A) Radiografia del torace. Voluminosa neoformazione a margini polipoidici dell'emitorace sinistro a partenza mediastinica. B) TC torace. Una massa linfomatosa del mediastino anteriore infiltra la parete toracica e il tessuto sottocutaneo parasternale sinistro.

linfonodali e permette di individuare linfadenomegalie in sedi difficilmente esplorabili con il radiogramma standard (angolo cardio-frenico, catene mammaria interna e paratracheale, ecc.) e di svelare masse linfomatose di piccole dimensioni, specie in sede mediastinica media (sottocarenale, paraesofagea). Altri utili reperti diagnostici possono essere acquisiti con la RMN (ad es. per la DD di masse residue fibrose) e con la scintigrafia con ^{67}Ga -citrate (v. sopra *Stadiazione*).

Le localizzazioni linfonodali addominali sono spesso clinicamente silenti o provocano generici disturbi digestivi. In più rari casi danno luogo a fenomeni di stasi venosa e linfatica agli arti inferiori e ai genitali e talora anuria, da stenosi estrinseca bilaterale degli ureteri. I linfonodi possono essere apprezzati con la palpazione dell'addome solo se raggiungono notevole volume; talora provocano dislocazione di visceri o loro compressione. La visualizzazione diretta delle masse è affidata alla TC, all'ecografia, eventualmente alla linfografia addomino-pelvica con mezzo di contrasto oleoso (v. sopra *Stadiazione*).

La localizzazione polmonare è quasi sempre associata a quella mediastinica; eccezionalmente costituisce manifesta-

zione primitiva ed isolata della malattia. Tosse secca o con espettorato muco-purulento o emorragico ne costituiscono i segni clinici, che peraltro possono mancare.

Gli aspetti radiologici delle localizzazioni polmonari (fig. 65) sono polimorfi: infiltrazioni partenti dalle masse mediastiniche, diffusione peribronchiale e nodulare, disseminazione micronodulare, focolai multipli confluenti, infiltrazione lobare massiva. Talora si osservano escavazione dei focolai infiltrativi, atelettasia zonale, versamenti pleurici sierofibrinosi od anche chilosi o emorragici (più frequenti a sinistra). Insolita è la localizzazione pleurica, in forma per lo più nodulare.

Una modica splenomegalia, a superficie liscia e di consistenza duro-elastica, è presente all'esordio nel 10-20% dei casi, ma nel corso della malattia è apprezzabile nel 65%. Rara è la grande splenomegalia. Il reperto di un modesto ingrandimento della milza non è di per sé probante di localizzazione splenica della neoplasia. La presenza di masse linfomatose intraspleniche è ben documentabile con TC o con ecografia (fig. 66). Nel 50% dei casi e soprattutto in fase avanzata di malattia il fegato è moderatamente ingrandito. Presenza e dimensioni di masse neoformate intraepatiche sono evidenziabili con TC e con ecografia. L'ittero non è infrequente, spesso espressione di colestasi intraepatica, talora dovuto ad iperemolisi (autoimmune), altre volte a compressione delle vie biliari extraepatiche da parte di masse linfomatose.

Frequente nelle statistiche autopsiche, spesso latente all'esame clinico, l'interessamento del miocardio e del pericardio può rivelarsi, specie in fasi avanzate di malattia, con segni d'insufficienza cardiaca, alterazioni elettrocardiografiche, versamento o sinfisi pericardica. Rare sono le localizzazioni al tubo digerente, con focolai unici o multipli allo stomaco o al digiuno, eccezionalmente nei segmenti intestinali distali. I sintomi clinici, radiologici ed endoscopici sono quelli generici di una neoplasia stenotomica o ulcerata.

L'interessamento scheletrico è documentato nel 50% dei casi autopsici, ma si traduce in manifestazioni cliniche e/o radiologiche solo in circa il 15% dei casi. È infrequente all'esordio. Sedi predilette sono le vertebre, indi sterno, coste, bacino. La localizzazione vertebrale si palesa clinicamente con dolori radicolari (sciatica!) e con rigidità del rachide o con sindromi da lesione spinale; radiolo-

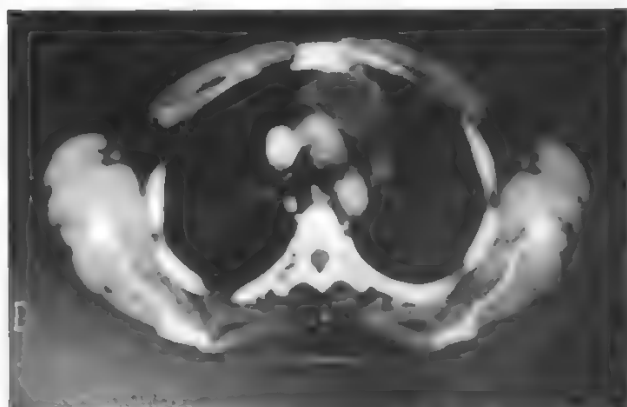


Fig. 64. Malattia di Hodgkin. TC torace. Neoformazione prevalentemente a partenza mediastinica che infiltra il polmone sinistro.

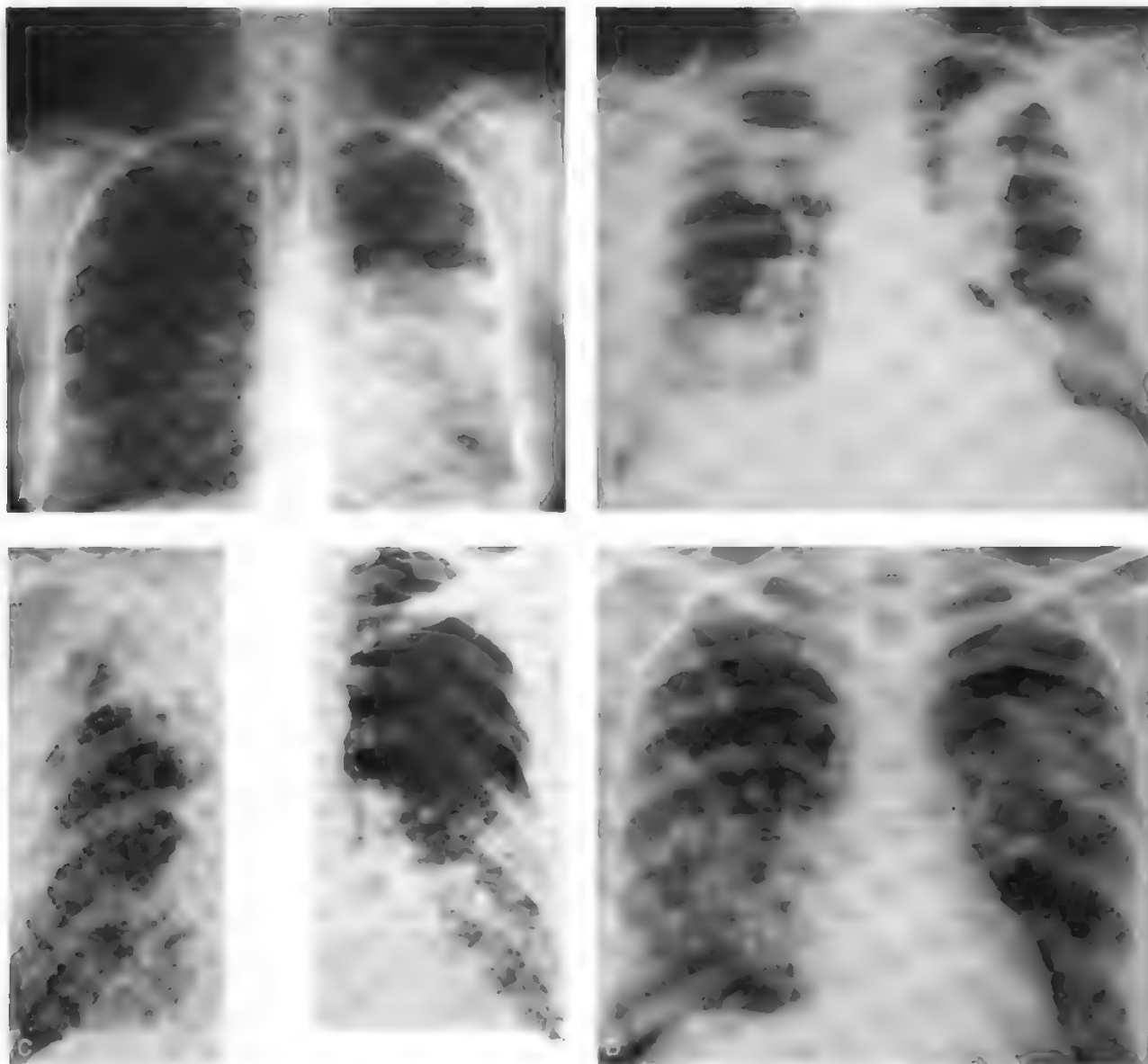


Fig. 65. Malattia di Hodgkin. Radiografia del torace. A) Voluminosa massa linfoadenopatica ilare sinistra e noduli parenchimali scavati al lobo superiore sinistro e inferiore destro. B) Masse ilari e para-ilari a margini policiclici e noduli rotondeggianti a limiti sfumati in entrambi i campi polmonari. C) Espressioni radiologiche polimorfe di localizzazioni parenchimali polmonari, di aspetto massivo nel lobo superiore destro, di tipo micronodulare simil-miliario nelle aree inferiori e medie bilateralmente. D) Aspetto nodulare di tipo «alveolare», con lesioni parzialmente confluenti, in entrambi i campi polmonari.

gicamente (figg. 67-68) con quadri di osteoporosi, aree osteolitiche, schiacciamento di corpi vertebrali, raramente con lesioni osteoplastiche (vertebre d'avorio). Non sono rare le fratture patologiche.

In più del 10% dei casi di MH si manifestano *sintomi neurologici*, talora precoci, più spesso tardivi. Conseguono a collasso vertebrale o ad occupazione dello spazio epidurale da parte di colate linfomatose provenienti da linfonodi prevertebrali attraverso i foramina vertebrali, a localizzazioni nel nevrasse (spinali od encefaliche). Tra i quadri neurologici più frequenti ricordiamo le radicoliti, le paresi di nervi cranici, le lesioni spinali trasverse o di tipo siringomicelico, le crisi convulsive focali, l'ipertensione endocranica, i quadri di processo espansivo cerebrale. Una rara complicanza neurologica è l'*encefalopatia demielinizzante disseminata* (Astrom) che si manifesta con deficit focali motori e sensitivi multipli e progressivi e rapido deterioramento delle facoltà psichiche; viene attribuita ad un *Papova virus*.

Tra le *lesioni cutanee aspecifiche*, spesso associate alla MH, ricordiamo la melanodermia, l'eritrodermia esfoliativa, gli esantemi orticarioidi, il frequente e talora estesissimo herpes zoster (zoster varicella). Le *alterazioni cutanee specifiche* sono rare (presenti solo nello 0,5-3,4% dei casi) e comprendono noduli e veri e propri tumori cutanei, localizzati soprattutto al torace. Eccezionale è la *forma cutanea primaria della MH*, che può precedere anche di due anni le manifestazioni linfonodali sistemiche (Kumar *et al.*, 1996). Il suo decorso clinico è solitamente aggressivo. Tali forme devono essere differenziate dalla *papulosi linfomatoidale* (v. col. **3406).

Benché rara, la *localizzazione primaria della MH nell'anello di Waldeyer* è stata rigorosamente documentata (Kapadia *et al.*, 1995).

Ogni altro organo può essere invaso dal processo hodgkiniano, con sintomatologie che richiamano quelle dei carcinomi e sarcomi primitivi: non di rado tuttavia queste localizzazioni sono clinica-

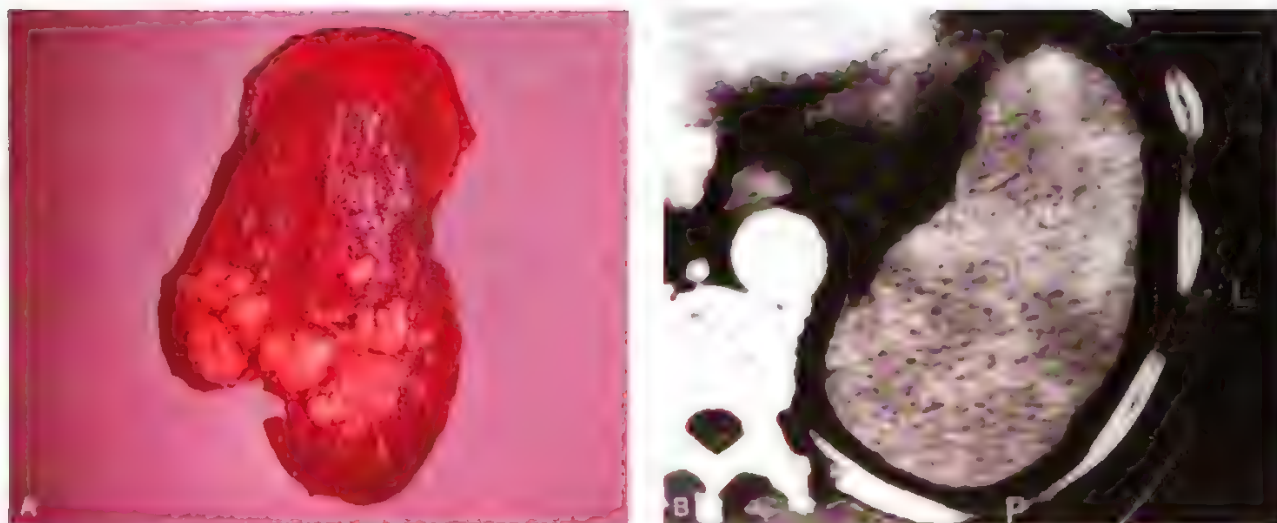


Fig. 66. Malattia di Hodgkin. A) Milza, aspetto macroscopico di grossi noduli confluenti di colorito biancastro ad un polo del viscere. B) TC. Milza. Aspetto disomogeneo del parenchima splenico per la presenza di voluminosi noduli ipodensi.

mente silenti e vengono scoperte solo con esami radiologici o all'autopsia.

La storia naturale della malattia comporta in genere un decorso cronico, con periodi di inattività ed anche di regressioni spontanee, seguite da recidive e aggravamento, con exitus in condizioni anemico-cachettiche (paragonate a quelle proprie della *wasting disease*), per lesioni d'organo, anemia emolitica autoimmune, complicanze infettive (tubercolosi, virali, micosi) facilitate dalla immunodeficienza propria della MH. In epoca pre-citostatica (e di radioterapia solo locoregionale) si giungeva al decesso in media

dopo 2 anni dall'esordio clinico, ma si osservavano pure casi ad evoluzione acuta (circa 6 mesi) ed altri ad evoluzione spontanea cronicissima (più di 10 anni). L'avvento degli attuali indirizzi terapeutici ha mutato radicalmente l'evoluzione della malattia e la sua prognosi (v. a suo luogo). Nel 5-15% dei casi a lungo sopravvissuti od anche guariti grazie ad appropriata terapia combinata può tardivamente manifestarsi una *leucemia acuta mieloide* (in genere preceduta da una *sindrome mielodisplastica*) o un *LNH* di linea B o T o un *carcinoma* («seconda neoplasia») (Swerdlow *et al.*, 1993). Per i rapporti fra tipo di terapia, durata dell'inter-

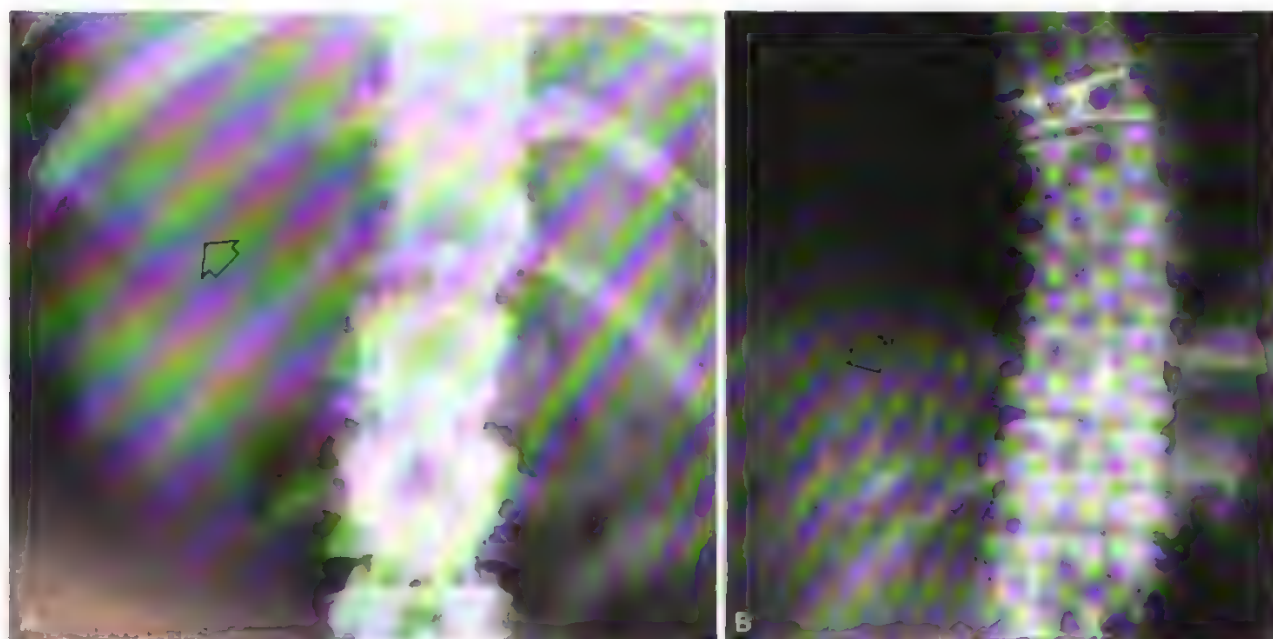


Fig. 67. Malattia di Hodgkin. Radiografia del rachide e coste. A) Aree osteolitiche multiple delle coste e del rachide; 11ª costa destra evanescente. B) Collasso del corpo D7 e deformazione con osteolisi della 10ª costa destra.

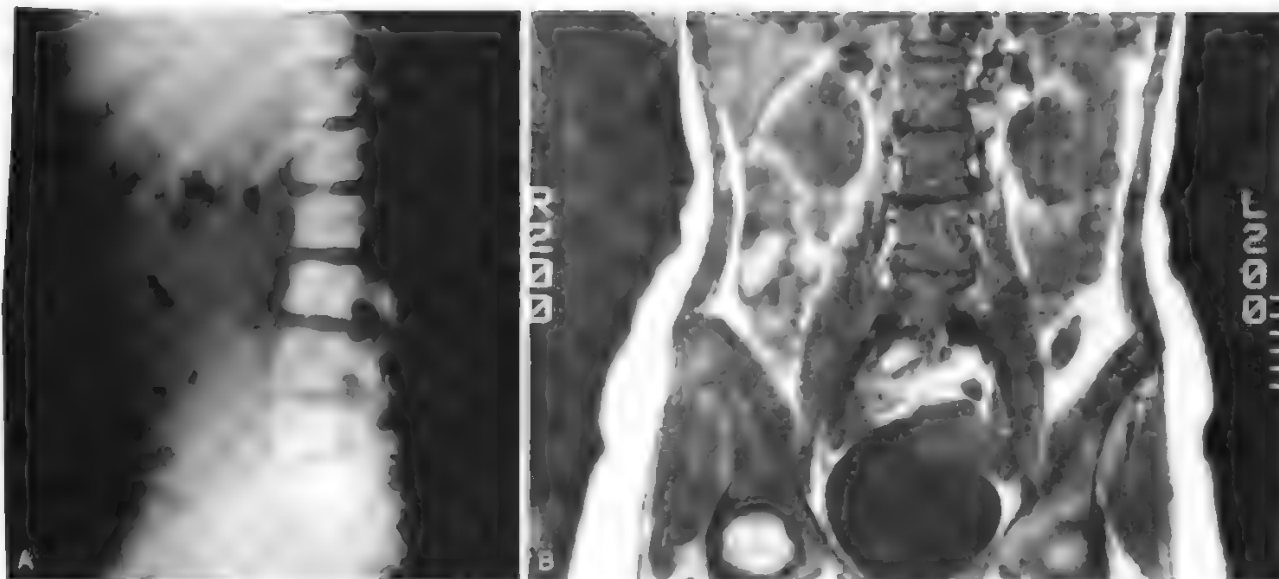


Fig. 68. Malattia di Hodgkin. A) Radiografia del rachide. Alterazione strutturale di tipo prevalentemente addensante di numerosi metameri vertebrali lombari (particolarmente evidente in L3). B) RMN, sequenza coronale pesata in T₁. Diffusa alterazione di segnale (ipointenso) riferibile ad infiltrazione linfomatosa del rachide lombare e del bacino.

vallo fra terapia e seconda neoplasia, natura di questa, v. la voce LEUCEMIE (v. col. **3149).

Reperiti ematologici ed ematochimici

Costante è l'anemia normo- o ipocromica dovuta a sequestro splenico, ad iperemolisi autoimmune, ad iposideremia da sideropessi, raramente ad eritroblastopenia. La concentrazione ematica dei leucociti si aggira di solito su valori di $10 - 20 \times 10^9/L$ con neutrofilia assoluta, ma si può riscontrare anche leucopenia, specie nelle forme addominali. Quasi costante è la linfopenia assoluta ($< 1,0 \times 10^9/L$ nel 20% dei casi). Spesso si riscontra monocitosi. In meno del 50% dei casi si osserva eosinofilia. La concentrazione ematica delle piastrine è normale.

I reperiti citologici del midollo osseo (agoaspirato) sono spesso poco significativi. È insolito reperire negli strisci di midollo osseo cellule H-RS, mentre nelle biopsie osteomidollari tale reperto figura nel 5-22% dei casi e all'autopsia si riscontra nel 50%. La localizzazione hodgkiniana si presenta nel midollo osseo in forma focale o plurinodulare, raramente come infiltrato diffuso. Importanti ragguagli circa la topografia e l'entità dell'infiltrazione hodgkiniana sono forniti dall'esame con RMN (v. fig. 68, B).

Tra i reperiti ematochimici sono da segnalare per la loro frequenza: ipercalcemia, ipofosfatemia, iperfosfatemia alcalina, iperuricemia, ipoalbuminemia con iper-alfa₂- e ipergammaglobulinemia, iperfibrinogenemia, iposideremia e iperferriunemia, ipercupremia, aumento della LDH.

Fattori solubili. - Nel siero di soggetti hodgkiniani si possono reperire citochine e forme solubili di loro recettori, ed anche di antigeni di membrana e di molecole di adesione. Le interleuchine IL-1α e IL-1β sono presenti a bassa concentrazione. I livelli di IL-1ra sono spesso elevati, ma bassi in presenza di sintomi B. IL-6 solubile è presente nel 40-50% dei casi non trattati (Kurrock *et al.*, 1993): è correlata con presenza di sintomi B. TNFR viene reperito nel siero di più del 60% dei casi di MH e la sua concentrazione è correlata allo stadio di malattia ed alla presenza di sintomi B (Gruss *et al.*, 1994). Presenza di GM-CSF associata a IL-3 ed a IL-6 è documentata nel siero del 40% dei pazienti e non è più reperibile in fase di completa e persistente remissione della malattia (Ganse *et al.*, 1992). In più del 75% dei casi con sintomi B e presentazione bulky troviamo nel siero sIL-2R (p 55) (Pizzolo *et al.*, 1987); la concentrazione diminuisce fino alla norma dopo terapia efficace, e la sua bassa concentrazione all'esordio è un segno prognostico favorevole (Ambrosetti *et al.*, 1993). sCD30 è reperibile in elevata

concentrazione nel siero di casi in stadio avanzato, bulky, con sintomi B, di sottotipo LD (Pizzolo *et al.*, 1990). Concentrazioni di sCD30 superiori a 100 U/mL all'esordio di malattia sono indici di elevato rischio di fallimento terapeutico (Nadali *et al.*, 1994). Mentre le concentrazioni sieriche di CD4 in casi di MH non si discostano dalla norma, una elevata concentrazione di sCD8 (50% dei casi) è correlata con lo stadio clinico, presenza di sintomi B, ridotta sopravvivenza; si abbassa dopo terapia efficace (Pizzolo *et al.*, 1990). sICAM-1 è aumentato negli stadi III-IV, con presentazione bulky e sintomi B, in parallelo ad aumentata concentrazione di sIL-2R; la elevata concentrazione di sICAM-1 si riduce nelle fasi di remissione della malattia e riappare nelle recidive (Pizzolo *et al.*, 1993).

Segni e patogenesi della immunopatia hodgkiniana

Nella MH esiste un disordine immunologico, costante nella malattia in atto ma persistente anche nelle fasi di remissione completa e prolungata. Appare compromessa soprattutto l'immunità cellulo-mediata (Aisenberg, 1962; Aisenberg *et al.*, 1978), la cui deficienza è imputabile a deplezione linfocitaria (in particolare dei T helper CD4+) e ad anomalie delle interazioni tra linfocine ed altri mediatori cellulari, con anomala produzione di IFNγ, IL-2, TGFβ. Pure ridotta è la concentrazione ematica dei linfociti NK.

È frequente una modesta monocitosi periferica ma la quantità totale dei monocito-macrofagi sembra essere diminuita, minore è la loro capacità fagocitaria e fungicida, più spiccata invece l'attività soppressiva nei confronti di alcune funzioni linfocitarie, tramite la prostaglandina PGE₂, di cui è aumentata la produzione.

È controverso se nei pazienti hodgkiniani sia compromessa l'immunità umorale: in genere si riscontra normalità della risposta anticorpale ad antigeni cui il paziente era già stato precedentemente esposto, mentre non sarebbe rara una deficienza della risposta umorale primaria. Normale è il numero dei linfociti B in circolo, ma la risposta dei linfociti B al PWM è debole.

Bisogna tenere presente che accanto alle espressioni di deficienza funzionale T sono documentabili anche fenomeni di attivazione di cellule immunocompetenti B e T, di tipo policlonale, ipoteticamente ascrivibili ad una stimolazione cronica del sistema immunocompetente da parte di antigeni di natura ignota (Romagnani *et al.*, 1985).

È possibile (Jones *et al.*, 1976) che il disordine immunologico non sia secondario all'insorgenza del processo hodgkiniano, ma preesista ad esso o per lo meno sia presente già in fase preclinica

LINFOMI

della malattia. Si è constatato che gradi più o meno rilevanti di immunodeficienza sono spesso presenti in familiari dei pazienti hodgkiniani: ciò implicherebbe una base genetica della immunodeficienza hodgkiniana. Si può peraltro ricordare che nei soggetti affetti da immunodeficienza acquisita dell'adulto (AIDS), l'insorgenza della MH è insolita, in contrapposizione a quella di LNH.

Diagnosi

Nelle forme linfonodali superficiali la diagnosi clinica di MH può essere talora difficile non solo rispetto agli altri linfomi senza quadro ematico caratteristico, ma anche nei confronti di linfadeniti e di linfadenopatie non neoplastiche in genere. Non di rado il quesito diagnostico viene chiarito solo dall'esame istologico. La coesistenza di leucocitosi neutrofila e di linfopenia assoluta costituisce un elemento indiziario a favore della malattia di Hodgkin.

Ancora più complessi sono i problemi diagnostici in casi di esclusiva localizzazione hodgkiniana profonda (mediastinica, retroperitoneale, splenica), che offrono quadri clinico-radiologici sostanzialmente non dissimili da quelli propri di LNH. La presenza dei sintomi sistemici B potrà orientare il diagnostico, almeno in via presuntiva, ed elementi decisivi saranno tratti dagli esami biotici.

Bibliografia

- Aisenberg A. C., *Cancer*, 1966, **19**, 385.
Aisenberg A. C., Weitzman S., Wilkes B., *Blood*, 1978, **51**, 439-443.
Ambrosetti A., Nadali G., Vinante F. et al., *Cancer*, 1993, **72**, 201.
Bruneton J. N., Schneider M., *Radiology of lymphomas*, 1986, Springer, Berlin.
Diehl V. ed., *Hodgkin's disease*, Baillière's Clinical Haematology, 1986, **9**, 401-640.
Ganse A., Jung W., Keymis S. et al., *Leuk. Lymph.*, 1992, **7**, 439.
Gruss H. J., Hermann F., Drexler H. G., *Crit. Rev. Oncogenesis*, 1994, **5**, 473.
Jones I. V., Peacock D. B., Greenham L. W., Bullimore J. A., *Lancet*, 1976, **1**, 92-93.
Kaplan H. S., *Hodgkin's disease*, 1980, 2 ed., Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
Kumar S., Kingma D. W., Weiss W. B. et al., *Amer. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 754-759.
Kurzrock R., Redman J., Cabanillas F. et al., *Cancer Res.*, 1993, **53**, 2118.
Mauri C., Mauri C. L., *Diagnostica delle malattie dei linfonodi*, in Beretta Anguissola C. ed., *Medicina Clinica, basi biologiche, diagnostica, terapia*, 1990, Ed. Med. Scient., Torino, **6**, 663-726.
Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La Malattia di Hodgkin*, 1987, Mucchi Ed., Modena.
Nadali G., Vinante F., Ambrosetti A. et al., *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 793.
Pizzolo G., Chilosi M., Semenzato G., *Br. J. Haematol.*, 1987, **67**, 377.
Pizzolo G., Vinante F., Chilosi M. et al., *Br. J. Haematol.*, 1990, **75**, 282.
Pizzolo G., Vinante F., Nadali G., *Br. J. Haematol.*, 1993, **84**, 161.
Romagnani S., Rossi Ferrini P. L., Ricci M., *Semin. Hematol.*, 1985, **22**, 41.
Selby P., McElwain T. J., *Hodgkin's disease*, 1987, Blackwell, Oxford.
Swerdlow A. J., Douglas A. J., Vaughan Hudson G. et al., *Br. J. Cancer*, 1993, **68**, 1006-1011.

CARLO MAURI

LINFOMI NON-HODGKIN

1. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B

1.1. LINFOMI NON-HODGKIN DA PRECURSORI CELLULARI B

1.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLASTICO B

Premessa

La neoplasia a cellule di tipo linfoblastico derivate da precursori B in circa l'80% dei casi ha carattere francamente leucemico già all'esordio (ALL di tipo «null» o «common») e solo in meno del 20% si presenta come l. solido

(B-LbL). È più frequente nell'età infantile che nell'adulto. La distinzione tra l. linfoblastico e leucemia linfoblastica è in buona parte arbitraria e convenzionale. Si pone diagnosi di l. se all'esordio il processo si manifesta con linfadenomegalie superficiali e/o mediastiniche, il quadro ematico è aleucemico, il midollo osseo presenta infiltrazione linfoblastica inferiore al 25%. Situazioni siffatte si riscontrano nei casi di accertamento diagnostico precoce; successivamente — con l'instaurarsi di un quadro ematomidollare leucemico conclamato — una sicura discriminazione tra conversione leucemica di un l. linfoblastico e una forma leucemica *de novo* è aleatoria nella maggior parte dei casi (Nathwani et al., 1981).

Quadro clinico

Il l. linfoblastico esordisce per lo più con localizzazioni linfonodali superficiali (latero-cervicali in primo luogo); il mediastino è interessato nel 15-40% dei casi, più di rado sono coinvolti i linfonodi addominali, talora con quadri vicini al l. di Burkitt (BL). Il midollo osseo è sempre almeno parzialmente infiltrato, in forma diffusa, e maggiormente nelle fasi avanzate di malattia. In più del 50% dei casi in età pediatrica ma spesso anche nell'adulto si osservano localizzazioni cutanee o intestinali (Sander et al., 1991). Nel 20% dei casi si riscontra splenomegalia. La frequente leucemizzazione nel corso del processo linfomatoso si associa spesso a localizzazioni meningo-encefaliche.

Il decorso è altamente aggressivo, con precoce disseminazione sistemica (linfonodale ed extralinfonodale). Con terapie tradizionali la sopravvivenza mediana si aggira sui 6-12 mesi ma migliori prospettive si sono aperte con le attuali terapie eradicanti, che consentono remissioni nel 70% dei casi.

Prognosi

Prognosi particolarmente severa si riscontra in casi con t(9;22), t(1;19) (Fletcher et al., 1991) o con t(4;11)(q21;q23) (Pui et al., 1991) oppure in casi che esprimono CD13 o CD33 o mancano di CD10, CD34, CD24. La prognosi è più favorevole in casi con iperplodia e con immunofenotipo relativamente più maturo (espressione di $c\mu$, κ o λ).

Bibliografia

- Fletcher J. A., Lynch E. A., Kimball V. M. et al., *Blood*, 1991, **77**, 435-439.
Knowles D. M., *Lymphoblastic Lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, 715-747.
Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer Veri, Berlin.
Nathwani B. N., Diamond L. W., Winberg C. D. et al., *Cancer*, 1981, **48**, 2347-2357.
Pui C. H., Fraenkel L. S., Carroll A. J. et al., *Blood*, 1991, **77**, 440-447.
Sander C. A., Medeiros L. J., Abruzzo L. V. et al., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1991, **25**, 1023-1031.

1.2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE B PERIFERICHE

1.2.1. LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA B/LEUCEMIA PROLINFOCITICA B/LINFOMA LINFOCITICO A PICCOLE CELLULE

Premessa

Le neoplasie a piccoli linfociti B periferici comprendono, nella classificazione REAL, la leucemia linfatica cronica B (B-CLL), la leucemia prolinfocitica B (B-PLL) ed il l. linfocitico a piccole cellule (SLL), che in altre classificazioni sono contemplati quali entità distinte (v. sopra, col. **3236, e v. LEUCEMIE, VIII, coll. 1598-1610).

Tale gruppo di leucemie/linfomi è frequente in Occidente e vi prevale la B-CLL con 1,8-3 casi/100.000 persone, mentre più inconsueti sono la PLL ed il SLL. Ne sono colpiti soprattutto soggetti maschi (M/F=2/1) in età superiore ai 50 anni, con picco di massima incidenza nel 7° decennio; sono rari sotto i 30 anni ed eccezionali nell'età infantile-adolescenziale.

Quadro clinico

L'esordio, sempre insidioso in tutte queste forme, è talora caratterizzato da progressiva tumefazione simmetrica dei linfonodi superficiali in sedi sopra- e sotto-diaframmatiche, altre volte (10% dei casi) da splenomegalia apparentemente isolata (evento più frequente nel SLL) oppure da lenta anemia o da comparsa di noduli cutanei. In particolare nella CLL l'esordio può essere anche del tutto asintomatico e la diagnosi viene posta solo in base all'occasionale riscontro di un aumento in circolo di linfociti B. In casi con linfocitosi persistenti $< 10 \times 10^9/L$, senza infiltrazione linfoide del midollo osseo, l'espansione clonale monotipica di B-linfociti dovrà essere provata con l'analisi immunofenotipica ed eventualmente genotipica (Ritis *et al.*, 1997). Le condizioni generali permangono a lungo buone, non si notano febbre né sudorazione.

Nel periodo di stato le linfadenomegalie sono frequenti ma si riscontrano anche casi che permanentemente o per lungo tempo appaiono «alinfadenici», almeno nelle stazioni superficiali. In periodi tardivi la linfadenomegalia è quasi sempre generalizzata sia in sedi superficiali che profonde, ma in genere senza interessare il distretto ilo-mediastinico.

I linfonodi superficiali hanno disposizione simmetrica e di solito dimensioni modeste, specialmente nella B-PLL; sono mobili, non dolenti, hanno superficie liscia e consistenza parenchimatosa, non aderiscono alla cute né formano pacchetti, almeno fino a fasi avanzate. Grosse masse linfonodali confluenti in sede addominale (retroperitoneale e mesenterica) sono tuttavia reperibili nel SLL. Anello di Waldeyer e tonsille possono essere ipertrofici, causando disturbi della deglutizione e fonazione. La milza è solitamente ingrandita e raggiunge dimensioni rilevanti nella tipica B-PLL e nel SLL, in cui può rappresentare il reperto clinico preminente. Meno frequente è l'epatomegalia, raro l'ittero, da colestasi intraepatica o meccanica, per compressione della grande via biliare da parte di masse linfonodali all'ilo epatico. Diarrea, disturbi dispeptici, enterorragie possono essere rivelatori di infiltrazione linfomatosa del tubo digerente (stomaco, tenue) che può dar luogo a reperti radiologici ed endoscopici simil-cancerosi. Nei polmoni si possono reperire all'esame radiologico noduli linfomatosi disseminati. Versamenti pleurici, spesso emorragici, conseguono ad infiltrazione delle pleure o a stasi linfatica o a condizioni discrasiche. Frequente è una condizione di osteoporosi diffusa, più insolita quella di focolai osteolitici; talora il reperto radiologico è di osteosclerosi distrettuale. Eventuali collassi di corpi vertebrali possono provocare dolorabilità e rigidità della colonna. Frequenti sono le lesioni della cute, di tipo aspecifico eritematoso («leucemidi») o in forma di papule o noduli rosso-blauastri, di consistenza duro-elastica, non ulcerati, dovuti a localizzazione linfomatosa. Insolita è la tumefazione delle gh. salivari e/o lacrimali da infiltrazione neoplastica (sindrome di Mikulicz).

Reperti ematologici. — Si compendiano in anemia di vario grado e solitamente di tipo arigenativo; talora Coombs diretto positivo anche in assenza di documentabile iperemolisi in atto; frequente piastrinopenia (raramente associata a manifestazioni emorragiche); leucocitosi di vario grado a seconda del sottotipo di linfoma/leucemia qui considerato e dello stadio di progressione della malattia. La classica B-CLL comporta linfocitosi relativa (anche 99% dei leucociti circolanti) ed assoluta ($> 5 \times 10^9/L$); all'esordio la leuco-

citosi supera di solito i $10 \times 10^9/L$ e nel corso della malattia può raggiungere $500 \times 10^9/L$. Si nota sempre la presenza nel s.p. di prolinfociti e fino a concentrazioni $< 50\%$ la diagnosi è compatibile con CLL (Cheson *et al.*, 1996). Nella B-PLL la leucocitosi spesso supera valori di $100 \times 10^9/L$ e può toccare i $400 \times 10^9/L$. Nella SLL la leucocitemia è per definizione nella norma, con linfocitosi $< 4 \times 10^9/L$, ma nel successivo decorso si possono osservare fasi oligoleucemiche od anche conclamata progressione leucemica, con reperti ematici del tutto sovrapponibili alla B-CLL. Per i reperti morfologici dei linfociti v. col. **3236. La spiccata fragilità delle cellule linfomatose al trauma meccanico dello striscio comporta la presenza delle cosiddette «ombre di Gumprecht» (in specie nella B-CLL). Nel corso della malattia i reperti ematici possono modificarsi per un trapasso dal quadro a piccoli linfociti maturi tipico della B-CLL a forme con elementi simil-plasmacitici o in quadri caratterizzati da concentrazione ematica anche rilevante ($> 50-60\%$) di prolinfociti (trasformazione prolinfocitoide della CLL, precoce o tardiva).

Caratteristica è l'ipogammaglobulinemia, con riduzione preferenziale di IgA e talora anche di IgM. Nel 5-10% dei casi si riscontra discreta ipergammaglobulinemia, talora policlonale, talaltra con modesto picco monoclonale isotipico con le sIg presenti nei linfociti (per lo più IgM, raramente IgG) (Ben-Ezra *et al.*, 1989). Queste forme sono verosimilmente casi borderline con l'immunocitoma linfoplasmacitoide di Lennert.

La storia naturale della B-CLL comporta in genere un decorso tipicamente cronico e lentamente evolutivo. Nella B-PLL il decorso è nettamente più aggressivo. Raramente in questi linfomi/leucemie si nota trasformazione blastica terminale di tipo ALL-B o anche AML (verosimilmente correlata alla terapia antiblastica) (v. LEUCEMIE**, leucemie secondarie, col. **3149). Non infrequente è invece l'evoluzione sia della B-CLL che del SLL in un linfoma a grandi cellule immunoblastiche (sindrome di Richter) spesso insorgente in sedi circoscritte (unica stazione linfonodale o area scheletrica con osteolisi).

L'immunodepressione, più grave in fasi avanzate di malattia, è in rapporto all'ipogammaglobulinemia e alla anomala distribuzione dei linfociti (CD8+ aumentati, CD4+ diminuiti), e può facilitare l'insorgenza di infezioni, talora gravi. Possibili complicanze sono la sindrome nefrosica, l'ipercalcemia, processi autoimmuni (anemia emolitica, porpora piastrinopenica, eritroblastopenia). Non infrequenti sono infine le neoplasie secondarie, specie della cute.

Prognosi

La variabilità del decorso e le possibili complicanze intercorrenti rendono non facile un giudizio prognostico all'esordio di malattia. Particolare peso può essere ascrivito ai parametri elencati nella tab. XXIV.

TAB. XXIV. FATTORI PROGNOSTICI INFAUSTI NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA A CELLULE B (B-CLL)

1. Stadio C (internazionale)/Stadio III-IV (Rai)
2. Breve tempo di raddoppio della massa linfocitica ematica (periodo di osservazione di almeno 2 mesi, e — se le condizioni cliniche lo consentono — di 12 mesi)
3. Anomalie citogenetiche multiple e complesse: presenza di 14q+
4. Massiva infiltrazione linfoide del midollo osseo, di tipo diffuso
5. Concentrazione ematica dei linfociti $> 50 \times 10^9/L$
6. Concentrazione ematica di prolinfociti $> 15 \times 10^9/L$
7. Splenomegalia rilevante (≥ 10 cm sotto l'arco costale)
8. Età > 70 anni
9. Sesso maschile
10. Insoddisfacente o nulla risposta alle terapie

TAB. XXV. SISTEMA DI STADIAZIONE DELLA B-CLL
(Rai et al., 1975)

Stadio	Parametri all'esordio della malattia	Sopravvivenza mediana (anni)
0	Solo linfocitosi ematica e midollare	> 15
I	Linfocitosi e linfadenomegalie	9
II	Linfocitosi e splenomegalia e/o epatomegalia	5
III	Linfocitosi e anemia (Hb < 110 g/L)	2
IV	Linfocitosi e piastrinopenia ($P < 100 \times 10^9/L$)	2

I pazienti in stadio II, III, IV possono o non possono presentare linfadenomegalia; in stadio III e IV non necessariamente presentano spleno-e/o epatomegalia.

TAB. XXVI. SISTEMA INTERNAZIONALE DI STADIAZIONE DELLA B-CLL

(Binet, 1981)

Stadio	Parametri all'esordio della malattia	Sopravvivenza mediana (mesi)
A	Assenza di anemia e di piastrinopenia Meno di tre aree linfatiche coinvolte ¹	120
B	Assenza di anemia e di piastrinopenia Tre o più aree linfatiche coinvolte ¹	~ 80
C	Anemia (Hb < 100 g/L) e/o piastrinopenia ($P < 100 \times 10^9/L$)	54

¹ Linfonodi latero-cervicali, ascellari, inguinali; milza.

Controverso è il valore prognostico del *quadro midollare* (entità e tipo dell'infiltrazione linfomatosa) presentato dalla B-CLL: la sua importanza è sostanzialmente negata da Geisler et al. (1996) e da altri, ma non poche indagini riconoscono che un quadro istologico (biopsia osteomidollare) di massiccia infiltrazione linfomatosa del midollo osseo all'esordio depone per un maggior rischio di progressione della malattia e per una minore probabilità di prolungata sopravvivenza (Molica et al., 1997). Un più chiaro significato prognostico può essere assegnato al *tempo di raddoppio* della massa linfocitica ematica riscontrata nell'arco di 6-12 mesi. Utili criteri prognostici possono infine essere desunti dalla *stadiazione* della B-CLL sia secondo il sistema di Rai (1975) (tab. XXV) sia con il sistema internazionale (Binet, 1981) (tab. XXVI), applicabile anche al SLL.

La *sopravvivenza mediana* della B-CLL è di circa 7 anni, con ampio *range* (i casi con cariotipo normale hanno sopravvivenza > 15 anni). Nella tipica B-PLL la sopravvivenza mediana si aggira sui 3 anni e analoga è la prospettiva di sopravvivenza dei casi di B-CLL con trasformazione prolinfocitoide e concentrazione di prolinfociti $> 15 \times 10^9/L$ associata a rilevante splenomegalia. Per il SLL i dati sono più incerti, perché è insolito che perduri a lungo lo stato aleucemico e se vi è progressione leucemica la malattia viene considerata come B-CLL.

Diagnosi differenziale

Va posta sia nell'anabasi delle tre forme insieme contemplate dal RL-ALC, sia nel confronto di altri linfomi/leu-

cemie di linea B-linfocitaria, quali HCL, LPL, MZCL, MCL, ed anche l. centrollicolari leucemizzati: più che sulle risultanze cliniche, il problema verrà risolto essenzialmente in base ai reperti citomorfologici, citochimici e immunofenotipici (v. sopra, tabb. VI e VII) offerti dai linfociti del sangue periferico, del midollo osseo e dell'eventuale biopsia linfonodale, che abitualmente non viene eseguita nella CLL e nella PLL se il quadro emato-midollare è significativo.

Bibliografia

- Baldini L., Maiolo A. T., *Leucemia linfatica cronica e sindromi linfoproliferative*, in Gentilini P. ed., *Medicina Interna*, 1997, Soc. Ed. Universo, Roma, 1251-1261.
Ben-Ezra J., Burke J. S., Swartz W. G. et al., *Blood*, 1989, 73, 579-587.
Binet J. L., Auguier A., Dighiero G. et al., *Cancer*, 1981, 48, 196-206.
Brittinger G., Bartels H., Common H., *Hematol. Oncol.*, 1984, 2, 269-306.
Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
Cheson B. D., Bennet J. M., Grever M. et al., *Blood*, 1996, 87, 4990-4997.
French Cooperative Group on chronic lymphocytic leukaemia, *Lancet*, 1986, 1, 1346-1349; *Br. J. Haematol.*, 1990, 76, 45-57.
Galton D. A. G., Goldman J. M., Wiltshaw E. et al., *Br. J. Haematol.*, 1974, 27, 7-23.
Geisler C. H., Hou-Jensen K., Myrre Jensen O. et al., *Eur. J. Haematol.*, 1996, 57, 292-300.
Molica S., Tucci L., Levato D., Docimo C., *Haematologica*, 1997, 82, 286-290.
Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P. et al., *Blood*, 1975, 46, 219-234.
Ritis K., Tsironidou V., Martinis G. et al., *Haematologica*, 1997, 82, 184-186.
Rozman C. ed., *Chronic lymphocytic leukaemia and related disorders*, Baillière's Clinical Haematology, 1993, 6, 757-915.

1.2.2. LINFOMA LINFOPLASMACITOIDE/IMMUNOCITOMA

Il l. linfoplasmacitoide (LPL) non è frequente (5-12% dei l. a seconda dei criteri diagnostici) ed ha una distribuzione per età analoga a quella della B-CLL, forse con più numerose osservazioni occasionali nelle classi infanto-giovanili. I due sessi sono rappresentati pressoché in eguale misura.

Quadro clinico

Il l. si manifesta in maniera insidiosa, con astenia, anoressia, calo ponderale, febbre, talora artralgie, sudorazione notturna, prurito, manifestazioni di tipo allergico. In base alla localizzazione inizialmente prevalente distinguiamo una *forma linfonodale* (poliadenomegalia diffusa, ma di modesta entità) e una *forma splenomegalica*, con cospicuo aumento volumetrico del viscere e spesso alinfadenica («l. primario della milza») (Audouin et al., 1988). Meno frequenti sono i casi ad esordio *extralinfonodale*, talora stabilmente alinfadenici: singolare è la *forma oculo-cutanea* (fig. 69), caratterizzata da localizzazioni nel tessuto retrobulbare e nelle congiuntive e palpebre, in forma di noduli singoli o plurimi. Possono essere interessati i muscoli, l'anello di Waldeyer, il fegato, il tratto digerente, i polmoni, il sistema nervoso centrale: solitamente in corso di malattia a sviluppo sistemico, talora come evento primario e isolato. L'immunocitoma può svilupparsi in pazienti con malattie autoimmuni, soprattutto in casi di malattia di Sjögren (Lennert e Feller, 1992).

Reperti emato-midollari. - Nel 70% dei casi il midollo osseo presenta ampia infiltrazione delle pleomorfe cellule linfomatose e di mastocellule (v. sopra *Reperti istocitologici*, col. *3240). In più del 13% dei casi si osserva *anemia*, talora grave, a genesi autoimmune (reazione di Coombs positiva). Costante è la *piastrinopenia*. È frequente (60%) una modesta *linfocitosi* e nel 30% dei casi sono

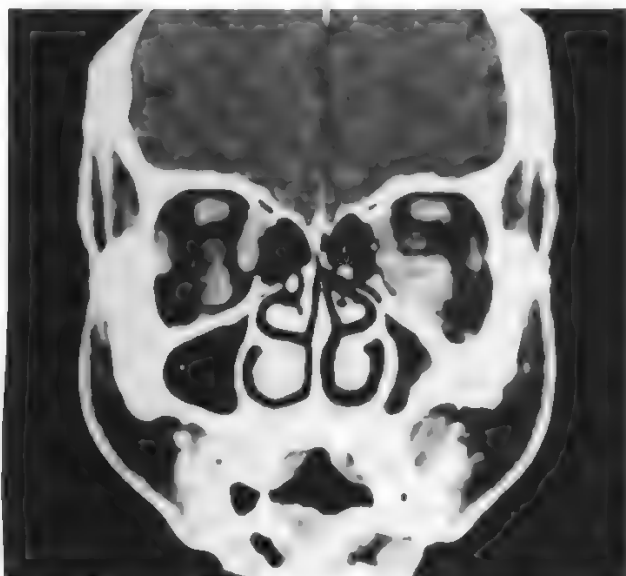


Fig. 69. LNH linfoplasmacitoide. TC, orbite (scansione coronale). Presenza di tessuto della densità delle parti molli nella parte inferiore dell'orbita sinistra, con cancellazione dei piani adiposi circostanti i muscoli retti inferiore e mediale. È infiltrato anche il muscolo obliquo inferiore. Nervo ottico dislocato.

presenti in circolo, in varia concentrazione, elementi linfoplasmacitoidi (*leucemizzazione del linfoma*). Il LPL è il LNH a bassa malignità con la più elevata frequenza di progressione leucemica.

La VES è solitamente assai elevata; nel 62% dei casi si riscontra *iperprotidemia* e nel 20% è presente nel siero una *componente monoclonale*, per lo più di classe IgM, più di rado IgG o IgA o IgE, e talora rappresentata da sole catene pesanti o leggere (circa i rapporti di questi casi con l'IPSID e la m. delle catene pesanti alfa, v. oltre). Nelle urine può comparire una frazione micromolecolare κ o λ . La forma a prevalenza linfoplasmacitica con alta concentrazione sierica di IgM monoclonali si identifica come malattia di Waldenström (v. MACROGLOBULINEMIA, IX, 15-21).

Decorso

È solitamente cronico ed indolente, ma meno prolungato della B-CLL; vi sono eccezioni ad evoluzione aggressiva e nel 4% dei casi si assiste alla progressione dell'immunocitoma in un l. immunoblastico. La *sopravvivenza mediana* si aggira sugli 80 mesi.

Diagnosi differenziale

Il l. linfoplasmacitoide/immunocitoma dev'essere differenziato dagli altri l. a bassa malignità: B-CLL, l. a cellule mantellari, l. della zona marginale, ed anche dalla malattia di Hodgkin, sottotipo LP diffuso, e soprattutto da quelli a prevalente presentazione splenomegalica.

Bibliografia

- Audouin J., Diebold J., Schwartz H. et al. *J. Pathol.*, 1988, **155**, 17-33.
 Ben-Ezra J., *Small lymphocytic lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 603-616.
 Heinz R., Stacher A., Theml H. et al., *Immunocytic Lymphoma*, 5th Meet. Intern Soc Haematol, European and African Division, Hamburg, 1979.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.

1.2.3. LINFOMA DELLE CELLULE MANTELLARI

Il l. derivato dalle cellule mantellari (MCL) costituisce l'8-10% di tutti i LNH e circa il 30% dei l. del follicolo. L'età media dei pazienti si aggira sui 60 anni (*range* 25-80) e nessun caso è stato finora segnalato sotto i 20; la frequenza del l. tra i *maschi* è all'incirca doppia che nelle femmine.

Quadro clinico

Il l. appare spesso alquanto indolente alla diagnosi, ma dopo qualche mese palesa carattere aggressivo, con *larga disseminazione linfadenomegalica* (prevalente in sedi sovradiaphragmatiche), IPI ad alto rischio (40%), elevata concentrazione sierica di LDH e $\beta 2$ microglobulina. I linfonodi mediastinici sono interessati in meno del 20% dei casi. Numerose sono le *localizzazioni extralinfonodali*: tra le più frequenti quelle al midollo osseo (40-70% dei casi), alla *milza* spesso notevolmente ingrandita (25%), al *fegato*, all'*epi-* ed *orofaringe* (fig. 70), alla *cute* (noduli), allo *scheletro*

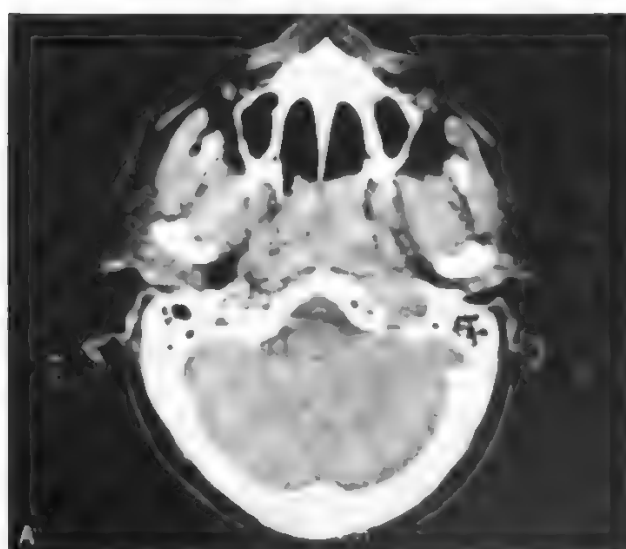


Fig. 70. LNH a cellule mantellari TC. A) Scansione assiale B) Scansione coronale. Epi- e orofaringe. Diffuso spiccato ispessimento delle pareti del rinofaringe e dell'orofaringe di destra, con compressione e parziale infiltrazione degli spazi adiposi parafaringei.

(aree osteolitiche) e al tratto gastrointestinale, dove assume assai spesso la forma di *poliposi multipla* (O'Brian *et al.*, 1989). Elevata è l'incidenza di *sintomi generali* (febbre, sudorazione, astenia, calo ponderale, talora prurito).

La natura della *poliposi multipla* è quasi sempre quella di un MCL, tranne eccezioni in cui si rinviene un l. centrofollicolare: casi siffatti insorgono in genere in età più giovanile che non le forme a cellule mantellari (Moynihan *et al.*, 1996). La localizzazione intestinale del MCL è alquanto insolita ed ha carattere per lo più *secondario*, cronologicamente successiva a processi insorti in altre sedi, ma si conoscono anche *forme isolate*. Il *quadro anatomicopatologico* (e radiologico) è quello di una miriade di piccoli polipi (talora confluenti e in genere associati ad una massa linfomatosa di dimensioni maggiori) nel tenue, talora nel colon o a diffusione pan-intestinale. I *sintomi* riferibili al tratto digerente sono costituiti da dolori addominali, melena, diarrea; possono insorgere sintomi di occlusione intestinale. Spesso sono coinvolti i linfonodi mesenterici.

Quadro ematologico. – Di solito non è profondamente alterato: in meno del 20% sono presenti grave anemia, piastrinopenia, leucopenia; in non più del 5-15% dei casi si osserva quadro tipicamente leucemico con linfocitosi cospicua ed elevata concentrazione ematica di piccole cellule linfoidi a nucleo inciso («leucemia a centroцити»).

Decorso

È sconcertante la refrattarietà del MCL alle terapie standard (anche se comprendenti antracicline) e del pari a regimi di salvataggio e alla stessa megaterapia ablativa seguita da trapianto midollare. Le remissioni non si prolungano oltre 6-18 mesi e qualsiasi terapia non incide significativamente sulla *sopravvivenza mediana*, che è di 3-4 anni. La «*variante citologica linfoblastoide*» (v. col. **3243) ha decorso maggiormente aggressivo (sopravvivenza mediana inferiore ai tre anni) (Lardelli *et al.*, 1990). Non sembra tuttavia che abbia luogo una evoluzione terminale in un l. centroblasto/immunoblasto-simile.

L'età inferiore ai 50 anni e l'ottenimento con terapia di induzione di una buona remissione anche se incompleta (le vere RC sono insolite) sono *fattori prognostici favorevoli*, mentre la franca e precoce leucemizzazione e l'appartenenza alla variante citologica linfoblastoide sono *prognosticamente sfavorevoli*.

Bibliografia

- Argatoff L. H., Connors J. M., Klasa R. J. *et al.*, *Blood*, 1997, **89**, 2067-2078.
 De Wolf-Peters C., Pittaluga S., *Ann. Oncol.*, 1994, **5** (Suppl. 1), 535-537.
 Lardelli P., Bookman M. A., Sundeen J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1990, **14**, 752-763.
 Lennert K., *Malignant Lymphomas other Hodgkin's disease*, 1978, Springer, Berlin.
 Majlis A., Pugh W. C., Rodriguez M. A. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1997, **15**, 1664-1671.
 Meusers P., Engelhard M., Bartels H. *et al.*, *Hematol. Oncol.*, 1989, **7**, 365-380.
 Moynihan M. J., Bast M. A., Chan W. C. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 442-452.
 O'Brian D. S., Kennedy M. J., Sundeen J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1989, **13**, 691-699.
 Perry D. A., Bast M. A., Armitage J. O., *Cancer*, 1990, **66**, 1995-2000.

1.2.4. LINFOMI DEL CENTRO FOLLICOLARE

Il centrofollicolare centroblastico/centrocitico (FCL cb/cc) nodulare o nodulare/diffuso è il più frequente dei LNH (22%) e rappresenta più del 50% dei l. del follicolo. Può manifestarsi in ambedue i sessi (con leggera prevalenza di quello femminile, contrariamente a quanto si osserva in tutti gli altri LNH) e può colpire tutte le età, compresa (raramente) quella infantile, ma l'incidenza massima si riscontra nel 5°-6° decennio di vita.

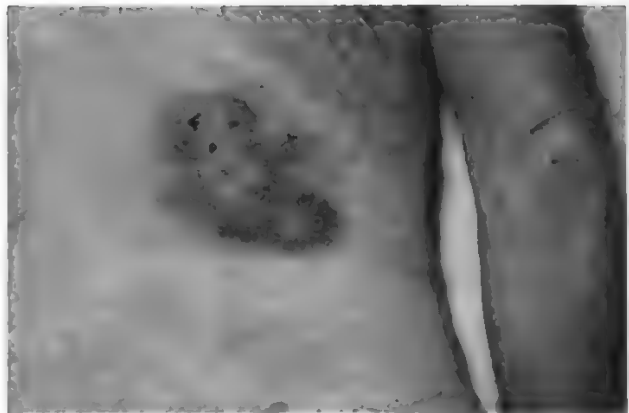


Fig. 71. LNH centrofollicolare (cb/cc nodulare) in trasformazione in l. a grandi cellule. Localizzazione cutanea (dorso) a noduli confluenti, duri.

Quadro clinico

È sensibilmente diverso nella variante nodulare a cellule miste cb/cc e nella nodulare/diffusa a prevalente componente cellulare centrocitica. I *sintomi generali* sono rari nella prima, frequenti nella seconda. Le forme ad esordio circoscritto (stadio I e II) sono relativamente frequenti (40%) nella variante nodulare, insolite nella diffusa.

Le sedi *linfonodali* più frequentemente interessate sono, in ordine decrescente, le laterocervicali, le inguinali, le ascellari e le addominali profonde. Possono essere colpite anche sedi insolite per i linfomi (stazioni linfonodali epitrocleari, preauricolari, nucali, etc.). Nell'80% dei casi il mediastino è indenne. I linfonodi interessati non raggiungono di solito volume cospicuo e almeno per lungo tempo non tendono a formare pacchetti né ad infiltrare i tessuti ed organi finiti. Le localizzazioni *extralinfonodali* (midollo osseo, milza, tonsille, intestino, fegato, cute) sono più frequenti nella variante nodulare che nella diffusa. In rari casi singole o plurime localizzazioni *cutanee* (papule, noduli) possono costituire la sintomatologia d'esordio della malattia e rappresentare l'unica manifestazione morbosa anche per 5-8 anni, prima di andare incontro a lenta ma progressiva disseminazione linfonodale e midollare. Sono più frequenti in fase di trasformazione (fig. 71).

Le *alterazioni ematiche* (anemia, piastrinopenia, neutropenia) non sono frequenti. Non è insolito rinvenire in circolo singoli centroцити (mai centroblasti) ma veri e propri quadri leucemici («leucemia a centroцити») si riscontrano solo nel 5-10% dei casi.

Decorso

Il *decorso* è fortemente condizionato dal tipo istologico. La variante nodulare presenta decorso a lungo indolente; è sensibile alla chemioterapia e alla radioterapia ma le remissioni ottenibili non sono in genere stabilmente prolungate; la variante diffusa presenta invece minore frequenza di remissioni ma queste hanno maggiore durata; la recidiva è però controllabile con difficoltà. Si può osservare una *progressione* della malattia verso un linfoma a grandi cellule B. La *sopravvivenza mediana* (con le attuali terapie) si aggira nelle forme nodulari sui 113 mesi, sui 43 mesi in quelle diffuse.

Bibliografia

- Bartels H., Burger A., Common H. *et al.*, in Stacher A., Hocker P. eds., *Lymphknoten Tumoren*, 1979, Urban & Schwarzenberg, Munich, pp. 211-217.

Diebold J., Kanavaros P., Audouin J. *et al.*, *Bull. Cancer* (Paris), 1987, **74**, 437-453.

Harris N. L., Ferry J. A., *Follicular lymphoma and related disorders*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 645-674.

Jones S. E., Fuks Z., Bull M. *et al.*, *Cancer*, 1973, **31**, 806-823.

Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's lymphomas*, 1992, Springer, Berlin, pp. 87-93.

1.2.5. LINFOMA DELLA ZONA MARGINALE/MALT-LNH

Premessa

È ancora *sub judice* la questione se le forme linfoproliferative attualmente designate come l. della zona marginale (MZBL, comprensivo del l. a cellule B linfomonocitoidi, MBCL) e rispettivamente come MALT-LNH, siano processi neoplastici sostanzialmente analoghi (v. sopra, coll. **3248-3254). L'orientamento più recente tende a riconoscere l'appartenenza ad un unico processo, per la comune derivazione dall'area marginale del follicolo linfatico e per analogie della composizione citologica. Benché in ambedue i casi si tratti usualmente di un l. a basso grado di malignità, a decorso spesso indolente con insolita e scarsa propensione alla diffusione sistemica, appare tuttavia evidente che il quadro clinico di questi processi differisce notevolmente per la sede primaria d'insorgenza (linfonodale per i MZBL; viscerale — per definizione — per i MALT-LNH) e per la sintomatologia. Una trattazione separata della loro fenomenologia clinica appare pertanto opportuna.

Linfoma della zona marginale (MZBL) a insorgenza primaria linfonodale

Il MZBL linfonodale primario è raro (0,2-0,3% di tutti i LNH). È stato rinvenuto in un ampio *range d'età* (13-87 anni) ma con picco nel 7° decennio di vita (età mediana 59 anni), come si osserva in altri l. a basso grado di malignità. Alcune casistiche segnalano pari frequenza tra i due sessi, altre una maggiore incidenza in donne (Lennert e Feller, 1992).

L'esordio è in genere subdolo, senza sintomi generali, con linfadenomegalie circoscritte a una o due stazioni linfonodali per lo più latero-cervicali, talora ascellari o inguinali (presentazione abituale in stadio I-IIA). Meno frequente è l'esordio con linfadenomegalie pluristazionali (Cogliatti *et al.*, 1990). Il decorso è solitamente indolente e prolungato, con scarsa tendenza alla disseminazione del l. alla milza, al fegato o in altri parenchimi extralinfonodali. Insolita è l'infiltrazione linfomonocitoide del midollo osseo, tranne che in fase tardiva; raro è il reperto di cellule linfomonocitoidi nel sangue periferico. Eccezionale è un quadro francamente leucemico a cellule miste linfomonocitoidi e linfoplasmacitoidi (Carbone *et al.*, 1989). Si osservano prolungate remissioni complete post-terapeutiche (durata media 28 mesi). La recidiva tuttavia costituisce la regola ed il decesso di solito avviene entro 5 anni. La progressione verso un l. aggressivo non è frequente (circa 10% dei casi).

MALT-Linfomi

Questa entità patologica è notevolmente più frequente del l. linfonodale a cellule linfomonocitoidi, ma è difficile valutare la reale incidenza. Esiste infatti un certo grado di sovrapposizione tra i quadri istopatologici descritti come l. a cellule B linfomonocitoidi o come MALT-LNH; spesso non è agevole una discriminazione tra linfonodi secondariamente interessati in casi di MALT-LNH e forme di MZBL/MBCL linfonodali primarie; d'altro canto forme ritenute linfonodali primarie possono palesarsi successiva-

TAB. XXVII. SEDI DI SVILUPPO PRIMARIO DI LNH-B, A BASSO GRADO, TIPO MALT

Relativamente frequenti	Insolite o eccezionali	
Intestino (tenue, crasso)	Retto	Testicoli
Tiroide	Mammella	Ovaio
Polmone	Prostata	Vescica
Ghiandole salivari	Rene	Trachea
Stomaco	Colecisti	Pleura
Orbita, annessi oculari	Tube di Falloppio	Pancreas
Congiuntiva	Utero (corpo, cervice)	Pene
Anello di Waldeyer	Timo	(Linfonodi ¹)

¹ Apparentemente i linfonodi non sono mai coinvolti in forma primaria.

mente quali eventi secondari a localizzazioni viscerali MALT primarie (Nizze *et al.*, 1991): una discriminazione tra le due entità appare talora arbitraria. Fondamentale caratteristica dei MALT-LNH è di localizzarsi primariamente nella mucosa dei visceri sede di tessuto MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) primitivo o secondario oppure in organi privi di mucosa ma dotati di cellule epiteliali colonnari e interessati da un processo di tipo MALT secondario. Gli organi che possono essere interessati sono numerosi (tab. XXVII). Il midollo osseo presenta solo eccezionalmente infiltrazione linfomatosa.

Linfomi gastrointestinali primitivi

Il 30-50% dei l. primitivi extralinfonodali (sia di tipo MALT che non-MALT) insorge nel tratto gastrointestinale. Si tratta quasi esclusivamente di LNH (quelli di natura hodgkiniana sono rarissimi). Il l. gastrointestinale primitivo non è particolarmente frequente (4-18% di tutti i LNH) in Occidente, con l'eccezione — per il l. gastrico — di un ristretto territorio dell'Italia Nord-orientale (Doglioni *et al.*, 1992); cospicua è invece la sua incidenza tra le popolazioni del Medio-Oriente. Più frequenti sono i l. gastrointestinali secondari, quali evento metastatico di un processo primitivamente linfonodale. Nell'ambito dei l. gastrointestinali primari, il primo posto spetta allo stomaco, segue l'intestino tenue (in Medio Oriente i valori sono invertiti); meno spesso sono interessati colon, retto, esofago. I l. primari del tubo digerente comprendono più varietà di neoplasie a derivazione cellulare B o T, per lo più di basso grado di malignità ma anche di alto grado (tab. XXVIII).

Illustreremo qui i l. di tipo MALT, rinviando per quelli non-MALT ai rispettivi capitoli.

1. **MALT-LNH primario gastrico a basso grado di malignità.** — Lo stomaco rappresenta in Occidente la più frequente sede di MALT-LNH. Si osserva soprattutto in soggetti di età superiore ai 50 anni, con un picco nel 7° decennio di vita. Predomina il sesso maschile (M/F = 1,5/1). L'esordio è generalmente subdolo, con generici disturbi digestivi; i reperti endoscopici sono spesso, all'inizio, poco significativi (aspetti di gastrite aspecifica o modeste lesioni infiltrative, appiattite, con una o più ulcerazioni) e solo con biopsie multiple si può accertare la natura neoplastica maligna del processo, associato spesso ad aspetti di iperplasia follicolare di tipo reattivo e plasmacellulare (v. sopra Reperti istocitologici col. **3296). L'esame istologico documenta spesso nel tessuto gastrico biopsiato, la presenza di *Helicobacter pylori*. Il MALT-linfoma può localizzarsi in ogni regione gastrica, ma preferenzialmente nell'antro, e

TAB. XXVIII. LNH PRIMARI DEL TRATTO GASTRO-INTESTINALE

[Elenco compilato da Lennert e Isaacson (1991), in Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin, p. 114]

Linfomi a cellule B

Linfomi del tessuto linfoide associato alle mucose (MALT)
 Linfomi a cellule B di basso grado di malignità, di tipo MALT
 Immunocitoma, sottotipo linfoplasmacitico
 Linfoma centrocitico-simile (derivato da cellule della zona marginale?)
 Linfoma a linfociti monocitoidi
 Linfomi a cellule B altamente maligne di tipo MALT, con componente a basso grado di malignità
 Malattia immunoproliferativa del tenue (IPSID), di grado basso o alto o combinato
 Linfoma centrocitico a cellule mantellari (poliposi linfomatosa)
 Linfoma di Burkitt e l. Burkitt-like
 Altri tipi di l. a basso o ad alto grado di malignità, corrispondenti ad equivalenti LNH linfonodali

Linfomi a cellule T

Linfoma a cellule T associato ad enteropatia (EATL)
 Altri tipi di l. non associati ad enteropatia

spesso in sedi multiple della mucosa (fig. 72). Il carattere multifocale del processo rende difficile l'esatta delimitazione della diffusione del linfoma e spiega la non trascurabile frequenza di recidive locali dopo resezioni parziali dello stomaco. Inusuali sono la sintomatologia francamente dolorosa e l'apprezzamento clinico ed endoscopico di cospicue masse gastriche.

Le procedure di *stadiazione* documentano in genere, all'esordio, un processo in stadio I, talora un concomitante interessamento dei linfonodi perigastrici (stadio III) (tab. XXIX). Non infrequente è l'infiltrazione *per continuitatem* del tessuto perigastrico e degli organi vicini (pancreas, colecisti, surreni) (Cogliatti *et al.*, 1991). Tra le *complicanze* è da segnalare la possibile perforazione, con addome acuto.



Fig. 72. MALT-LNH. Esame Rx dello stomaco con doppio mezzo di contrasto medio e ad alta risoluzione del lume gastrico in sede antroica. Si evidenzia un'area di ispessimento della mucosa irregolarità del margine e plus ulcerosa.

TAB. XXIX. STADIAZIONE DEI LINFOMI PRIMITIVI DEL TRATTO GASTROINTESTINALE

(Rohatiner A., Isaacson P. G., Gospodarowicz M., *Ann. Oncol.*, 1994, 5, 397-400)

Stadio I	Interessamento esclusivo del tratto gastrointestinale, senza coinvolgimento della sierosa localizzazione primaria singola localizzazioni multiple, non contigue
Stadio II	Estensione del linfoma dalla sede gastrointestinale primitiva ai linfonodi III regionali tributari (perigastrici, mesenterici) II2 addominali disseminati (para-aortici, paracavali, pelvici, inguinali)
Stadio III	Superamento della sierosa con infiltrazione di organi e/o strutture adiacenti III2 pancreas, parete addominale, etc. II(1 o 2)E se sono pure coinvolti linfonodi addominali
Stadio IV	Interessamento extralinfonodale disseminato o coinvolgimento linfonodale sopradiaframmatico

Il *decorso* dopo gastrectomia (seguito o meno da terapia radiante loco-regionale e/o chemioterapia) è di norma favorevole, con *sopravvivenze* del 91% a 5 anni e del 75% a 10 anni (Cogliatti *et al.*, 1991). La prolungata sopravvivenza (od anche la guarigione) può talora essere favorita dalla terapia antibiotica contro l'*H. pylori* (Wotherspoon *et al.*, 1993).

2. **MALT-LNH primario gastrico ad alto grado di malignità.** - Non di rado l'esame istologico documenta *quadri di transizione* tra MALT-linfomi a basso e ad alto grado di malignità. Vi sono però casi in cui si riscontra esclusivamente un processo ad alta malignità, senza alcuna componente o area di basso grado: in tali casi si è indotti a diagnosticare il processo quale *vero l. primario ad alta malignità*, la cui appartenenza ad una forma MALT può essere problematica (Chan *et al.*, 1990). Tali casi si osservano in soggetti di età più avanzata di quella propria dei MALT-I, di basso grado (oltre i 60 anni); presentano all'esordio sintomatologia più grave, che ricalca quella di un carcinoma (dolori, calo ponderale, emorragie digestive). Il decorso clinico è meno favorevole di quello dei MALT-I gastrici di basso grado e comporta sopravvivenza del 75% a 5 anni.

Malattie immunoproliferative del tenue, di tipo MALT

La maggior parte dei l. a cellule B dell'intestino sono di tipo MALT, sia nel tenue che nelle rare forme retto-coliche. Distinguiamo due quadri diversi: l. intestinale tipo MALT (tipo occidentale) e malattia immunoproliferativa del tenue (IPSID).

1. **MALT-linfoma intestinale («tipo occidentale»).** - Si osserva in soggetti anziani. Può essere localizzato nel fondo gastrico, nel tenue, nel ceco, nel colon e nel retto (fig. 73), e in quest'ultimo caso è spesso associato ad un processo infiammatorio (Greenstein *et al.*, 1992). Provoca una fenomenologia clinica di tipo ostruttivo a causa di infiltrazione nodulare interessando la mucosa a tutto spessore e per l'intera circonferenza. Se il linfoma è localizzato nel colon, è spesso ulcerato e provoca emorragie. Sono coinvolti generalmente i linfonodi mesenterici e una disseminazione al di fuori dell'addome è del tutto inconsueta. Vi sono casi con MALT-linfoma sia gastrico che intestinale. Spesso si nota progressione da una forma a bassa malignità in una ad alta malignità oppure il linfoma già all'esordio appare altamente maligno.

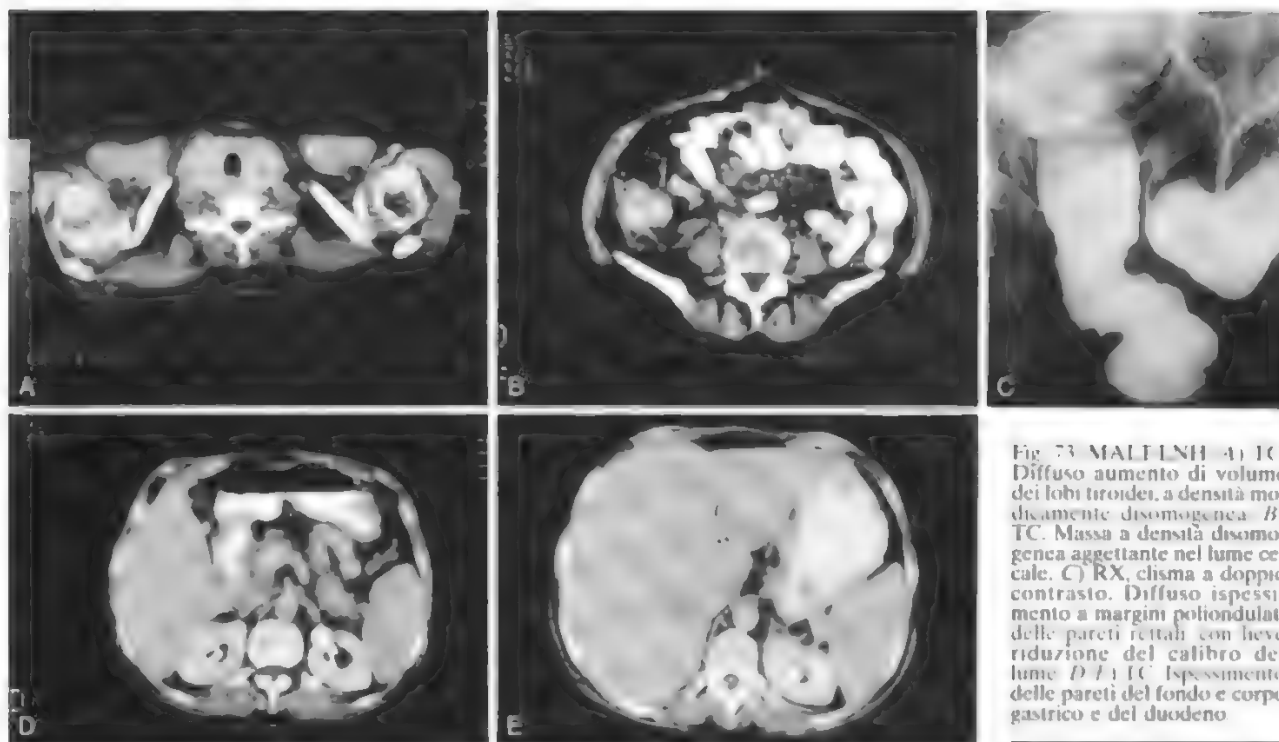


Fig. 73. MALT-LNH. A) TC. Diffuso aumento di volume dei lobi tiroidei, a densità moderatamente disomogenea. B) TC. Massa a densità disomogenea aggettante nel lume cecale. C) RX, clisma a doppio contrasto. Diffuso ispessimento a margini poliondulati delle pareti rettali con lieve riduzione del calibro del lume. D) E) TC. Ispessimento delle pareti del fondo e corpo gastrico e del duodeno.

Il MALT-linfoma primitivo intestinale ha *decorso e prognosi* meno favorevoli di quello gastrico: nelle forme a basso grado la *sopravvivenza* a 5 anni è del 44-75%, nelle forme ad alto grado è del 35-37% (Domizio *et al.*, 1993).

2. *Malattia immunoproliferativa del tenue (IPSID)*. – La *immunoproliferative small intestinal disease* è una variante di MALT-linfoma, quasi esclusiva del Medio Oriente ma

riscontrabile anche nell'area mediterranea («*linfoma mediterraneo*», «*malattia delle catene pesanti alfa*», α -HcD [v. CATENE PESANTI, MALATTIA DA, III, 1188; *1358]) e nel Sud Africa (v. sopra *Epidemiologia*). La malattia predilige soggetti al di sotto dei 50 anni (con maggiore frequenza nel 2°-3° decennio di vita), più spesso maschi appartenenti ad una fascia di popolazioni sottonutrite e viventi in precarie

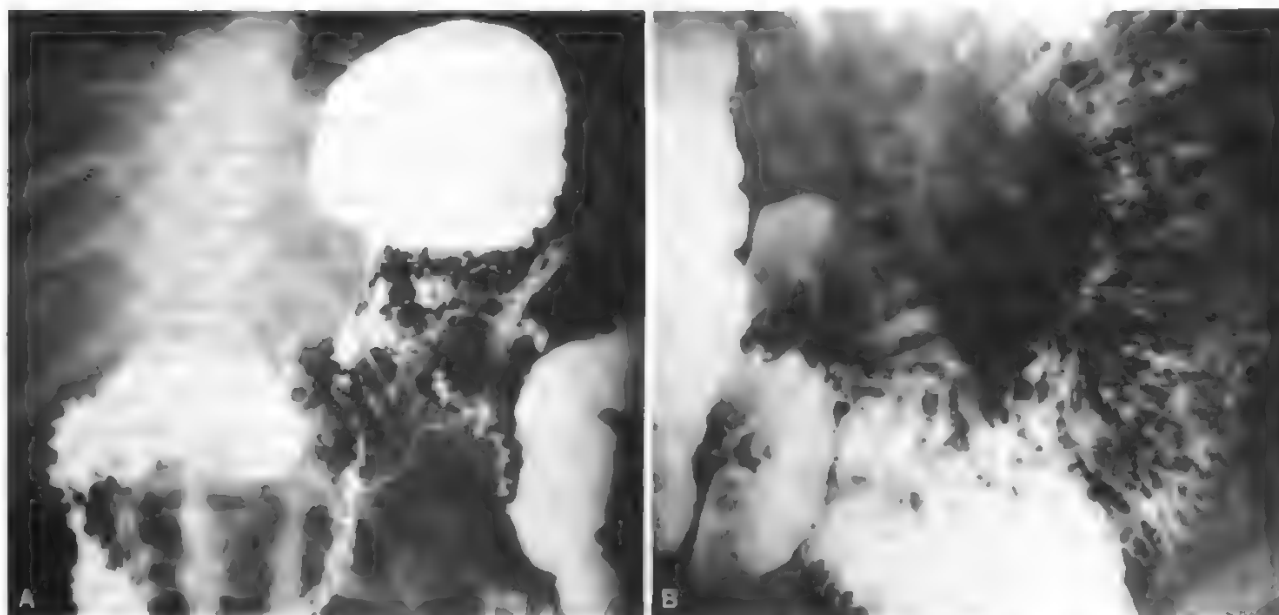


Fig. 74. IPSID, malattia delle catene pesanti alfa. RX, tubo digerente (clisma del tenue). A) Alterazione delle pliche mucose di tutto il tenue, con aspetto spiculato nel duodeno; B) quadro a «boa di struzzo» nell'ileo.

condizioni igieniche, in preda a parassitosi ed infezioni intestinali. La presenza nei consanguinei di anomalie linfocitarie (aumento dei linfociti B, diminuzione dei T) e di depressa immunità ritardata, nonché di elevata frequenza di antigeni HLA-AW1P e HLA-B12 fra i soggetti affetti da α -HcD, lascia supporre che fattori genetici possano avere un ruolo nella genesi della malattia.

Il processo morboso interessa tutto il tenue (in specie duodeno e digiuno) e talora anche lo stomaco. Alla *progressione istopatologica* dell'IPSID attraverso tre stadi corrisponde un diverso corredo sintomatologico. All'inizio i disturbi digestivi ricalcano quelli generici di una gastroduodenite, con modesti dolori addominali, episodi diarroici, meteorismo. *Successivamente* si instaura una tipica *sindrome di malassorbimento* (v. IX, coll. 112-119; *4774-4781). Linfonodi superficiali, milza e fegato di solito non sono ingranditi. In *fase avanzata* di malattia si apprezzano alla palpazione dell'addome multiple masse linfonodali, che la TC dimostra in sede mesenterica e retroperitoneale. Possono insorgere crisi tetaniche da *ipocalcemia*; si manifestano edemi e ascite. Frequente è l'*anemia megaloblastica* da carenza cobalamica e folica. L'*esame radiologico del tubo digerente* (ricorrendo talora al clisma del tenue) evidenzia alterazioni del disegno plicale nel tenue e talora anche nello stomaco (polipi linfomatosi) (fig. 74), dislocazioni e compressioni estrinseche delle anse digiuno-ileali, talora stenosi ileali. L'*endoscopia duodenale* mostra ispessimento delle pliche mucose, immagini nodulari o ad acciottolato, multipli polipi sessili.

In più di 1/3 dei casi l'*esame elettroforetico del siero* appare normale, nei restanti casi si notano ipoalbuminemia e ipogammaglobulinemia con modesto aumento delle alfa2-globuline, larga banda disomogenea che si estende dalla regione delle alfa2 a quella delle beta2. Non si osserva alcun picco monoclonale. La presenza di catene pesanti alfa nel siero (e nel succo duodenale) è documentata nei 2/3 dei casi con l'*immunoelettroforesi* (fig. 75).

La malattia può prolungarsi anche per alcuni anni, con progressivo aggravamento, ma sempre confinata in ambito addominale. La *sopravvivenza* a 5 anni è di circa il 20%. Le remissioni a seguito di precoce terapia antibiotica a largo spettro possono avere lunga durata ma le recidive sembrano essere frequenti (Ben-Ayed *et al.*, 1989).

MALT-linfomi delle ghiandole salivari

I l. delle ghiandole salivari rappresentano il 5% di tutti i l. extralinfonodali. Le ghiandole salivari possono essere sede di metastasi da parte di l. linfonodali periferici a cellule B, talora di un primario l. centrofollicolare (cb/cc) insorto in seno ad un linfonodo intraparatideo, eccezionalmente di un l. primario a cellule T affine ai T-linfomi associati ad enteropatia (v. coll. **3296-3297). Molto più spesso tuttavia si tratta di un l. a cellule B a basso grado di malignità di tipo MALT, evoluto in seno ad una preesistente condizione di sialoadenite mesoepiteliale (MESA), cioè su un terreno di MALT acquisito. Il rischio di l. in pazienti portatori di MESA è circa 40 volte maggiore che nella popolazione generale. L'intervallo tra le manifestazioni di una condizione MESA e la diagnosi di l. è ampiamente variabile (da 6 mesi a 29 anni), ma forse è in realtà più breve, in quanto il MALT-linfoma progredisce lentamente e per anni può rimanere occulto (Falzon *et al.*, 1991).

Il MALT-linfoma delle ghiandole salivari insorge per lo più in pazienti di età compresa fra i 60 anni, *range* 30-87 anni, e prevale nei maschi (70%). Interessa soprattutto le ghiandole parotidi (mono o bilateralmente) (fig. 76), raramente è localizzato in una delle ghiandole salivari o contemporaneamente sia nelle ghiandole salivari maggiori che nelle minori. Pos-

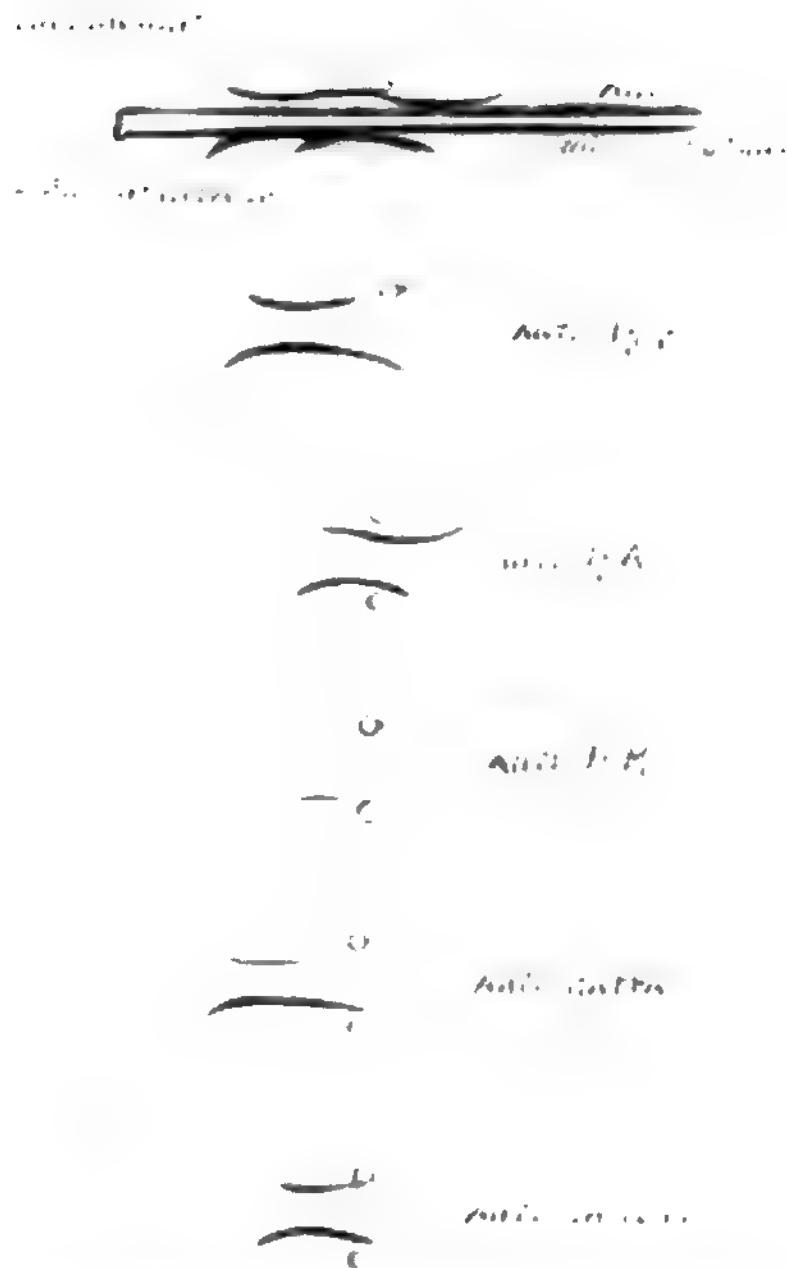


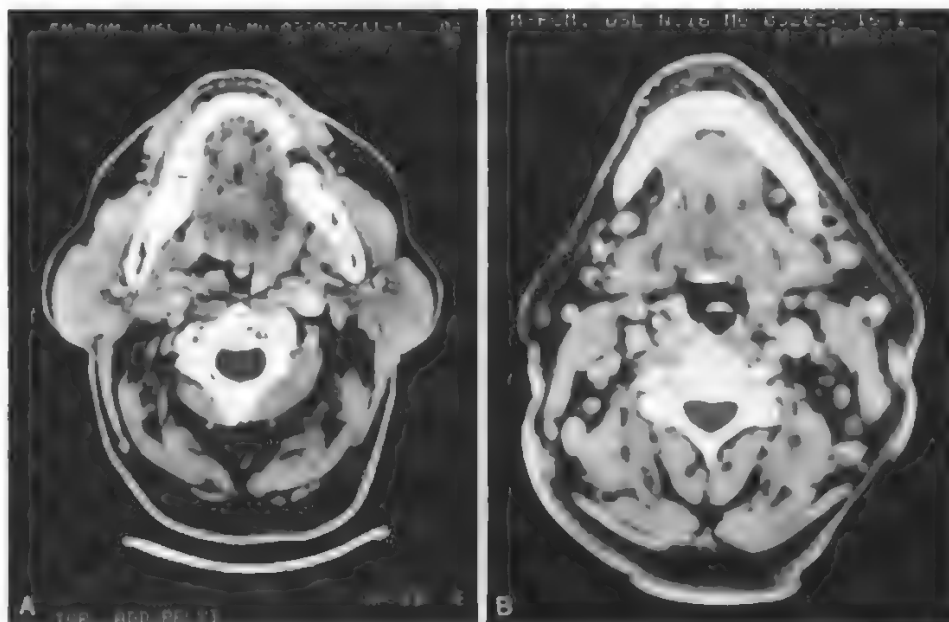
Fig. 75. IPSID, malattia delle catene pesanti alfa. Immunoelettroforesi del siero. Le linee di precipitazione superiori sono del paziente, quelle inferiori appartengono ad un soggetto sano (per comparazione). Alla linea di precipitazione con l'anti-IgA non corrisponde nel siero del paziente alcuna linea di precipitazione con gli antisieri delle catene leggere κ e λ .

sono coesistere artrite reumatoide, LES, tiroidite di Hashimoto, crioglobulinemia mista (Zufferey *et al.*, 1995). Spesso in questi pazienti esiste da tempo una sindrome di Sjögren. Il decorso è di solito indolente e si prolunga per anni. Si assiste spesso al coinvolgimento di linfonodi regionali, occasionalmente ad una disseminazione linfonodale più sistemica od anche extralinfonodale (polmone, congiuntiva, stomaco) (Falzon *et al.*, 1991). Il midollo osseo permane indenne. Il MALT-linfoma può progredire in una forma più aggressiva (Shin *et al.*, 1991). La prognosi è sempre riservata.

MALT-linfomi del polmone

I *linfomi primari del polmone* sono rari (0,3-0,4% di tutti i LNH, 10% dei LNH extralinfonodali) (Yousem e Colby, 1992) e in preponderanza di tipo MALT: sono stati a lungo considerati quali «pseudolinfomi» (Saltzstein, 1963; Koss, 1983). Estremamente inconsueti sono i l. primari di altra natura, sia di basso grado (di tipo linfocitico, centrofollicolare, mantellare) che di alto grado, di natura T o NK (l. angiocentrico del tipo granulomatosi linfomatoide) o interpretabili come malattia di Hodgkin. Per la trattazione di questo secondo gruppo di l. si rinvia ai rispettivi capitoli di questa voce.

Fig. 76. MALT-LNH. Parotidi, faringe, linfonodi del collo. TC. A) Aumento di volume di entrambe le parotidi, la cui densità appare disomogenea. Aumento di spessore della regione tonsillare sinistra. B) Bilateralmente sono presenti numerosi linfonodi ingranditi delle stazioni laterocervicali, superficiali e profonde.



I *MALT-linfomi del polmone* sono di basso grado di malignità. Interessano parimenti i due sessi, per lo più tra il 6°-7° decennio di età. L'esordio è spesso asintomatico o con sintomatologia modesta (tosse, dolori toracici, dispnea), raramente con sintomi B conclamati. La presenza di un l. può essere scoperta in occasionali esami radiologici del torace, nel 70% dei casi in forma di nodulo solitario del polmone. Insolito è il reperto di noduli multipli o di versamento pleurico. Lo stadio di esordio è pertanto di solito I_E oppure II_E, se concomitano linfadenomegalie all'ilo polmonare. Eccezionalmente il l. polmonare è associato ad un MALT-linfoma di ghiandole salivari, lacrimali o della congiuntiva (Isaacson e Norton, 1994).

La *diagnosi differenziale* dev'essere posta nei confronti della cosiddetta polmonite interstiziale linfoide e con la granulomatosi linfomatoide di Liebow e Carrington (v. a suo luogo), con infiltrazioni linfoidi polmonari rinvenibili in soggetti con AIDS associato ad infezione da EBV, con la bronchiolite follicolare. La diagnosi si avvale dell'agobiopsia o della biopsia polmonare in toracotomia esplorativa. L'exeresi chirurgica seguita da radio- e/o chemioterapia comporta di solito lunghe remissioni. La *recidiva* può avvenire in sede polmonare o essere di tipo multinodale od anche extralinfonodale. La *progressione* verso una forma altamente maligna sembra essere rara. La *sopravvivenza* è nell'80% dei casi superiore ai 10 anni e non si discosta sensibilmente da quella di soggetti di pari età della popolazione globale (Koss *et al.*, 1983).

MALT-linfomi della tiroide

I l. primitivi della tiroide sono rari (2-3% dei l. extralinfonodali). Si riscontra sempre una neoplasia a cellule B e di tipo MALT, solitamente di basso grado di malignità (Isaacson e Norton, 1994). Il MALT-linfoma tiroideo costituisce il paradigma dei linfomi insorgenti su un terreno di lesioni autoimmuni con quadro di MALT acquisito. Insorge per lo più in *donne* di oltre 50 anni, di solito con gozzo o tumefazioni tiroidee da tiroidite di Hashimoto decorrenti da tempo, talora in assenza di modificazioni del volume ghiandolare ma con riscontro di autoanticorpi antitiroidei (il loro tasso peraltro diminuisce quando il l. diventa manifesto). La pre-

senza del l. comporta aumento di volume, totale o lobare, della tiroide, reperto *scintigrafico* di noduli freddi, di lesioni nodulari in *ecografia*, di immagine a densità disomogenea o di aree ipodense con la TC (v. sopra fig. 73, A).

L'*agobiopsia* consente un primo orientamento diagnostico. La *diagnosi differenziale istocitologica* va posta in primo luogo con il carcinoma indifferenziato a piccole cellule. Il l. si presenta di solito in stadio I_E ma è caratteristica la tendenza alla metastatizzazione e alla recidiva. Recenti studi con terapia combinata RT+CT (CHOP) vantano una sopravvivenza del 100% a 8 anni. La sola RT può essere riservata ai pazienti in stadio I_E con piccola massa neoplastica.

MALT-linfomi dell'orbita (bulbo oculare e annessi oculari)

I l. dell'occhio (*bulbo oculare*) sono estremamente rari; meno infrequenti sono i l. interessanti gli *annessi oculari* (congiuntive, palpebre, ghiandole lacrimali, tessuti della cavità orbitale); assommano a circa l'8% dei l. extralinfonodali. In passato molte lesioni in queste sedi sono state etichettate come «pseudolinfomi» o «pseudotumori linfocitici benigni» dell'orbita, ma indagini recenti hanno provato la monoclonalità della maggior parte di questi processi, che possono essere classificati come linfomi B a basso grado di malignità, e soprattutto come MALT-linfomi (Knowles e Jakobiec, 1992; Isaacson e Norton, 1994).

Il *linfoma dell'occhio (intra-oculare)* è solitamente secondario ad un l. primario del S.N.C. (Freeman *et al.*, 1987), eccezionalmente evento primario. È sempre un processo ad alto grado di malignità, con prognosi infausta.

La localizzazione nelle *orbite* ha frequenza doppia che nella congiuntiva, e in circa il 50% dei casi a sede orbitale sono coinvolte pure le ghiandole lacrimali. Talora la lesione è bilaterale.

La localizzazione agli *annessi orbitali* può essere secondaria ad un primitivo l. linfonodale, ma più spesso è primitiva. In circa il 20% dei casi si nota coinvolgimento selettivo di altre sedi MALT o — tardivamente — disseminazione sistemica. I MALT-linfomi a basso grado degli annessi oculari possono insorgere ad ogni età (*range* 17-93 anni) ma per lo più dopo i 50 anni, con maggiore frequenza in *donne*.

I *sintomi clinici* più frequenti sono: tumefazione edematoso ed arrossamento delle palpebre, protrusione del globo oculare (clinicamente manifesta nel 30% dei casi, proptosi misurabile in quasi il 100%); dolore orbitario, fotofobia, disturbi della motilità oculare, tumefazione delle gh. lacrimali. La TC consente una precisa valu-

tazione della sede ed entità della massa neoplastica orbitale. La *progressione* verso una forma più aggressiva di linfoma (non frequente) può comportare sviluppo di irite, edema della papilla, diplopia, amaurosi. L'*accertamento diagnostico* è istologico, su materiale biptico. La *diagnosi differenziale* va posta nei confronti del sarcoma granulocitico, del granuloma eosinofilo, di vasculiti sistemiche (tipo Wegener, etc.). La *prognosi* è in complesso buona se la massa linfomatosa è aggredibile chirurgicamente e/o si effettua chemio- e radioterapia.

Altre localizzazioni di MALT-linfomi

La *cute* è solitamente sede di l. primari di linea T e di l. metastatici sia di linea T che B. Questi ultimi sono di solito di natura centrofollicolare (cb/cc) o a grandi cellule anaplastiche. I linfomi B primari della cute sono solitamente l. della zona marginale o l. linfoplasmacitoidi o MALT-linfomi. Questi sono talora sincroni ad analoghi MALT-linfomi del polmone o di altre aree extralinfonodali ed extracutanee. Altri infine sono secondari a primitive localizzazioni negli annessi oculari o nella parotide.

Tutti i tipi di MZBL/MALT-linfomi cutanei colpiscono preferenzialmente *donne* in età media od avanzata: mediana 53 anni (range 29-86) nella forma primaria, mediana 57 anni (range 36-67) nelle forme sincrone, mediana 63 anni (range 29-72) nelle secondarie (Bailey *et al.*, 1996). Le lesioni si presentano come noduli singoli o multipli, placche o «tumori» in ogni area del mantello cutaneo (solitamente collo, capo, dorso). Il decorso è indolente.

Trattati con exeresi e RT locale, i pazienti presentano spesso lunghissima sopravvivenza (specie nella forma cutanea primaria), con eventuale recidiva a distanza di anni, in sede cutanea e sottocutanea oppure extralinfonodale extracutanea.

I *linfomi del tratto aereo-digestivo superiore* occupano il secondo posto nella frequenza dei l. extralinfonodali del tubo digerente e riguardano per lo più l'*anello di Waldeyer*. Frequenti sono pure in questa sede le localizzazioni secondarie metastatiche di l. originati in linfonodi periferici, sia all'esordio di malattia che in recidive. I l. del tratto aereo-digestivo superiore, sia primitivi che secondari, possono appartenere alla linea B o alla T, con forme di basso o alto grado di malignità; eccezionalmente sono di natura hodgkiniana (ma del sottotipo LP nodulare, affine ai LNH-B) e raramente possono essere classificati come MALT-derivati (tab. XXX, dove sono indicate anche le loro localizzazioni preferenziali).

I *linfomi del cavo orale* (fig. 76) si manifestano con tumefazione del distretto colpito (tonsilla palatina, mucosa rino-faringea, tonsilla linguale, gengiva, etc.), dolori, fetore orale, specie se la lesione

è ulcerata. La localizzazione *tonsillare* di solito è monolaterale. I linfonodi satelliti sono spesso e precocemente ingranditi.

I *linfomi timici di tipo MALT* costituiscono osservazioni eccezionali (Isaacson e Norton, 1994) e si presentano con un aumento volumetrico del timo, sede di una massa linfomatosa cistica incapsulata; si associa talora linfadenomegalia distrettuale.

I *linfomi del tratto urogenitale*, sia primari che secondari, sono inconsueti: interessano soprattutto i testicoli, indi corpo e cervice uterina, ovaio; eccezionali sono le localizzazioni alle tube di Falloppio, in vescica, uretere, vagina, prostata, epididimo, pene. Tali linfomi sono di vario tipo istologico, di linea B o T a basso o ad alto grado di malignità. Singoli casi di MALT-LNH di basso grado sono stati rinvenuti nella prostata e nella vescica. Provocano sintomi generici di neoplasia in queste sedi ed hanno decorso protratto relativamente indolente o aggressivo a seconda del tipo istologico.

Rari sono i l. della *mammella*, sia primitivi che secondari (eccetto che nel l. di Burkitt, v. a suo luogo), e sono quasi esclusivi del sesso femminile in età post-puberale e soprattutto in età avanzata. Sono per lo più l. di linea B, ad alto grado di malignità; quelli B di basso grado sono insoliti: sono stati segnalati singoli casi di MALT-linfomi di basso grado. I l. mammari sono solitamente monolaterali e si presentano con noduli indistinguibili clinicamente da un carcinoma; nel BL la localizzazione è bilaterale (v. sotto fig. 80).

Eccezionali sono le segnalazioni di MALT-linfomi in *altre sedi*: rene, trachea, laringe, colecisti, pleura, pancreas (Pelstring *et al.*, 1991).

Linfoma splenico primario a cellule B della zona marginale

Il coinvolgimento *secondario* dello splene con aumento delle dimensioni del viscere, è un reperto frequente nei LNH. Insoliti sono invece i LNH, di diverso tipo istologico e di linea B o T, a basso o ad alto grado, che si presentano all'esordio clinico con *localizzazione primaria* allo splene.

Cosa si debba indicare per «l. splenico primario» è alquanto controverso. Das Gupta *et al.* (1969), con criterio restrittivo, lo definiscono come un l. ad esclusiva localizzazione allo splene ed ai linfonodi ilari splenici. Altri AA., considerando che la diagnosi in tali casi viene avanzata spesso tardivamente, adottano un criterio più largo, definendo quale l. splenico primario i casi con precipuo interessamento splenico, associato o meno a localizzazioni linfomatose al midollo osseo, linfonodi, fegato, considerate quali metastasi precoci.

La maggior parte dei l. splenici primari è inquadrabile come *tricoleucemia* o come l. *linfocitico* o *linfomonocitoide*, ma talora appare citologicamente di natura *centrofollicolare* (cb/cc) o *mantellare* od anche viene diagnosticata come l. a grandi cellule B o come l. a cellule T periferiche (Pittaluga *et al.*, 1996).

Di recente è stato individuato un l. *splenico primario a cellule della zona marginale* (Schmid *et al.*, 1992), la cui individualità nosologica ha trovato ampia conferma (Mollejo *et al.*, 1995; Hammer *et al.*, 1996; Alkan *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996).

Tale l. è raro. È stato riscontrato in entrambi i sessi, con prevalenza del femminile (M/F = 1/1,8), in età media di 68 anni (range 35-79). Le manifestazioni cliniche più salienti all'esordio sono costituite di solito da anemia, piastrinopenia, febbre, calo ponderale e soprattutto da rilevante *splenomegalia* (nei casi splenectomizzati si sono osservate milze del peso di 800-3800 g, media 1500 g). Nella casistica di Rosso *et al.* (1995) la splenomegalia tuttavia mancava od era assai modesta. Le localizzazioni *linfonodali*, di modesta entità e solitamente assenti nelle stazioni periferiche superficiali, sono talora documentabili con TC all'ilo splenico e nelle stazioni addominali retroperitoneali. Frequente è l'*epatomegalia*. L'infiltrazione linfoide del *midollo osseo* (di tipo locale, raramente diffuso) non è mai massiccia. La concentrazione degli eritrociti, leucociti, piastrine nel *sangue periferico* varia da caso a caso: spesso si riscontra *pancitopenia*, raramente leucocitosi con linfocitosi assoluta (fino a $18 \times 10^9/L$) e presenza di linfociti «villosi» (Spriano *et al.*, 1986), TRAP negativi (v. sopra, col. **3254). Lo *stadio clinico* all'esordio è pertanto solitamente III-IVA

TAB. XXX. LINFOMI DEL TRATTO AERO-DIGESTIVO SUPERIORE E LORO LOCALIZZAZIONI PREFERENZIALI

(da Isaacson e Norton, 1994)

LNH a cellule B	
Linfomi di basso grado di tipo linfonodale	AW ¹
Linfoma centrofollicolare (cb/cc)	
Linfoma linfoplasmacitoide	
Linfomi di alto grado	AW
Linfoma centroblastico	
Linfoma immunoblastico	
Linfomi plasmacitici	naso
Linfomi tipo MALT	raro sia in AW che nel naso
LNH a cellule T	
Linfoma linfociticoide (l. di Lennert)	AW
Altri l. T a basso grado	AW
Linfoma angiocentrico/angiodistruttivo	naso
Malattie di Hodgkin	
MIE e MIE-LP	Eccezionale (AW)
¹ AW = alto grado; AW = basso grado	

Il decorso è indolente e si prolunga per anni senza mostrare spesso particolare tendenza alla disseminazione diffusa.

Bibliografia

- Alkan S., Ross Ch., Hanson C. A., Schnitzer B., *Human Pathol.*, 1996, **27**, 503-506.
- Bailey E. M., Ferry J. A., Harris N. L. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 1011-1023.
- Ben-Ayed F., Halphen M., Najjar T. et al., *Cancer*, 1989, **63**, 1251-1256.
- Burke J. S., *Waldeyer's ring, sinonasal region, salivary gland, thyroid gland, central nervous system and other extranodal lymphomas and lymphoid hyperplasias*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1994, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1047-1079.
- Carbone A., Gloghini A., Pinto A. et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989, **92**, 228-236.
- Chan J. K. C., Ng C. S., Isaacson P. G., *Am. J. Pathol.*, 1990, **136**, 1153-1164.
- Cogliatti S. B., Lennert K., Hansmann M. L., Zwingers T. L., *J. Clin. Pathol.*, 1990, **43**, 619-625.
- Cogliatti S. B., Schmid U., Schumacher U. et al., *Gastroenterology*, 1991, **101**, 1159-1170.
- Das Gupta T., Goombes B., Brasfeld R. D., *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1969, **129**, 947-960.
- Dogliani C., Wotherspoon A. C., Moschini A. et al., *Lancet*, 1992, **339**, 834-835.
- Domizio P., Owen R. A., Shepherd N. A. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1993, **17**, 429-432.
- Falzon M. R., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1991, **15**, 59-65.
- Freeman L. N., Schachat A. P., Knox D. L. et al., *Ophthalmology*, 1987, **94**, 1631-1639.
- Greenstein A. J., Mulin G. E., Strauchen J. A. et al., *Cancer*, 1992, **69**, 1119-1123.
- Hammer R., Glick A. D., Greer J. P. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 613-626.
- Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Knowles D. M., Jakobiec F. A., *Malignant lymphomas and lymphoid hyperplasia that occur in the ocular adnexa (orbit, conjunctiva and eyelids)*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1009-10046.
- Koss M. N., Hochholzer L., Nichols P. W., *Human Pathol.*, 1983, **14**, 1024-1038.
- Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
- Mauri C., *Gli pseudolinfomi*, Atti 29° Congr. Soc. It. Ematologia, 1983, 197-211.
- Mollejo M., Menarquez J., Lloret E. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **19**, 1146-1157.
- Nizze H., Cogliatti S. B., von Schilling C. et al., *Histopathology*, 1991, **18**, 403-414.
- Pelstring R. J., Essell J. H., Kurtin P. J., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1991, **96**, 738-745.
- Pittaluga S., Verhoef G., Criel A. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 211-223.
- Rosso R., Neiman R. S., Paulli M. et al., *Human Pathol.*, 1995, **26**, 39-46.
- Saltzstein S. L., *Cancer*, 1963, **16**, 928-955.
- Schmid C., Kirkham N., Din T., Isaacson P. G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1992, **16**, 455-466.
- Shin S., Sheibani K., Fishleder A. et al., *Human Pathol.*, 1991, **22**, 422-430.
- Spriano P., Barosi C., Invernizzi R., *Haematologica*, 1986, **71**, 25-33.
- Wotherspoon A., Dogliani C., Diss T. et al., *Lancet*, 1993, **342**, 575-577.
- Wu C. D., Jackson C. L., Medeiros L. J., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996, **105**, 277-285.
- Yousem S. A., Colby T. V., *Pulmonary lymphoma and lymphoid hyperplasias*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 979-1007.
- Zufferey P., Meyer O. C., Grossin M. et al., *Scand. J. Rheumatol.*, 1995, **24**, 342-345.

1.2.6. TRICOLEUCEMIA (HAIRY CELL LEUKEMIA)

La tricoleucemia (v. *) o leucemia a cellule capellute (*Hairy Cell Leukemia*, HCL) è una neoplasia insolita (costituisce l'1% dei linfomi ed il 2% delle leucemie dell'adulto). Prevalente nel sesso maschile (M/F = 1,4/1) e nell'età medio-avanzata (mediana 51 anni, range 20-80). Colpisce soprattutto soggetti di razza bianca ed è sovrarappresentata tra gli ebrei (Bernstein, 1990). Ha comparsa sporadica; casi fami-

liari sono stati segnalati (anche in gemelli), ma non sembrano correlati con peculiari antigeni d'istocompatibilità.

Esordio

L'esordio è insidioso, con astenia, calo ponderale, talora febbricola in rapporto a citopenia ed a ricorrenti processi infettivi. Presso che costante già all'esordio è la *splenomegalia*, che nel periodo di stato può assumere notevole volume. L'*epatomegalia* è presente nel 40% dei casi. Insolite e sempre modeste sono le *linfadenomegalie* superficiali, più frequenti e talora rilevanti quelle in sede retroperitoneale; solo nell'8-10% dei casi esiste localizzazione mediastinica. Con varia incidenza si osservano *rash* cutanei, artralgie, dolori ossei associati ad osteoporosi o ad aree osteolitiche (vertebre, collo del femore).

Abituali sono le alterazioni della *crasi ematica*. Nel 75% dei pazienti figura una *pancitopenia*: anemia a varia patogenesi (v. TRICOLEUCEMIA*, Agg. IV, 1993, col. *7254), leucopenia con neutropenia spiccata ($N < 0,5 \times 10^9/L$), *monocitopenia* rilevante (reperto caratteristico), piastrinopenia di vario grado, con anomalie morfologiche e funzionali delle piastrine. È insolita una leucocitosi (in genere non superiore a $30 \times 10^9/L$) con linfocitosi assoluta, in parte sostenuta da tricolinfociti, talora in concentrazione modesta altre volte superiore al 50% dei linfociti totali. Per i reperti citochimici (*reazione TRAP*) e midollari, v. coll. **3256-3257. L'iperplasia fibrillare argentofila costantemente presente nel midollo osseo è causa di «punctio sicca» (v. fig. 3 della voce TRICOLEUCEMIA*, Agg. I, col. *7256). Per l'aspetto morfologico dei linfociti nel sangue periferico, v. fig. 1 della voce TRICOLEUCEMIA* (Agg. I, col. *7254).

Di frequente riscontro è una modesta *ipergammaglobulinemia* policlonale, probabilmente in rapporto con le ripetute complicanze infettive. La presenza, insolita, di una componente monoclonale nel siero (IgG o IgM, eccezionalmente IgA) non sembra imputabile alla proliferazione tricolinfocitica ma ad altri cloni linfoidi.

Decorso

Il decorso nella quasi totalità dei casi è eminentemente cronico e indolente, con lenta progressione della splenomegalia e della pancitopenia: l'esito letale avviene dopo 5-10 anni e talora è ancora più tardivo. Evoluzione di tipo subacuto (un anno) si nota in circa il 10% dei casi. Sono state descritte remissioni spontanee a seguito di epatite B (Silinardi et al., 1985).

Cause di decesso sono in primo luogo le infezioni (in 2/3 dei casi), soprattutto da batteri Gramnegativi, micobatteri atipici, miceti, mentre è insolita quella da *Pneumocystis carinii*, così frequente in altri l. Le infezioni conseguono alla deplezione dei linfociti NK e dei grandi linfociti granulati (LGL), che comporta depressione dell'immunità naturale e deficiente secrezione di IL-1. Particolarmente temibili sono le complicanze vasculitiche sistemiche (10% dei casi), in rapporto alla presenza in circolo di immunocomplessi (ICC). Rara è la rottura della milza. In circa il 4% dei casi l'evento terminale è rappresentato da un secondo tumore (Frassoldati et al., 1994): carcinomi, malattia di Kaposi, emolinfopatie neoplastiche.

Prognosi

La prognosi è correlata al volume della milza, alla concentrazione dell'emoglobina e dei granulociti neutrofili. Jansen e Hermans (1982) hanno proposto due diverse modalità di stadiazione da effettuare prima e 2-3 mesi dopo la splenectomia. Gli attuali orientamenti terapeutici hanno ridotto il valore prognostico di tale schema.

Varietà clinico-ematologiche

Oltre ad una eccezionale forma midollare pura e ad una forma splenica pura (a decorso prolungatissimo a seguito di splenecto-

mia) conosciamo alcune vere e proprie varianti clinico-ematologiche cui si può attribuire dignità nosologica.

1. *HCL - Variante prolinfocitoide (variant-HCL di Cawley et al., 1980; HCL-v)*. - È stata descritta in soggetti di età media o senile, soprattutto in femmine; è caratterizzata da costante e massiccia splenomegalia, minime o assenti linfadenomegalie, elevata linfocitosi (anche $100 \times 10^9/l$) senza neutropenia né monocitopenia, con aspirato midollare facilmente ottenibile (contrariamente al dry tap della HCL classica). I tricolinfociti hanno morfologia simile a quella propria della leucemia cronica prolinfocitica, assenza di complessi ribosomo-lamellari nel citoplasma, reazione TRAP debolmente positiva ed a localizzazione polare e non diffusa. Non è sensibile all'interferone né alla 2-deossicoformicina.

Prevalenti in donne anziane e insensibili alle attuali terapie sono pure le varianti descritte da Sainati et al. (1990) e da Catovsky (1993).

2. *HCL - Variante blastica (Diez Martin et al., 1987)*. - Se ne conoscono pochi casi, in soggetti anziani. I reperti più salienti sono: costante splenomegalia, cospicua linfadenomegalia, pancitopenia, presenza di tricolinfociti con evidenti propaggini villose, nuclei a morfologia blastica, con rete cromatica fine, nucleoli prominenti, citoplasma basofilo con granuli azurofili; si può notare eritrofagocitosi da parte dei tricolinfociti.

3. *HCL - Variante giapponese (Katayama et al., 1987)*. - In Giappone sono stati osservati sporadici casi con il quadro clinico della HCL classica ma con elevata leuco(linfo)citosi, assenza di neutropenia, aspetto villosa dei tricolinfociti non apprezzabile su strisci di sangue periferico ma solo in microscopia in contrasto di fase, bassa frequenza di linfociti TRAP positivi, particolari caratteristiche immunofenotipiche: CD5+, CD10+, contrariamente ai casi occidentali. La risposta all'interferone è deludente.

4. *Linfoma splenico con linfociti villosi (SLVL), descritto da Melo et al., 1987*. - Interpretato inizialmente come variante della HCL, viene attualmente inquadrato come varietà splenica primitiva del linfoma della zona marginale (v. col. **3384).

Bibliografia

- Bernstein L., Newton P., Ross R. K., *Cancer Res.*, 1990, **50**, 3605-3609.
 Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London, pp. 156-181.
 Catovsky D., *Diagnosis and treatment of CLL variants*, in Cheson B. D. ed., *Chronic lymphatic leukemia*, 1993, M. Dekker, New York, pp. 369-397.
 Cawley J. C., Burns G. F., Hayhoe F. G. J., *Leukemia Res.*, 1980, **4**, 547-559.
 Damasio E. E., Pagnucco G., Federico M. et al., *Haematologica*, 1989, **74**, 205-218.
 Diez Martin J. L., Li C.-Y., Banks P. M., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1987, **1**, 301-305.
 Frassoldati A., Lamparelli T., Federico M. et al., *Leuk. Lymphoma*, 1994, **13**, 307-316.
 Golomb H. M., Vardiman J. W., *Hairy cell leukemia*, in Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J., Lichtman M. A. eds., *Hematology*, 4th ed., 1990, McGraw-Hill Inc, New York, pp. 1025-1030.
 Jansen J., Hermans J., *Blood*, 1982, **60**, 571-577.
 Katayama I., Hiroshima K., Maruyama K. et al., *Leukemia*, 1987, **1**, 301-305.
 Melo J. W., Robinson D. S. F., Gregory C., Catovsky D., *Leukemia*, 1987, **1**, 294-299.
 Sainati L., Matutes E., Wulligan S. et al., *Blood*, 1990, **76**, 157-162.
 Silingardi V., Federico M., Barbieri F. et al., *Haematologica*, 1985, **70**, 437-441.
 Yam L. T., Jankila A. J., Chan C. H., Li C.-Y., *Cancer*, 1983, **51**, 1497-1504.

1.2.7. PLASMACITOMA

Come già motivato in precedenza (v. col. **3258) verranno illustrati qui solo i quadri clinici del plasmacitoma primario e secondario, rinviando per le restanti forme anatomiche (mieloma multiplo e plasmacitoma osseo solitario) al corrispondente volume VIII, 2310-2325; *5863-5867; Volume III di questo volume.

Plasmacitoma primario extramidollare

Costituisce una rara evenienza (circa il 5% di tutti le neoplasie plasmacellulari). Può interessare varie sedi (laringe, ghiandola et al., 1993), per lo più con lesioni monostazionali che

riguardano in circa l'80% dei casi regioni del collo e le alte vie respiratorie (cavo orale nel 10%); il processo si localizza in linfonodi (per lo più latero-cervicali e ascellari), tonsille, orofaringe, rinofaringe, cavità nasali e paranasali, corde vocali, laringe; talora congiuntive, ghiandole salivari. Raramente viene reperito in testicoli, vagina, mammella, pancreas, pleura, polmone, tubo digerente (stomaco, tenue, colon), vescica, milza, reni, cute, tessuto sottocutaneo della coscia e del piede; eccezionalmente nel fegato e nell'esofago (Weichhold et al., 1995).

Si presenta come masserella di varia grandezza (0.5-5.0 cm) e tende a rimanere localizzato, con eventuale diffusione a linfonodi regionali satelliti. Le masserelle tendono ad ulcerare ed a sanguinare. All'esordio il midollo osseo non mostra infiltrazione plasmacitomatosi. In circa il 25% dei casi sono presenti nel siero e/o nelle urine componenti monoclonali. Rara è la disseminazione — tardiva — in stazioni linfatiche lontane dalla sede primaria, al midollo osseo o al S.N.C.

Il plasmacitoma extramidollare è solitamente passibile di completa exeresi chirurgica e di terapia radiante. L'evoluzione è per lo più favorevole. La sopravvivenza mediana è di 100 mesi ed il 70% dei pazienti è in vita dopo 10 anni dall'esordio clinico.

La diagnosi riposa sull'esame istologico, che deve tenere presenti numerose condizioni linfoproliferative benigne e neoplastiche associate ad iperplasia plasmacellulare (v. sopra, col. **3259). Attenzione particolare, non solo sotto il profilo della diagnosi differenziale istopatologica ma anche clinica, va posta nei confronti della malattia di Castleman multicentrica di tipo plasmacellulare.

L'«iperplasia linfonodale angiofollicolare» o malattia di Castleman (1956) è una linfadenopatia relativamente rara, osservabile in ambedue i sessi con pari frequenza, soprattutto in adolescenti o giovani adulti (2°-3° decennio di vita, con picco sui 20 anni) (v. LINFOMA BENIGNO DI CASTLEMAN). Se ne conoscono due varietà istologiche e quella che può entrare nella diagnosi differenziale con il plasmacitoma primario extramidollare è la rara variante plasmacellulare (9% dei casi [v. col. *3259]): talora monostazionale ma più spesso multistazionale (*Multicentric Castleman disease*, MCD) coinvolge eccezionalmente anche il polmone (ispessimento interstiziale peri-bronco-vascolare, noduli centrolobulari) (Barrie et al., 1996). Oltre a provocare generici disturbi od anche «effetti di massa» nelle sedi coinvolte, il processo comporta rilevanti sintomi sistemici e compromissione generale dell'organismo: febbre, sudorazione, rash cutanei eritemato-papulosi, ritardato sviluppo staturale (se si tratta di soggetti in età pediatrica), VES altissima, anemia normocromica, leucocitosi neutrofila, piastrinosi (raramente piastrinopenia), iposideremia e ipotransferrinemia, aumento delle α_2 -e delle gamma-globuline (poli-clonale), ipoalbuminemia, presenza di crioagglutinine ad alto titolo o di un anticoagulante «lupus-like» con riduzione dei fattori V, VIII, X. Alla MCD plasmacellulare è spesso associato un particolare quadro clinico (*sindrome POEMS*) consistente in polineuropatia, organomegalia epato-splenica, endocrinopatie (diabete mellito, ginecomastia, amenorrea), presenza nel siero di una componente monoclonale, lesioni cutanee (pigmentazione, ipertinosi, angiomi) (Kojima et al., 1983). La MCD plasmacellulare ha spesso decorso aggressivo con sopravvivenza mediana di circa 30 mesi, talora in rapporto al sopraggiungere di malattia di Kaposi, di LNH immunoblastico B plasmacitoide o di LNH T-periferici (Weisenburger et al., 1995).

Bibliografia

- Barrie J. R., English J. C., Müller N., *Am. J. Radiol.*, 1996, **166**, 1055-1056.
 Bataille R., *Clin. Hematol.*, 1982, **11**, 113-122.
 Bataille R., Sany J., *Cancer*, 1981, **48**, 845-851.
 Castleman B., Iverson L., Menendez V. P., *Cancer*, 1956, **9**, 822-830.
 Cawley J., Lindberg R. D., *Cancer*, 1979, **43**, 1007-1013.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Kojima M., Sakuma H., Mori N., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1983, **13**, 557-576.

Paccagnella A., Chiarion-Sileni V., Fiorentino M. V., *Il plasmacitoma extramidollare*, in Riccardi A., Ucci G., Ascari E. eds., *Biologia e clinica del mieloma multiplo*, 1993, Ed. Galli Thierry, Milano, pp. 63-72.

Weichhold W., Labouyrie E., Merlio J. P. et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 1197-1202.

Weisenburger K., Matsuda T., Nishimoto N. et al., *Blood*, 1989, **74**, 1360-1367.

1.2.8. LINFOMA DIFFUSO A GRANDI CELLULE B

Premessa

Benché i quadri istologici offerti dai l. diffusi a grandi cellule B (DLBCL: *Diffuse Large B Cell Lymphoma*) siano eterogenei, la loro fenomenologia clinica, sia all'esordio che in fase di progressione, presenta molti aspetti comuni, con minori tratti particolari in rapporto alla variante istopatologica o al fatto di costituire un evento primario o una forma secondaria.

Il DLBCL rappresenta il 30-40% dei LNH nell'adulto, ma è stato segnalato anche nell'età infantile. La forma prevalentemente «immunoblastica» è più frequente di quella prettamente «centroblastica», soprattutto in Giappone dove anche la frequenza globale del DLBCL è più elevata (55-75% dei LNH) che in Occidente.

L'esordio si colloca come età mediana nel 6° decennio ed il tipo «centroblastico» insorge in genere in una classe di età leggermente più giovane del tipo «immunoblastico». I due sessi sono colpiti quasi in egual misura, in alcune casistiche con una modesta prevalenza in maschi, specie per la forma immunoblastica.

Forma primitiva

La forma primitiva è spesso caratterizzata da un esordio aggressivo: nel tipo prettamente centroblastico si presenta in stadio III-IV, mentre in quello immunoblastico è spesso limitata ad un solo lato del diaframma. La sintomatologia comporta febbre, astenia, sudorazione, rapida disseminazione del processo in più stazioni linfonodali superficiali (più spesso sopradiaframmatiche e in particolare latero-cervicali) e profonde, in prevalenza sottodiaframmatiche, mentre il mediastino è solitamente risparmiato, specie nel tipo immunoblastico. I linfonodi tendono rapidamente a formare agglomerati che aderiscono ai tessuti e organi circostanti; non sono infrequenti i pacchetti linfonodali superficiali che infiltrano la cute e la ulcerano.

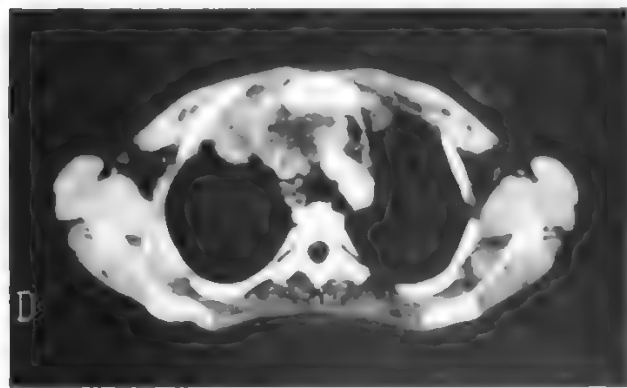


Fig. 77. LNH di alto grado. TC, torace. Masse linfoadenopatiche nel mediastino anteriore (con ampia area necrotica) e nell'ambito delle catene mammarie interne, più evidenti a destra.

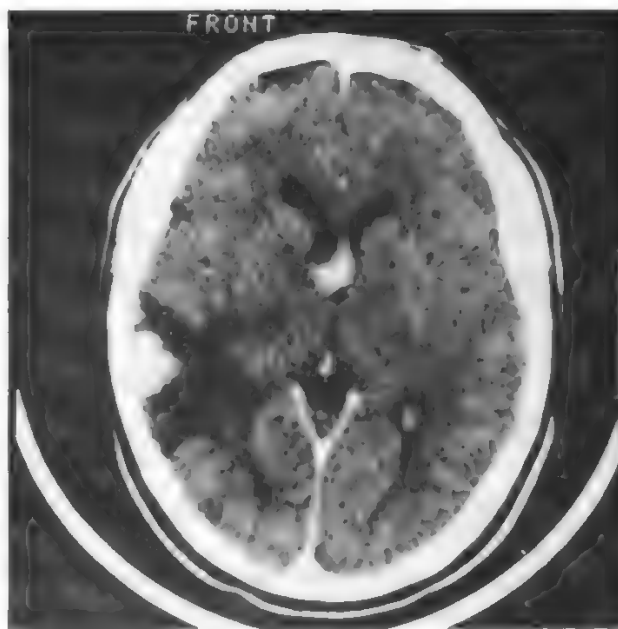


Fig. 78. LNH B immunoblastico. TC, encefalo. Multiple lesioni encefaliche iperdense, alcune circondate da edema. Tipica è la localizzazione in corrispondenza delle strutture della linea mediana.

In più del 40% dei casi si osservano localizzazioni extralinfonodali, anche con carattere primario, specie nei DLBCL a cellule multilobate o di tipo immunoblastico. Le sedi più spesso interessate sono milza, anello di Waldeyer, seni paranasali, tratto gastroenterico, tiroide, ghiandole salivari, polmone e mediastino (fig. 77). Meno frequentemente l'esordio avviene nella cute, nel S.N.C. (fig. 78), nei testicoli, nello scheletro; raro è il coinvolgimento del fegato e del midollo osseo (in forma focale o diffusa). Insolito è il DLBCL ad insorgenza primaria nei tessuti molli (Salomao et al., 1996).

Il decorso è rapidamente progressivo (se il paziente non è responsivo alla terapia), con grave compromissione delle condizioni generali. Con le terapie convenzionali la sopravvivenza mediana non supera i 12 mesi, ma con l'impiego di schemi di chemioterapia di terza generazione una parte dei pazienti presenta remissione completa prolungata, la cui frequenza dopo due anni si assesta su un plateau a livello del 20-50% a seconda delle casistiche, e tale rimane per anni anche in assenza di terapie di mantenimento.

Fattori prognostici favorevoli sono l'esordio in stadio I o IE e l'ottenimento di una RC: l'infiltrazione midollare rappresenta un fattore prognostico peggiorativo. La variante centroblastica «monomorfa» ha prognosi alquanto migliore della «polimorfa» e della «centrocitoidica».

Forme secondarie

Le forme secondarie si palesano spesso con comparsa o recrudescenza di sintomi generali e con improvviso e rapido incremento volumetrico di uno o più pacchetti linfonodali o di altra localizzazione del linfoma di base, a bassa malignità. Il decorso successivo ricalca nelle grandi linee quello delle forme primitive. La prognosi è tuttavia meno favorevole del l. primitivo, con l'eccezione dei l. a grandi cellule insorgenti in seno alla variante a prevalenza linfocitica della malattia di Hodgkin, in cui rivela una prognosi non diversa da quella delle forme primitive.

Varianti anatomo-cliniche dei linfomi a grandi cellule B

Linfoma a grandi cellule B, ricco in linfociti T

Il «*T-cell-rich B large-cell lymphoma*» (Macon *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1993; Krishnan *et al.*, 1994) colpisce ambo i sessi (con varia prevalenza di maschi o femmine a seconda delle casistiche, sempre piccole) ed è stato osservato nelle più varie età, con mediana di 67 anni (range 7-94).

La sintomatologia d'esordio è costituita solitamente da *linfadenomegalie* a rapido sviluppo, in sedi superficiali e profonde (para-aortiche, pelviche e solo eccezionalmente mediastiniche), ma non sono pochi i casi presentatisi con *localizzazioni extralinfonodali*. Splenomegalia ed epatomegalia sono piuttosto frequenti. Già all'esordio il l. si presenta pertanto in stadio avanzato (III-IV).

La *progressione* è rapida. L'aggressività della malattia è spesso mal controllabile dalle terapie, ma in circa 1/3 dei casi si raggiunge una RC con DFS prolungata per alcuni anni. Tuttavia più frequenti sono le precoci recidive con esito letale.

La *diagnosi differenziale* dev'essere posta nei confronti dei linfomi primitivi a cellule T, del «*Lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease*» (col. **3221) ed anche del «*Histiocyte-rich B-cell lymphoma*» (col. **3217), che ha notevoli affinità istologiche con la MH sottotipo LP, si presenta sempre in stadio clinico IV ed ha decorso aggressivo.

Linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino

Il l. primitivo del mediastino a grandi cellule B (*Primitive mediastinal B-cell lymphoma*, PMBL) descritto da Miller *et al.* (1978) e interpretato quale neoplasia istiocitica a crescita diffusa, ha attirato negli anni successivi l'attenzione di numerosi AA., per la singolarità del suo quadro istocitologico e clinico, ed è stato correttamente definito da Yousem *et al.* (1985) come l. della linea linfoide B, distinguendolo dai linfomi mediastinici T e dalle neoplasie primitive del mediastino di natura non ematologica.

La frequenza del PMBL si aggira tra 5-7% dei LNH. Colpisce in prevalenza giovani adulti (età mediana nel IV decennio, range 14-73), con discreta prevalenza del sesso femminile (Lazarino *et al.*, 1993).

La *sintomatologia* d'esordio è quella di una *sindrome mediastinica* a carattere decisamente aggressivo, in rapporto ad una massa linfomatosa *bulky* a collocazione mediastinica antero-superiore a rapido accrescimento: tosse secca, dispnea, dolore retrosternale, cefalea, disfonia per paresi delle corde vocali. Con frequenza superiore al 70% (Jacobson *et al.*, 1988) si osserva una *sindrome della vena cava superiore* (SVCS) (v. *1378). Possono essere lesi anche i tronchi anonimi. Trachea e bronchi subiscono disklocazioni o presentano stenosi nel 67% dei casi.

Nella maggior parte dei casi il l. è all'esordio caratteristicamente circoscritto all'*ambito toracico* (Lamarre *et al.*, 1989) e può essere collocato in stadio I o II E nell'88% dei casi. In circa il 50% dei casi si riscontrano *linfadenomegalie* superficiali sovraclavari o in sede profonda ilo-polmonare oppure sono documentabili infiltrazioni del polmone (28%), della pleura (14%) e del pericardio (14%), del miocardio (4%), della parete toracica (6%). Solo raramente all'esordio (12%) e pure in fase avanzata (14%) o in corso di recidiva, il l. si dissemina in *sedi extratoraciche*: linfonodi paraaortici 10%, reni 8%, mammella 2%, S.N.C. 5%, fegato, ovaie, tratto gastro-enterico. Il midollo osseo risulta infiltrato solo nel 3% dei casi, in fase di progressione di malattia.

La *diagnosi* può essere conseguita solo con l'esame istologico e immunofenotipico di materiale ottenuto da biopsia della massa mediastinica (preferenzialmente mediante microtoracotomia). La *diagnosi differenziale* va posta non solo nei confronti di altri l. mediastinici (malattia di Hodgkin, LNH linfoblastici T) ma pure del timoma, del seminoma e di germinomi (v. anche col. **3266).

Per la *terapia* si deve ricorrere a schemi di chemioterapia di terza generazione (MACOP-B e similari), completati da radioterapia di consolidamento «involved field». È interessante che nei pazienti responsivi, raggiunta una *sopravvivenza* di 18 mesi (circa il 45% dei casi), si osservi un *plateau* che si prolunga per oltre 10 anni senza recidive. Molti pazienti si dimostrano però refrattari a qualunque terapia, e, se recidivati, presentano rapida

progressione della malattia (Lazarino *et al.*, 1993).

L. primitivo del mediastino a grandi cellule B, all'esordio correlato

Questo raro e singolare processo linfomatoso è stato descritto da pochi anni (Knowles *et al.*, 1985; Walts *et al.*, 1990; Kricheldorf *et al.*, 1992;

Green *et al.*, 1995; Cesarman *et al.*, 1995; Ansari *et al.*, 1996). È una neoplasia linfoide a grandi cellule di immunofenotipo indeterminato («*null*») ma a genotipo B, localizzata esclusivamente nei liquidi sierosi, prevalentemente pleurico, talora peritoneale. Non dà luogo a formazione di masse né ad organomegalia né a metastasi. Il midollo osseo non è infiltrato da cellule linfomatose. Il processo è altresì caratterizzato dall'insorgenza in soggetti portatori di AIDS e di virus EBV e HHV-8 (v. sopra *Etiologia*). La malattia colpisce solitamente maschi omosessuali di 40-55 anni, con AIDS avanzato e bassa concentrazione di linfociti CD4+ (mediana 34/mm³), portatori di sarcoma di Kaposi e di infezioni opportunistiche. Il decorso è aggressivo, la sopravvivenza dal momento della diagnosi è limitata spesso a due mesi, comunque non supera i 6.

Bibliografia

- Al-Sharabati M., Chittal S., Duga-Neulat I. *et al.*, *Cancer*, 1991, 67, 2579-2587.
- Ansari M. A., Dawson B., Nador R. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1996, 105, 221-229.
- Brittinger G., Bartels H., Common H. *et al.*, *Hematol. Oncol.*, 1984, 2, 269-306.
- Cesarman E., Chang Y., Moore P. S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 1186-1191.
- Falini B., Venturi S., Martelli M. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1995, 89, 780-789.
- Green I., Espiritu E., Ladanyi M. *et al.*, *Mod. Pathol.*, 1995, 8, 39-45.
- Jacobson J. O., Aisenberg A. C., Lamarre L. *et al.*, *Cancer*, 1988, 62, 1893-1898.
- Karcher D. S., Dawkins F., Garrett C. T., Schulof R. S., *Lab. Invest.*, 1992, 66, 80A.
- Knowles D. M., Inghirami G., Ubriaco A., Dalla-Favera R., *Blood*, 1989, 73, 792-799.
- Krishnan J., Wallberg K., Frizzera G., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1994, 18, 455-465.
- Lamarre L., Jacobson J. O., Aisenberg A. C., Harris N. L., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989, 13, 730-739.
- Lazarino M., Orlandi E., Pauli M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11, 2306-2313.
- Macon W. R., Williams M. E., Greer J. P. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1992, 16, 351-363.
- Mann R. B., Jaffe E. S., Berard C. W., *Am. J. Pathol.*, 1979, 94, 104-192.
- Miller J. B., Variakojis D., Bitran J. D. *et al.*, *Blood*, 1978, 52 (Suppl. 1), 263.
- Rodriguez J., Pugh W. C., Cabanillas F., *Blood*, 1993, 82, 1586-1589.
- Salomao D. R., Nascimento A. G., Lloyd R. V. *et al.*, *Human Pathol.*, 1996, 27, 253-257.
- Walts A. E., Shintaku I. P., Said J. W., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990, 94, 170-175.

1.2.9. LINFOMA LINFOBLASTICO DI BURKITT

Premessa

Il l. linfoblastico di Burkitt (BL) è insolito in Occidente, ma in Africa equatoriale, dov'è endemico, rappresenta il 40-75% dei tumori infantili (v. sopra *Epidemiologia*). V. anche BURKITT, LINFOMA DI (v.; v.*; v.**).

Per le *forme endemiche* si parla di «*linfoma di Burkitt*» in senso proprio (in quanto descritto da Burkitt in Uganda nel 1966); per le forme occidentali — istologicamente del tutto sovrapponibili alle endemiche ma in parte diverse per alcuni aspetti biologici e clinici — da tempo è entrato nell'uso il termine «*linfoma linfoblastico, tipo Burkitt*». La REALC non ha accolto questa distinzione, preferendo il termine omnicomprensivo di «*linfoma linfoblastico di Burkitt*», sia per la forma endemica che per quella sporadica occidentale. Comunque il termine «*linfoma linfoblastico, tipo Burkitt*» non dev'essere confuso o considerato sinonimo di quello di «*linfoma linfoblastico simil-Burkitt*» («*undifferentiated, non Burkitt lymphoma*» di Rappaport, «*small noncleaved cell, non Burkitt lymphoma*» della Working Formulation), che nella REALC viene etichettato come «*High grade B-cell lymphoma Burkitt-like*» e considerato, cautelativamente in forma «*provisional*», quale entità a sé stante (v. oltre).

Quadro clinico

L'esordio non è di solito associato a sintomi generali (calo ponderale, febbre) e si manifesta principalmente con segni e sintomi extralinfonodali, ma con cospicue differenze di

TAB. XXXI. LOCALIZZAZIONI D'ESORDIO NEL LINFOMA DI BURKITT

(da Magrath I. T. *et al.*, 1992)

Localizzazioni	Frequenza (%) ^a	
	BL endemico	BL sporadico
Addome (tutte le sedi)	58	91
Versamenti pleurici	3	19
Midollo osseo	7	20
Linfonodi periferici	9	13
Scheletro	8	9
S.N.C./meningi	19	14
Paraspinali	17	2
Testicolo	2	6
Faringe	0	10
Mandibola/mascella	58	7
Mediastino	< 1	3
Orbita	11	1
Organi vari ^b	17	15

^a molti pazienti presentano localizzazioni multiple; ^b comprendono tiroide, mammella, cute, spalla, cosce.

localizzazioni tra la forma epidemica africana e quella sporadica occidentale (tab. XXXI).

Nella *forma endemica* predomina (in circa il 60% dei bambini in età prepuberale) una *localizzazione scheletrica* al massiccio facciale (mandibola, mascella [v. fig. 5 della VOCE BURKITT, LINFOMA DI, III, col. 455]). Anche se la tumefazione appare unica, l'esame radiologico svela multipli foci tumorali in area alveolare. La cavità orbitale può venire occupata tramite invasione attraverso il pavimento orbitale da parte di masse occludenti il seno mascellare; ne conseguono proptosi o masse orbitali monolaterali e chemosi congiuntivale. Possono venire interessati nervi cranici e lo spazio epidurale, con lesioni meningee e cerebrali e sindromi da lesione spinale. La proliferazione neoplastica si estende rapidamente alle *parti molli* finitime, per sviluppo extracorticale della neoplasia, e può interessare la palpebra

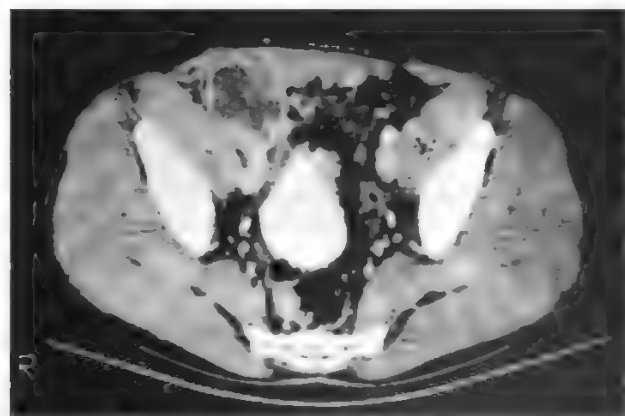


Fig. 79. L. di Burkitt sporadico. TC dell'addome. Massa linfonodale con aree di necrosi centrale in sede iliaca esterna destra. Sono presenti anche alcuni linfonodi ingranditi in sede iliaca esterna sinistra, a densità omogenea.

Fig. 80. L. di Burkitt sporadico (ragazza di anni 12). Vistosa localizzazione mammaria, bilaterale.



superiore, le ghiandole lacrimali e le salivari maggiori; tuttavia l'infiltrazione della cute è rara. Si nota perdita di denti permanenti e precoce caduta dei decidui. Grosse masse tumorali necrotiche possono protrudere nel cavo orale provocando un caratteristico odore fetido.

Nella *forma sporadica* l'esordio è invece eminentemente *addominale* (91% dei casi), che tuttavia non è insolito neanche nella forma endemica. Possono essere infiltrati ed inglobati in grosse masse tutte le strutture addominali e tutti i visceri pelvici, nonché i linfonodi retroperitoneali, inguino-addominali o pelvici. Con particolare frequenza sono coinvolti l'ileo terminale, l'appendice, il colon ascendente, con quadri clinici di occlusione intestinale e di invaginazione ileo-cecale (fig. 79). Spesso interessati sono pure peritoneo ed omento (con frequente ascite), linfonodi mesenterici, nonché stomaco, milza, fegato. Più insolito è il coinvolgimento dei reni (talora con stenosi ureterale) e dei surreni, ovaio, testicoli. Le *mammelle* sono non di rado infiltrate bilateralmente, in femmine, sempre in stato post-puberale e per lo più tra i 15-36 anni, spesso in rapporto a gravidanza e allattamento (fig. 80). Piuttosto rare sono le localizzazioni cefaliche, rinofaringee e tonsillari, polmonari e pleuriche (versamenti), miocardiche e pericardiche, cutanee; insolita è la meningopatia linfomatosa. I linfonodi superficiali e quelli retroperitoneali non sono frequentemente interessati; assai raramente lo è il mediastino.

Per i *criteri di stadiazione* del BL v. BURKITT, LINFOMA DI*, col. *1172, tab. II.

Decorso

Il decorso è per lo più rapido e tumultuoso ed il paziente, se non curato, non sopravvive più di 6 mesi. Si manifestano spesso disturbi dell'equilibrio elettrolitico e idrico ed altre turbe dismetaboliche, insufficienza renale, complicanze legate alla pancitopenia da insufficienza midollare, ad ostruzione delle vie aeree oppure lesioni cerebrali o spinali od anche perforazioni o stenosi intestinali.

Segni prognostici infausti sono il grande sviluppo della massa neoplastica (da ciò discende l'indicazione dell'exeresi chirurgica della maggior parte possibile delle masse addominali), l'elevata concentrazione sierica dell'acido urico e della LDH, la leucemizzazione, l'insorgenza di meningopatia. La prognosi è radicalmente e favorevolmente mutata con le attuali risorse terapeutiche (v. col. **3452).

Linfoma linfoblastico a cellule B ad alta malignità, Burkitt-simile

Questo l., dalle caratteristiche *borderline* tra il l. Burkitt ed i linfomi a grandi cellule B (v. col. **3269), è alquanto raro. Colpisce in prevalenza maschi adulti o anziani; quadri anatomo-clinici di questo tipo sono stati osservati in omosessuali con AIDS (Ziegler *et al.*, 1982).

Il processo linfomatoso interessa preminentemente i linfonodi superficiali (in primo luogo i latero-cervicali) e meno frequentemente i profondi (mediastinici e addominali). Il coinvolgimento di sedi extralinfonodali è insolito: vengono segnalati casi con interessamento cutaneo o intestinale o splenico; il midollo osseo è però spesso infiltrato.

Il processo ha decorso aggressivo e spesso rapidamente letale. Nell'età infantile la malattia presenta caratteri clinici più simili al l. di Burkitt e non raramente assume espressioni leucemiche, con quadri di meningosi linfomatosa (Watanabe *et al.*, 1973).

Bibliografia

- Burkitt J., Wright D. H. eds., *Burkitt's lymphoma*, 1970, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Magrath I. T., Jain V., Jaffe E. S., *Small non cleaved cell lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 749-772.
 Watanabe A., Sullivan M. P., Sutow W. W., Wilbur J. R., *Am. J. Dis. Child*, 1973, **125**, 57-61.
 Ziegler J., Drew W., Miner R. *et al.*, *Lancet*, 1982, **2**, 631-633.

2. LINFOMI NON-HODGKIN A CELLULE T (O NK)

2.1. NEOPLASIE DERIVATE DA PRECURSORI T-CELLULARI

2.1.1. LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLASTICO T

Il quadro clinico del l. linfoblastico a cellule T (T-LbL) è in gran parte affine a quello del l. linfoblastico a cellule B (v. sopra) ed alla leucemia linfatica acuta a cellule T (T-ALL; v. LEUCEMIE**, VIII, 1537-1541; *4559), pur distinguendosi per alcuni aspetti. Si può ipotizzare che alcune differenze immunofenotipiche tra T-ALL e T-LbL possano condizionare l'evoluzione leucemica del processo morboso (Catovsky e Foa, 1990).

Il T-LbL ha particolare incidenza nei maschi e tra i 10-30 anni (come la T-ALL). In una grande casistica di Nathwani (1978) l'età mediana nei maschi era di 27 anni, nelle donne di 50.

Quadro clinico

L'esordio è caratterizzato da uno stadio avanzato (III-IV) di malattia, con anemia non grave, concentrazione ematica di piastrine e leucociti non discosta dalla norma; assenza di cellule linfomatose in circolo, in accordo alla scarsa infiltrazione midollare dei blasti, che non superano il 20% della globale

popolazione cellulare del midollo osseo. Se l'interessamento midollare da parte delle cellule neoplastiche supera questo valore, il caso va etichettato come T-ALL. Più o meno precocemente, nel 70% dei casi di T-LbL si osserva tuttavia la progressione verso un quadro francamente leucemico.

Nel 95% dei casi è presente una localizzazione mediastinica bulky (fig. 81), con sindrome mediastinica e ostruzione della vena cava superiore. In genere più modeste che nella T-ALL e nel B-LbL sono invece le localizzazioni ai linfonodi superficiali (di solito sopradiaframmatiche) e addominali, l'epato-splenomegalia, l'interessamento renale e meningo-encefalico (20% dei casi) e delle gonadi, dello scheletro (lesioni osteolitiche solitarie in sedi varie). In circa il 20% dei casi si osservano già all'esordio lesioni cutanee di tipo eritematoso, nodulare o a placche, solitarie o multiple, interessanti soprattutto cuoio capelluto, capo e collo. Raramente l'interessamento cutaneo assume carattere predominante; se tale evento ha carattere primario manca in genere la massa mediastinica (Isaacson e Norton, 1994). Particolarmente frequente è pure la localizzazione pleurica, con versamenti bilaterali.

Decorso

Il decorso clinico del l. non appare correlato allo stadio maturativo delle cellule linfomatose (Crist *et al.*, 1988) tranne che nei casi presentanti antigeni NK-associati, che hanno una storia naturale più aggressiva (Sheibani *et al.*, 1987). Se non trattato, il l. comporta dopo pochi mesi esito infausto, quasi sempre a seguito di leucemizzazione e con meningosi leucemica, ma il processo appare meno aggressivo della corrispondente forma leucemica d'embrée, sia nei bambini che negli adulti, e risponde in maniera soddisfacente alle odierne terapie, comprensive della profilassi meningea e del trapianto midollare (Santini *et al.*, 1989) (v. col. **3452).

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London.
 Crist W. M., Shuster J. J., Falletta J. *et al.*, *Blood*, 1988, **72**, 1891-1897.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Knowles D. M., *Lymphoblastic lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 715-747.
 Nathwani B. N., Diamond L. W., Winberg C. D. *et al.*, *Cancer*, 1978, **48**, 2347-2357.
 Santini G., Coser P., Chisesi T. *et al.*, *Bone marrow transplant*, 1989, **4**, 399-404.
 Sheibani K., Nathwani B., Winberg C., *Cancer*, 1987, **60**, 183.

2.2. NEOPLASIE DERIVATE DA CELLULE LINFOIDI T-PERIFERICHE

2.2.1. LINFOMI A CELLULE T-PERIFERICHE, NON ALTRIMENTI SPECIFICABILI

I l. a cellule T-periferiche a proliferazione diffusa (T-PDL) del gruppo «unspecified» (v. sopra col. **3274) qui considerato, rappresentano circa il 15% di tutti i LNH in paesi occidentali, ma sono più frequenti in altre aree geografiche (v. sopra *Epidemiologia*), particolarmente in Giappone (Kadin *et al.*, 1983).

Quadro clinico

All'esordio sono talora presenti sintomi generali, in genere di modesta entità, e la presentazione clinica è solitamente caratterizzata da linfadenomegalie superficiali e/o profonde (preferenzialmente addominali, retroperitoneali e/o mesenteriche); il loro sviluppo è piuttosto circoscritto a poche stazioni che non generalizzato e porta spesso alla formazione di grossi agglomerati. Occasionalmente può essere reperita la localizzazione mediastinica, isolata o associata ad altri coinvolgimenti linfonodali. Frequente è l'interessamento

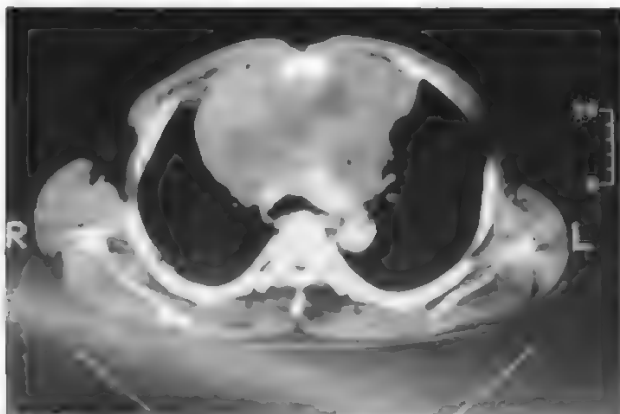


Fig. 81. LNH T-linfoblastico. TC del torace. A sinistra, la massa a consistenza disomogenea del mediastino anteriore medio e la deviazione posteriormente le strutture vascolari.

mento di sedi *extralinfonodali*, associate o meno alle linfonodali: costituisce talora l'evento clinico primario e tale può rimanere anche per periodi prolungati di tempo. Ciò fa sì che i T-PDL vengano spesso osservati già all'esordio in stadio III-IV, mentre non sono affatto comuni i casi che si presentano in stadio I, tranne quelli che esordiscono in area rinofaringea.

Tra le localizzazioni extralinfonodali, frequenti sono quelle *cutanee*, notevolmente eterogenee, nodulari o a placche o «tumoriali»: costituiscono talora l'espressione primitiva della malattia. La diagnosi differenziale va posta nei confronti dello pseudolinfoma di Jessner-Kanof e di talune forme di lupus eritematoso sistemico (LES) (Isaacson e Norton, 1994), nonché di eruzioni cutanee da farmaci (fenitoina, difenilidantoina, captopril, enalapril, levopromazina, penicillina) (Kardaun *et al.*, 1988). È nota qualche osservazione di l. T cellulari in *ghiandole salivari*, talora con analogie strutturale con il T l. associato ad enteropatia (EATL, v. oltre). La *splenomegalia* non assume mai all'esordio importanza clinica preminente ed anche nel successivo decorso raramente raggiunge volume cospicuo. La localizzazione primaria dei T-PDL al *tratto gastrointestinale* è del tutto inconsueta. Rare sono le localizzazioni dei T-PDL al *sistema nervoso centrale* e alle *meningi* (McCue *et al.*, 1993). L'infiltrazione linfomatosa del *midollo osseo*, presente nel 60% dei casi e in tutti i tipi citologici del T-PDL (Gaulard *et al.*, 1991), comporta in genere prognosi peggiorativa (Caulet *et al.*, 1990).

Decorso

Il *decorso* è variabile da caso a caso e non appare strettamente associato al quadro istologico né al fenotipo, specialmente da quando si applica in ogni caso terapia aggressiva. Mentre in passato le sopravvivenze protratte apparivano più frequenti nelle forme a piccole cellule che in quelle a cellule miste o alle grandi, attualmente la frequenza di RC è notevolmente alta proprio nelle forme istologicamente più ag-

gressive, in cui la durata della sopravvivenza esente da malattia (DFS) si aggira sui 40 mesi (Pinkus e Said, 1992).

Bibliografia

- Caulet S., Demar A., Audouin J. *et al.*, *Hematol. Oncol.*, 1990, **8**, 155-168.
 Gaulard P., Kanavaros P., Farcet J. P. *et al.*, *Human Pathol.*, 1991, **22**, 331-338.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Kadin M. E., Berard C. W., Namba K. *et al.*, *Human Pathol.*, 1983, **14**, 745-772.
 Kardaun S. H., Scheffer E., Vermeer B. J., *Br. J. Dermatol.*, 1988, **118**, 545-552.
 McCue M. P., Sandrock A. W., Lee J. M. *et al.*, *Neurology*, 1993, **43**, 377-381.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.

2.2.2. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA T. LEUCEMIA PROLINFOCITICA T

La leucemia linfatica cronica T (T-CLL) e la leucemia prolinfocitica cronica T (T-PLL) sono entità morbose di insolita osservazione (v. anche LEUCEMIE, VIII, 1607-1608; LEUCEMIE*, col. *4603 e rispettivamente col. *4604).

Leucemia linfatica cronica T

Rappresenta al più l'1% di tutte le leucemie linfatiche croniche da quando si è dimostrato che la maggior parte delle leucemie così etichettate nella passata letteratura erano probabilmente leucemie a grandi cellule granulate (LGL) (v. oltre). Data l'eccellenza e spesso l'ambiguità delle segnalazioni di T-CLL a piccoli linfociti (non prolinfocitica né a grandi cellule granulate) non è possibile tracciarne un attendibile quadro clinico. Si presume che non si discosti sostanzialmente da quello della B-CLL.

Leucemia prolinfocitica T

È pure insolita ma rappresenta circa il 10% di tutte le leucemie a fenotipo maturo e circa il 30% di tutte le leucemie

TAB. XXXII. PARAMETRI DI DIAGNOSI DIFFERENZIALE TRA B-PLL, T-PLL E T-LGL

Parametri	B-PLL	T-PLL	T-LGL
Età mediana (anni)	70	69	60
Sesso (M/F)	1,6/1	2/1	M > F
Sintomi generali B	insoliti	frequenti	rari
Linfoadenomegalie	< 5%	40-50%	10%
Splenomegalia	98%	70-80%	80%
Epatomegalia	20%	40%	30%
Lesioni cutanee	< 5%	25%	25%
Versamenti pleurici	< 5%	15-20%	rari
Infiltrazione midollare	interstiziale/nodulare	diffusa	interstiziale/nodulare
Neutropenia	insolita	insolita	50-80%
Leucocitosi ($\times 10^9/L$)			55%
< 10			30%
10-20			eccellenza
> 100	65%	82%	
Emoglobina (< 10 g/dL)	70%	55%	30%
Piastrine (< $100 \times 10^9/L$)	72%	68%	30%
Anomalie cromosomiche	insolite	inv 14(q11;q32) (63%)	?
Ig sieriche	basse	normali	aumentate (> 50%)
Sopravvivenza mediana	~ 3 anni	< 1 anno	lungo decorso indolente

B-PLL: L. prolinfocitico B; T-PLL: L. prolinfocitico T; T-LGL: L. a grandi linfociti granulati T.

a cellule T. Dev'essere considerata una entità morbosa distinta dalla B-PLL. Colpisce di preferenza soggetti maschili ultracinquantenni (età media di esordio 69 anni). La *sintomatologia d'esordio* comprende senso di malessere, sudorazione, astenia, dimagrimento, anemizzazione. In fasi successive si manifestano frequentemente (più di quanto si osservi nella B-PLL) *linfadenomegalie sistemiche* pluristazionali superficiali e profonde. Ancora più comune è il reperto di *splenomegalia*, mentre l'*epatomegalia* è di riscontro meno frequente. In un discreto numero di casi si manifesta penosa dispnea a causa di cospicui *versamenti pleurici* e si può osservare *ascite* (eventi ambedue rari nella B-PLL). *Lesioni cutanee* sono presenti in circa il 14-25% dei casi, in forma di *rash* maculo-papulosi, di noduli linfomatosi, raramente di chiazze eritrodermiche, sia all'esordio che in corso di malattia.

La *leucocitosi* è sempre elevata e nei 2/3 dei pazienti supera valori di $200 \times 10^9/L$: per la maggior parte è costituita da *prolinfociti atipici* (v. sopra col. **3280). Anemia e piastrinopenia sono costanti.

Il *decorso* è notevolmente aggressivo. Si nota diffusione sistemica delle linfadenomegalie in più del 50% dei pazienti. La milza spesso assume nel tempo volume rilevante.

La *prognosi* non differisce sostanzialmente da quella della corrispondente forma a cellule B. La sopravvivenza mediana è di 7 mesi se non si impiegano schemi terapeutici di ultima generazione.

Per la *diagnosi differenziale*, oltre ai reperti istocitologici (v. sopra *Istologia*), v. anche la tabella XXXII.

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London, p. 113.
Catovsky D., Matutes E., *Leukemias of mature T cells*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1267.
Rozman C. ed., *Chronic lymphocytic leukaemia and related disorders*, in *Baillière's Clinical Haematology*, 1993, 6, 757-915.

2.2.3. LEUCEMIA A GRANDI LINFOCITI GRANULATI

Premessa

È una rara forma linfoproliferativa ad etiologia e patogenesi ignote. Si osserva soprattutto in soggetti maschi adulti ma sono stati segnalati anche casi in giovani e, quale evento eccezionale, nell'età infantile (Reynolds e Foon, 1984).

La leucemia a grandi linfociti granulati (LGL) (v. anche LEUCEMIE*, col. *4603) è eterogenea per reperti citologici, immunofenotipici e quadro clinico. Sono state infatti osservate forme a LGL-T CD3+ e forme a LGL-NK CD3 negative (v. coll. **3281-3282), con espressioni cliniche differenti.

Leucemia a LGL-T CD3 positive

L'esordio clinico è asintomatico nel 30% dei casi e la peculiare *linfocitosi associata a neutropenia* viene di solito scoperta occasionalmente. Più raramente la scena è aperta da una condizione anemica o da segni di linfadenopatia sistemica. Spesso l'esordio (ed il decorso successivo) sono contraddistinti da ricorrenti *infezioni batteriche* locali (cavo orale, vie aree superiori) o di tipo settico; raramente le infezioni sono di natura virale o micotica. Talora già all'inizio e nel 30% dei casi, in corso di malattia possono manifestarsi segni di artrite reumatoide (Berliner, 1990). In più del 50% dei pazienti si rende manifesta una *splenomegalia*, abitualmente non cospicua ma talora rilevante. L'associazione di artrite reumatoide, splenomegalia, neutropenia con linfocitosi ricorda da vicino la *sindrome di Felty* (v. I. Mieloma). frequente è l'*epatomegalia*, insolite sono le *linfadenome-*

galie, le *lesioni cutanee*, la compromissione del *rene* e del *tratto digerente*.

Il *quadro ematologico* è dominato dal reperto di leucocitosi modesta, lentamente progressiva (nell'85% dei casi i leucociti non superano valori di $20 \times 10^9/L$), dovuta a rilevante *linfocitosi* relativa e assoluta per aumento dei LGL ($> 2 \times 10^9/L$), associata a grave *neutropenia* (nel 50% dei casi $N < 0.5 \times 10^9/L$). In circa il 30% dei casi vi è *anemia*, talora grave. Insolita è la piastrinopenia. Il *mieloaspirato* mostra spesso modesto aumento dei LGL, con reperti normali, quantitativi e qualitativi, della mielopoiesi: insoliti sono i reperti di «arresto maturativo» della granulocitopoiesi allo stadio promielo-mielocitico, e di eritroblastopenia.

Ipergammaglobulinemia policlonale, positività del fattore reumatoide, presenza di anticorpi antinucleo vengono reperiti in più della metà dei casi; anticorpi anti-neutrofili e anti-piastrine sono stati segnalati nel 90% dei casi. Eccezionale è il reperto di ipogammaglobulinemia.

Il *decorso* è generalmente prolungato, indolente, con possibili remissioni spontanee seguite da recidive, ma senza rilevante progressione. La malattia può presentare maggiore aggressività nei rari casi con LGL CD3+ a morfologia più immatura. Pure l'associazione di CD3/CD56 comporta decorso clinico più aggressivo. Sintomatologia e decorso sono correlati allo stato cito(neutro)penico piuttosto che allo sviluppo della massa neoplastica.

Hanno peso *prognostico*, all'esordio, la presenza di febbre o altri segni generali, la spiccata neutropenia, la bassa percentuale di cellule CD57+ e l'elevata concentrazione di LGL nel sangue periferico, con significato peggiorativo nel senso di decorso più aggressivo e di difficoltà ad ottenere remissioni complete (Pandolfi *et al.*, 1990; Dhodapkar *et al.*, 1994). Nel 20% dei casi si ha decesso entro 4 anni. L'evento infausto è dovuto, in ordine di frequenza, a complicanze infettive, a incremento del quadro leucemico e della organomegalia, a progressione in un linfoma a grandi cellule immunoblastiche o anaplastiche (Smith *et al.*, 1995).

Leucemia a LGL-NK CD3 negative

L'esordio ed il decorso sono simili a quelli dei I. ad alta malignità, con febbre, sudorazione notturna, calo ponderale, coinvolgimento multiviscerale (epatosplenomegalia, linfadenomegalie superficiali e profonde). In questi casi sono assai frequenti le *infezioni virali*, dovute a HBV, HCV, EBV (più spesso osservabile nella casistica asiatica); raramente è stata osservata la presenza di HTLV-I/II e di HIV-1 (Kawa-Ha *et al.*, 1989; Zambello *et al.*, 1995). Si osservano talora decorsi fulminanti, con *exitus* in 2-3 mesi.

Sia nel primo che nel secondo tipo di leucemia a LGL, il processo può associarsi ad altro tipo di linfoma/leucemia di natura sia T che B ed in particolare a tricoleucemia o ad un I. ad alta malignità. Non sono infrequenti le associazioni con carcinomi. Tali eventi possono manifestarsi dopo alcuni mesi o dopo anni dall'esordio clinico della malattia a LGL.

Bibliografia

- Berliner N., *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1990, 4, 473-487.
Dhodapkar M. V., Li Ishihara S., Ninomiya T. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 1620-1627.
Kawa-Ha K., Ishihara S., Ninomiya T. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 51-55.
Litz C. E., Brunning R. D., *Chronic lymphoproliferative disorders: classification and diagnosis*, in Rozman C. ed., *Chronic lymphocytic leukaemia and related disorders*, in *Baillière's Clinical Haematology*, 1993, 6, 767.
Pandolfi F., Loughran T. P., Starkebaum G., *Cancer*, 1990, 65, 341-345.
Reynolds C. W., Foon K. A., *Blood*, 1984, 64, 1146-1158.
Smith S. R., Middleton P. G., Birch P. J. *et al.*, *J. Clin. Pathol.*, 1995, 48, 672-675.
Zambello R., Loughran T. P., Trentin L. *et al.*, *Leukemia*, 1995, 9, 209-211.

2.2.4. MICOSI FUNGOIDE-SINDROME DI SÉZARY E ALTRI LINFOMI CUTANEI PRIMITIVI

Premessa

La micosi fungoide (MF) e la sindrome di Sézary (SS) fanno parte di un vasto gruppo di *linfomi cutanei a cellule T periferiche mature* (CTCL). Sono neoplasie alquanto rare: rappresentano lo 0,9% dei LNH, ma circa la metà di tutti i l. cutanei primari (Weinstock e Horn, 1988). Negli USA l'incidenza di MF è raddoppiata tra il 1973 ed il 1984, da 0,2 a 0,4 casi/100.000/anno. Alcuni ritengono che MF e SS siano entità cliniche distinte ma l'opinione più accreditata è che si tratti di due diverse espressioni clinico-ematologiche dello stesso processo biologico (Broden e Bunn, 1980). La *classificazione dei l. cutanei* è riportata nella tab. XXXIII.

La MF/SS colpisce di preferenza *maschi* (M/F = 2/1) nel 4°-6° decennio di vita (*età* mediana 55 anni); è rara al di sotto dei 30 anni (Winkler e Bunn, 1983).

Micosi fungoide

Il quadro clinico è dominato da lesioni cutanee polimorfe che evolvono attraverso vari stadi (v. MICOSI FUNGOIDE, IX, 1168, figg. 1-6); vi si associano via via segni di interessamento viscerale (linfadenomegalie, epatosplenomegalie, lesioni polmonari, ecc.). Nel complesso la MF si presenta con tre *varianti cliniche*.

Forma classica (Alibert-Bazin)

Si articola in tre fasi di espressioni cutanee:

1. *Fase iniziale «premicotica»*: è caratterizzata da lesioni

TAB. XXXIII. CLASSIFICAZIONE DEI LINFOMI CUTANEI

(Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, Churchill Livingstone, Edimburgo, 1994)

A cellule T

di basso grado

Tipo a piccole cellule cerebriformi
Con modesto epidermotropismo

Micosi fungoide

Sindrome di Sézary

Micosi atipiche

spongiosa

pustolosa/bollosa

granulomatosa

follicolocentrica

unilesionale

Granulomatous lack skin

Smouldering adult T-cell lymphoma/leukaemia

Con spiccato epidermotropismo

Multilesionale (tipo Ketrion-Goodman)

± iperplasia epidermica

Unilesionale (tipo Woringer-Kolopp)

± iperplasia epidermica

Tipo a piccole cellule pleomorfe (HTLV-I negative)

di alto grado

Pleomorfo e immunoblastico (HTLV-I negativo)

Angiocentrico/angiodistruttivo

A grandi cellule anaplastiche e condizioni correlate

Papulosi linfomatoidi

Linfoblastico

A cellule B

di basso grado

Tipo della zona marginale, incluso il linfoplasmacitoide

Linfoma centrofollicolare (cb/cc)

Plasmacitico

di alto grado

A grandi cellule ± componente a basso grado

Linfoblastico

Tipi inclassificabili e rari

acute diffuse o localizzate «aspecifiche», di tipo eritematoso o eczematoso, intensamente pruriginose. Possono mimare dermatiti seborroiche, parapsoriasi, neurodermatiti («quadri prediagnostici»).

2. Successivamente — dopo mesi o anni — si manifestano *processi infiltrativi a placche*, di colorito roseo o rosso, a contorni irregolari leggermente rilevati, che possono insorgere su aree cutanee precedentemente eczematose o in aree sane, in forma diffusa («*facies leonina*») o multinodulare. Mostrano talora aree centrali di regressione spontanea (fig. 82).

3. La malattia evolve poi nella *fase «tumorale»* (fig. 83, A), con formazione di singole o multiple masse rotondeggianti a larga base, di volume variante da una noce ad un'arancia, tendenzialmente confluenti, di colorito rosso-cianotico o giallo-rossastro, talora ulcerate. Presentano talora rapide variazioni di volume, talaltra sono a lungo stazionarie. Le formazioni «tumorali» insorgono prevalentemente in aree «premicotiche» o su lesioni a grandi placche, raramente in aree di cute sana.

Forma eritrodermica

Può precedere o associarsi alla fase «tumorale» (fig. 83, B). L'aspetto è quello di una eritrodermia esfoliativa («*sindrome dell'uomo rosso*»), con cute ispessita e intenso prurito.

Forma fungoide d'emblée

Comprende i casi con manifestazioni «tumorali» non precedute da altra forma di lesione cutanea.

Dopo un variabile lasso di tempo (anche molti anni) il processo neoplastico, esordito nel mantello cutaneo, si diffonde per via ematica ai linfonodi e, meno frequentemente, alla milza, al fegato, ai polmoni, ai reni, al tratto gastrointestinale e ad altri organi. Le vie aeree superiori e il cavo orale sono interessati nel 20% dei casi; sono state segnalate lesioni oculari, con infiltrazione delle congiuntive, della cornea, della sclera e delle ghiandole lacrimali. Rare sono le localizzazioni scheletriche, con formazione di aree osteolitiche, possibili cause di fratture patologiche. In fase terminale sono interessati il S.N.C. e le meningi.

Data la particolare fenomenologia clinica della MF, il sistema di *stadiazione* di Ann Arbor non è ritenuto appropriato ed è preferibile riferirsi allo schema basato sui criteri TNM, modificati da Bunn e Lamberg (1979) (tab. XXXIV).

Rilevante peso *prognostico* hanno l'estensione delle *lesioni cutanee* (da T1 a T4), la presenza di *linfadenomegalie* e il numero delle stazioni linfonodali coinvolte: pazienti senza linfonodi palpabili hanno prospettive di sopravvivenza a 3 anni dell'80%, in quelli

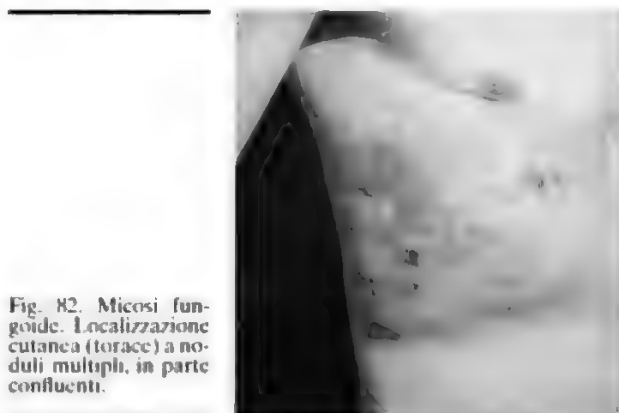


Fig. 82. Micosi fungoide. Localizzazione cutanea (torace) a noduli multipli, in parte confluenti.



Fig. 83. Micosi fungoide. A) Variante eritrodermica-fungoide. B) Variante eritrodermica pura.

con 2 o più stazioni tale valore scende al 60% (Lamberg *et al.*, 1984). Un importante fattore prognostico è rappresentato pure dall'interessamento viscerale (anche se clinicamente inapparente): casi di CTCL con coinvolgimento epatosplenico biopsicamente documentato hanno sopravvivenza mediana di un anno (Fuks *et al.*,

1973). La presenza di cellule di Sézary nel sangue periferico è spesso associata a disseminazione linfonodale e viscerale: la concentrazione di tali cellule (e in specie delle più grandi) nel sangue periferico è correlata alla prognosi (Vonderheid *et al.*, 1985).

Il decorso è assai diverso da caso a caso. La malattia con minime lesioni cutanee e assenza di coinvolgimento viscerale all'esordio, può rimanere stazionaria per anni e presentare fasi alterne di regressione spontanea e di recidiva. Tuttavia altri casi apparentemente simili possono presentare invece evoluzione rapidamente progressiva. In fasi avanzate compare uno stato febbrile ed i pazienti vanno incontro a reiterati processi infettivi. A ciò contribuiscono deficienze funzionali delle cellule T CD4+ (Musiani *et al.*, 1983). La malattia può protrarsi pertanto da 1 a 30 anni (media circa 5 anni), ma dal momento della disseminazione cutanea e del coinvolgimento viscerale la sopravvivenza non supera di solito 7-8 mesi, se non nei casi con buona risposta alle attuali terapie. Pazienti di età inferiore ai 50 anni presentano sopravvivenza di durata doppia rispetto agli ultrasessantenni.

Sindrome di Sézary

Può essere considerata la variante leucemica della micosi fungoide (v. SÉZARY, SINDROME DI [XIV, 117]). Colpisce per lo più soggetti in età superiore ai 50 anni, maschi. La diagnosi si basa sulla triade clinico-ematologica: eritrodermia generalizzata (talora con iperpigmentazione ed esfoliazione), linfadenomegalia, presenza in circolo di cellule linfoidi a nucleo ipercromico profondamente convoluto o cerebriforme (cellule di Sézary). La concentrazione leucocitaria spazia da valori normali a circa $200 \times 10^9/L$ e la percentuale delle cellule di Sézary varia tra 10 e 100. Assente o scarsa è l'infiltrazione midollare. La sopravvivenza varia tra 6 mesi e 16 anni a seconda dei casi, ma per lo più è inferiore ai 5 anni. Raramente si osserva l'evoluzione in forme linfomatose a più elevato grado di malignità istologica.

Particolari forme linfoproliferative cutanee primitive a cellule T periferiche

1. *Linfoma cutaneo a piccole cellule cerebriformi, con spiccato epidermotropismo (pagetoide)*. — Questa classe di linfomi a cellule T comprende due forme: il tipo descritto da Ketron e Goodman (1931), tipicamente multifocale (v. col. 6388), e quello delineato da Woringer e Kolopp (1939), strettamente circoscritto e

TAB. XXXIV. SISTEMA DI STADIAZIONE E CLASSIFICAZIONE TNM DEI LINFOMI CUTANEI

(Bunn P. A., Lamberg S. I., Report of the Committee on staging and classification of cutaneous T-cell lymphomas, *Cancer Treat. Rep.*, 1979, 63, 725-728).

Stadio	T ^a	N ^b	M ^c	B ^d
IA	1	0	0	0
IB	2	0	0	0
IIA	1-2	1	0	0
IIB	3	0-1	0	0
IIIA	4	0	0	0
IIIB	4	1	0	0
IVA	1-4	2-3	0	0
IVB	1-4	0-3	1	1

a: T (cute)

- T1 placche limitate, papule o lesioni eczematose ricoprenti < 10% della superficie cutanea
- T2 placche generalizzate, papule o lesioni eczematose ricoprenti ≥ 10% della superficie cutanea
- T3 uno o più noduli cutanei «tumoral»
- T4 eritrodermia generalizzata

b: N (linfonodi)

- N0 linfonodi periferici clinicamente normali; biopsia (se effettuata) negativa
- N1 linfonodi periferici clinicamente ingranditi
- N1a biopsia non effettuata
- N1b biopsia rivela linfonodi normali
- N2 biopsia rivela alterazioni reattive
- N2a biopsia rivela solo linfadenopatia dermatopica
- N2b linfonodi periferici clinicamente non anormali ma le biopsie rivelano un coinvolgimento viscerale o epatosplenico (con biopsia)
- N3 linfonodi periferici clinicamente anormali, biopsie positive

c: M (malattia viscerale)

- M0 coinvolgimento viscerale non documentato
- M1 coinvolgimento viscerale documentato (con biopsia)

d: B (sangue)

- B0 sangue periferico, linfociti atipici assenti o < 5%
- B1 sangue periferico, linfociti atipici circolanti > 5%

2. *Granulomatous lack skin.* – La «*cute flaccida granulomatosa*» è una rara condizione caratterizzata clinicamente da abbondanti pli- che cutanee anelastiche in aree intertriginose (ascelle, inguini). *Isto- logicamente* si notano: a) densa e diffusa infiltrazione del derma da parte di cellule simili a quelle di Lutzner della MF, che isolatamente o in piccoli aggregati si reperiscono anche in sede intraepidermica; b) sparse formazioni granulomatoze dermiche a tipo tubercolo e/o cellule giganti multinucleate del tipo Langhans; c) assenza di fibre elastiche nel derma infiltrato. Gli elementi linfoidei infiltranti il derma sono di linea T, CD4+, con riarrangiamento clonale di geni *TCR* (Helm *et al.*, 1990). Si impone soprattutto la diagnosi differenziale con la rara «variante granulomatosa» della MF.

3. *Piuriasi lichenoid.* – Questo nome accomuna due disordini clinicamente e istologicamente strettamente affini: la *piuriasi liche- noide cronica* (PLC) e la *piuriasi lichenoid e varioliforme acuta* (PLEVA; *malattia di Mucha-Habermann*), tra cui sono frequenti forme intermedie o miste (v. PARAPSORIASI, XI, 1069-1071). In am-

bedue le forme viene reperita una densa infiltrazione dermica su- perficiale perivascolare, e talora epidermica, da parte di T linfociti CD4+ o CD8+, con riarrangiamento clonale di geni *TCR*.

4. *Papulosi linfomatoide (malattia di Macaulay).* – È caratteriz- zata da episodi ricorrenti di eruzioni cutanee papulose rossastre, isolate o diffuse, o di noduli o di grandi placche ricoperte da escare nere, con remissioni e recrudescenze spontanee ma nel complesso persistenti per decenni (fig. 84). All'esame istologico il derma reticolare e l'epidermico appaiono infiltrati da grandi cellule linfoide mononucleate, di tipo A (simili a cellule H-RS) o di tipo B (va- riante a grandi cellule della MF). Il tipo A ed il B possono essere talora commisti. L'infiltrato linfoide può invadere anche l'epider- mide e le pareti vasali del derma provocando emorragie nel derma reticolare profondo. Le cellule linfoide atipiche sono di linea T, in genere CD4+. Quelle di grandi dimensioni mostrano spesso anoma- la espressione di antigeni T-associati, positività di CD30 e talora di CD15, come le cellule H-RS della malattia di Hodgkin (Willem-



Fig. 84. Papulosi linfomatoide, con aspetti di l. a grandi cellule. Varia morfologia delle localizzazioni cutanee. A e B) Addome e cosce. Infiltrazione eritrodermica e papulo-nodulare diffusa. C) Mammella. Plurimi noduli, non confluenti.

ze *et al.*, 1982). I reperti di genetica molecolare depongono per la clonalità della proliferazione linfoide. Nel 10-20% dei casi si assiste alla progressione della malattia cutanea in un tipico linfoma, ora con caratteristiche simil-hodgkiniane ora con il quadro di una mi-cosi fungoide (Wood, 1992).

Per la descrizione istocitologica e clinica dei *linfomi cutanei a cellule B* contemplati nella classificazione (v. tab. XXXIII), si rinvia ai rispettivi capitoli (coll. **3368, **3372, **3383).

Bibliografia

- Berti E., Cerri A., Cavicchini S. *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 1991, **96**, 718-723.
 Broden S., Bunn P. A., *Seminars in Oncology*, 1980, **7**, 310-331.
 Bunn P. A., Lamberg S. I., *Cancer Treat. Rep.*, 1979, **63**, 725-728.
 Fuks Z. Y., Bagshaw M. A., Farber E. M., *Cancer*, 1973, **32**, 1385-1395.
 Helm K. F., Cerio R., Winkelmann R. K., *J. Cutan. Pathol.*, 1990, **12**, 299.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Lamberg S. I., Green S. B., Byar D. P. *et al.*, *Annals. Intern. Med.*, 1984, **100**, 187-192.
 Macaulay W. L., *Arch. Dermatol.*, 1968, **97**, 23-30.
 Mauri C., *Gli pseudolinfomi*, Atti 29° Congr. Soc. Ital. Ematol., Bologna, 1983, 197-211.
 Musiani P., Lauriola L., Maggiano N. *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1983, **29**, 103-110.
 Vonderheid E. C., Sobel E. L., Nowell P. C. *et al.*, *Blood*, 1985, **66**, 358-366.
 Weinstein M. A., Horn J. W., *J. Amer. Acad. Med.*, 1988, **260**, 42-46.
 Willemze R., Meyer C. J. L. M., Van Vloten W. A., Scheffer E., *Br. J. Haematol.*, 1982, **107**, 131-144.
 Winkler C. F., Bunn P. A., *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 1983, **1**, 49-92.
 Wood G. S., *Benign and malignant cutaneous lymphoproliferative disorders including mycosis fungoides*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 917-952.

2.2.5. LINFOMA EPATO-SPLENICO A CELLULE T_H0

È una rara entità clinica, descritta da Kadin *et al.* (1981) come «*Erythrophagocytic T-γ lymphoma*» e da Farcet e Gaulard (1990) come «*Splenic γδ T-cell lymphoma*». Il quadro clinico ed i reperti istologici sono alquanto simili a quelli della istiocitosi maligna, ma attualmente appare provato che si tratta della proliferazione clonale di una sottopopolazione T-linfocitaria nota come cellule T_H0. Non ben chiariti, anche per l'eseguità della casistica, sono i rapporti con la leucemia T-cellulare a grandi linfociti granulati. Sono noti casi in soggetti sieropositivi per HIV (Ghali *et al.*, 1990).

Il l. colpisce soggetti nel 4°-6° decennio di vita, in prevalenza maschi. Le osservazioni in età infantile sono eccezionali (Garcia-Sanchez *et al.*, 1995). L'esordio è caratterizzato da *febbre*, spiccata *splenomegalia* (in casi splenectomizzati la milza pesava 3000-6500 g) ed *epatomegalia*. Non si riscontrano costantemente linfadenomegalie, né superficiali né profonde. La concentrazione ematica dei globuli rossi e bianchi è normale mentre frequentemente esiste spiccata *piastrinopenia* da ipersequestro splenico (Lin *et al.*, 1991). LDH nella norma. Solo in fase avanzata di malattia si osserva alterazione dei test di funzionalità epatica (in rapporto ad un più profondo coinvolgimento del fegato da parte del l.) e presenza nel sangue di cellule linfoidi atipiche di media o grande taglia (v. sopra *Istologia*). In una parte della casistica è stata riscontrata una *sindrome emofagocitica* (Avinoach *et al.*, 1994).

Si possono ottenere remissioni mediante splenectomia, terapia radiante, alchilanti ed anche con chemioterapia sopramassimale seguita da trapianto midollare, ma le recidive sono costanti. La sopravvivenza varia tra 1-4 anni. Esistono casi di trasformazione di una forma cronica in un tipo acuto simil-blastico, con linfocitosi, a breve ed infausto decorso (Mastovich *et al.*, 1994) ed altri casi con decorso aggressivo fin dall'esordio (Wong *et al.*, 1995).

Bibliografia

- Avinoach L., Hakev S., Arjov S., Sacks M., *Am. J. Dermatopathol.*, 1994, **94**, 915-1005.
 Farcet J. P., Gaulard P., Marolleau J. P. *et al.*, *Blood*, 1990, **75**, 2213-2219.
 Garcia-Sanchez F., Menárguez J., Cristobal E. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1995, **90**, 943-946.
 Gaulard P., Bourquelot P., Kanavaros P. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1990, **137**, 617-628.

- Ghali V., Costella A., Louis-Charles A. *et al.*, *Cancer*, 1990, **65**, 2243-2247.
 Kadin M. E., Kamoun M., Lamberg J., *Br. J. Haematol.*, 1981, **304**, 648-553.
 Lin M. T., Shen M. T., Su I. J. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1991, **78**, 280-282.
 Mastovich S., Rataeh H., Ware R. E. *et al.*, *Human Pathol.*, 1994, **25**, 102-108.
 Wong K. F., Chan J. K. C., Matutes E. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 718-726.

2.2.6. LINFOMA SOTTOCUTANEO PANNICULITICO A CELLULE T

Nello spettro dei l. a T cellule post-timiche a primaria localizzazione cutanea è stata individuata una entità anatomo-clinica, cui la classificazione REAL ha, sia pure in via dubitativa, conferito autonomia dignità nosologica: il l. sottocutaneo di tipo panniculitico a cellule T, studiato soprattutto da Friedman (1945), Aronson (1985), Gonzales (1991). Colpisce maschi e femmine con pari frequenza, in età media di 35 anni (range 19-54).

L'esordio si manifesta invariabilmente con uno o più *noduli sottocutanei*, del diametro di 1-12 cm, situati preferenzialmente alle estremità. La diagnosi clinica (e spesso anche istopatologica) è per lo più quella di panniculite cronica aspecifica benigna o di eritema nodoso o di malattia di Weber-Christian. Le lesioni cutanee, pur essendo dovute ad una neoplasia a cellule T-periferiche (v. sopra, col. **3287), hanno sviluppo strettamente locale e non tendono a disseminarsi in forma sistemica né a dare localizzazioni d'organo. Il decorso è di solito per qualche tempo indolente. Alle manifestazioni locali si associa tuttavia costantemente, talora fin dall'esordio cutaneo talaltra a distanza di 2-5 anni, una *sindrome emofagocitica* larvata o florida, ad opera di macrofagi reattivi non neoplastici, spesso a carattere aggressivo e scarsamente sensibile alla chemioterapia antitumorale, che può portare a morte il paziente con un quadro di *pancitopenia*.

La *diagnosi differenziale* dev'essere posta nei confronti di vari tipi di panniculite (eritema nodoso, eritema induratum, malattia di Weber-Christian, panniculite benigna citofagica di Alegre e Winkelmann) e di sindromi immunoproliferative angiocentriche, nonché di vari l. cutanei a cellule T-periferiche mature (Jaffe *et al.*, 1983; Isaacson e Norton, 1994).

Bibliografia

- Alegre V. A., Winkelmann R. K., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1989, **20**, 177-185.
 Aronson I. K., West D. P., Variakojis F. *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 1985, **112**, 87-96.
 Fahn B., Pileri S., De Solas I. *et al.*, *Blood*, 1990, **75**, 434-444.
 Friedman N. B., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1945, **39**, 42-46.
 Gonzalez C. L., Medeiros L. J., Brazier R. M., Jaffe E. S., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1991, **15**, 17-27.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 131.
 Jaffe E. S., Costa P., Fauci A. S. *et al.*, *Am. J. Med.*, 1983, **75**, 741-749.

2.2.7. LINFOMA A CELLULE LINFOEPITELIODEI (LINFOMA DI LENNERT)

Il «l. a cellule linfoepiteliodi» descritto da Lennert e Mestdagh (1968) è un l. a basso grado di malignità. Per la sua posizione nosografica v. col. **3277. Si presenta preferenzialmente in età avanzata (massima incidenza nel 7° decennio di vita, range 21-87 anni) e in entrambi i sessi (M/F = 1,3).

Già all'esordio la malattia appare largamente diffusa (stadio IV). Frequenti sono i sintomi generali. Si osservano precocemente molteplici *linfadenomegalie* superficiali e profonde (retroperitoneali), che assumono rapido sviluppo e possono provocare sintomi di ostruzione linfatica. Una rilevante *splenomegalia* può costituire talora il sintomo principe all'esordio. È comune reperire *epatomegalia*, coinvolgimento dell'anello di Waldeyer e soprattutto delle *tonsille* palatine. Nel 18% dei casi esiste prurito. Il midollo osseo presenta infiltrazione linfomatosa di varia entità, spesso senza rilevanti alterazioni citologiche del sangue periferico.

La *prognosi* è variabile da caso a caso. Di solito il decorso si presenta aggressivo, con eccezioni, rappresentate soprattutto dai casi

a cellule T CD4+, in cui il processo morboso appare vivacemente progressivo.

Bibliografia

- Feller A. C., Griesser G. M., Mak W., Lennert K., *Blood*, 1986, **68**, 663-667.
 Lennert K., Feller A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*, 1992, Springer, Berlin.
 Lennert K., Mestdagh J., *Virchow's Arch. Pathol. Anat.*, 1968, **344**, 1-20.
 Nathwani B. N., Brynes R. K., Lincoln T. et al., *Classification of Non-Hodgkin's Lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 555-601.

2.2.8. LINFOMA ANGIOIMMUNOBLASTICO

Premessa

Il l. angioimmunoblastico è un disordine linfoproliferativo alquanto insolito e di non facile interpretazione: rappresenta verosimilmente l'espressione compiutamente maligna di un processo evolutivo *multistep* noto come *linfadenopatia angioimmunoblastica* (AIL), in cui la demarcazione cronologica tra fase reattivo-immunologica e fase neoplastica appare difficilmente precisabile (v. coll. **3289-3291).

Colpisce soggetti di entrambi i sessi (rapporto M/F = 1,5/1) in età avanzata (per l'80% nel 6°-7° decennio di vita) senza risparmiare peraltro età più giovanili e la seconda infanzia (Frizzera, 1992).

Quadro clinico

Solitamente il processo morboso esordisce in *forma acuta* con sintomi generali, talvolta a seguito di esposizione a stimoli allergici (farmacologici) o virali: febbre elevata di tipo continuo, remittente o intermittente, sudorazione profusa, senso di prostrazione, calo ponderale, prurito. Compaiono precocemente epatosplenomegalia, *rash* cutanei, linfadenomegalie, edemi al viso e alle estremità superiori, infezioni. In altri casi, invece, la malattia presenta *sviluppo lento e graduale*, con decorso clinico fluttuante e sintomatologia generale talora incompleta: si manifestano modica epato- e splenomegalia, costanti *linfadenomegalie* polistazionali superficiali e profonde (retroperitoneali, raramente mediastiniche). I linfonodi non raggiungono mai dimensioni cospicue, sono spesso dolenti, non tendono a confluire in pacchetti, presentano spontanee e repentine variazioni volumetriche.

Abbastanza frequente, e spesso precoce, è il *coinvolgimento extralinfonodale*. Si può osservare interessamento dell'apparato respiratorio con dispnea, tosse stizzosa; gli esami radiologici documentano immagini di polmonite interstiziale o di infiltrazione alveolare, oppure versamenti pleurici mono- o bilaterali (con linfoplasmaciti e immunoblasti nel sedimento). Segni di insufficienza respiratoria possono palesarsi talora già all'esordio di malattia. Il coinvolgimento della *cute* è contrassegnato da prurito, esantemi maculo-papulosi, infiltrazioni nodulari o a placche, edemi di tipo angioneurotico. Più insoliti sono i *disturbi digestivi* (talora di tipo emorragico), le complicazioni *oculari* (uveite, corioretinite), *nervose* (poliradicoloneuriti tipo Guillain-Barré, leptomeningite) e *articolari* (poliartralgie da sinovite). Vi può essere *ipercalcemia* (Knecht, 1989).

I *reperti ematici* sono caratterizzati da modesta *anemia* dovuta ad eritropoiesi inefficace, talora di tipo emolitico autoimmune (Coombs positivo), da *leucocitosi* non rilevante con neutrofilia ed eosinofilia (e spesso con aumento dei basociti), da *linfopenia* assoluta con presenza in circolo di linfoplasmaciti ed immunoblasti. I prelievi biotici del midollo osseo offrono reperti variabili in rapporto soprattutto con la natura dell'anemia: è frequente l'infiltrazione linfoplasmatocitica, plasmacellulare e/o immunoblastica, di varia entità. Caratteristico è il reperto di *iperimmunoglobulinemia policlonale* con prevalente aumento delle IgG. In rari casi si nota in fasi avanzate di malattia una componente monoclonale, IgM o IgG

(Klajman et al., 1981). In circolo si rinvencono spesso immunocomplessi (ICC) in elevata concentrazione.

Decorso

Il *decorso* è molto vario, talora rapidamente aggressivo con mortalità superiore al 60%; altre volte di tipo più indolente, con episodi di recrudescenza dominabili con adeguata terapia (i pazienti sono spesso sensibili ai cortisonici e/o ai citostatici e/o all'interferone). Il processo può essere complicato da infezioni intercorrenti, anche gravi, causa di decesso nel 62% dei casi. I soggetti con AIL possono andare incontro a processi tumorali di natura diversa (malattia di Hodgkin, sarcoma di Kaposi, carcinomi) (Toninai et al., 1988).

Con frequenza varia a seconda delle casistiche (tra 0 e 35%) si può osservare lo sviluppo conclamato di un l. a cellule T periferiche (raramente a cellule B) (Nathwani et al., 1978). Tale AIL-like T cell lymphoma presenta il quadro clinico di un l. *de novo* con plurime localizzazioni linfonodali superficiali e soprattutto profonde addominali, associate a coinvolgimento extralinfonodale (milza, fegato, polmoni in primo luogo) ed a rilevante compromissione delle condizioni generali. Il decorso è in genere aggressivo, con cattiva risposta alle terapie ed esito infausto entro un anno dall'accertata trasformazione.

Bibliografia

- Frizzera G., *Atypical lymphoproliferative disorders*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Klajman A., Yaretzky A., Schneider M. et al., *Cancer*, 1981, **48**, 2433-2437.
 Knecht H., *Semin. Hematol.*, 1989, **26**, 208-215.
 Nathwani B. N., Rappaport H., Moran E. M. et al., *Cancer*, 1978, **41**, 578-606.
 Pinkus G. S., Said J. W., *Peripheral T cell lymphomas*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 837-867.
 Toninai K., Minato K., Ohtan T. et al., *Blood*, 1988, **72**, 1000-1006.

2.2.9. LINFOMA ANGIOCENTRICO

Premessa

Il l. angiocentrico-angiodistruttivo colpisce ambo i sessi (più frequentemente quello maschile) ed ogni età, dall'infanzia all'estrema vecchiaia, ma prevale tra i 30-60 anni. Sono stati descritti casi correlati a carcinomi, a morbo celiaco, a precedenti forme di «vasculite linfocitica benigna» o di polmonite interstiziale o di anemia emolitica autoimmune ad epatiti croniche, colite ulcerosa, sarcoidosi, fibrosi retroperitoneale: tuttavia il più delle volte il l. angiocentrico ha esordio e decorso autonomo. Insolito è il coinvolgimento dei linfonodi, a differenza della maggior parte dei LNH, ed invece si nota particolare predilezione per localizzazioni *extralinfonodali* mono- o pluricentriche: polmoni, tratto aerodigestivo superiore, cute, S.N.C., reni. Il processo tende talora a localizzarsi in una sola sede, ma è raro che la cute ne rappresenti l'unica, essendo di solito associata ad un'altra lesione, soprattutto ai polmoni o al naso (con vario ordine di precedenza). Anche la localizzazione primaria polmonare è spesso precocemente seguita da disseminazione in altri organi. Clinicamente il l. è pertanto poliedrico e dà luogo a quadri sintomatologici assai diversi in rapporto alle sedi colpite.

Forme cliniche

La forma clinica più frequente è quella *polmonare*, che comprende buona parte della casistica indicata in passato come «*granulomatosi linfomatoide*» (Liebow et al., 1972). Il quadro clinico comporta febbre, astenia, calo ponderale, dispnea, tosse con escreato purulento o emorragico, dolore toracico, artalgie. L'esame radiologico del torace mostra

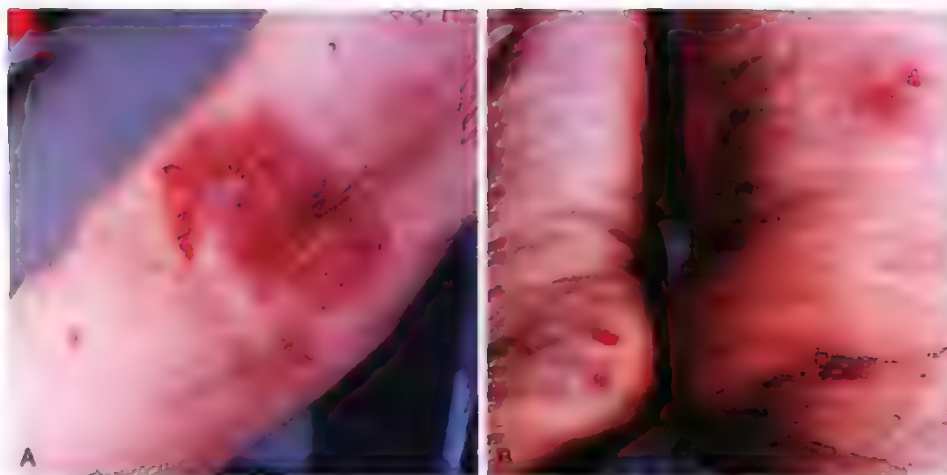


Fig. 85 Granulomatosi linfomatoide. Varia morfologia delle lesioni cutanee. A) Lesioni infiltrativo-nodulari alla piega del gomito. B) Noduli isolati alle gambe ed ai piedi.

infiltrati reticolari e/o nodulazioni multiple dei polmoni (spesso bilaterali), tendenzialmente confluenti in masse tumorali; si riscontra talora versamento pleurico. Insolite sono le linfadenomegalie ilari.

Le lesioni cutanee sono di tipo nodulare (a sede dermica o sottocutanea), talora di consistenza lignea e spesso ulcerate, oppure di tipo maculo-papuloso o eritematoso (Chan *et al.*, 1989) (fig. 85). Sono isolate o pluridistrettuali (anche simmetriche), localizzate alla fronte, alla faccia, al tronco. Possono talvolta precedere di mesi o anni le manifestazioni polmonari (Katzenstein *et al.*, 1979), persistere od anche scomparire spontaneamente. Le forme di tipo panniculitico comportano solitamente presenza di grandi linfociti granulati (LGL) a granuli azurofilici, che esprimono marker NK (CD56), IL-2 β R e perforina (Takeshita *et al.*, 1995).



Fig. 86. L. angiocentrico. TC, massiccio facciale. Completa oblitterazione del seno mascellare sinistro da parte di una massa linfomatosa lievemente disomogenea. Analogo tessuto occupa le cellule etmoidali, le fosse nasali ed il palato.

Le manifestazioni neurologiche comprendono segni di interessamento encefalico (confusione mentale, atassia, emiparesi), dei nervi cranici (paralisi di Bell, diplopia, amaurosi transitoria, ipoacusia, vertigini) e periferici (parestesie, solitamente agli arti inferiori).

Localizzazioni autonome epato-spleniche, con organomegalia, non sono frequenti. Non insolite sono invece le localizzazioni al tubo digerente ed al testicolo. Frequente e grave è la sindrome emofagocitica (Jaffe *et al.*, 1996).

Le forme denominate «lethal midline granuloma» tipo Stewart (1933) (o reticolosi polimorfa o l. della linea mediana), ora interpretate come espressioni di l. T-periferico angiocentrico (DeRemee *et al.*, 1978; Chott *et al.*, 1988), sono assai caratteristiche per la localizzazione degli infiltrati linfomatosi a tutta l'area medio-facciale, alle cavità nasali ed ai seni paranasali, talora estesi ad aree del tratto aero-digestivo superiore (fig. 86). Si presentano con dolorose ulcerazioni devastanti le strutture osteocartilaginee dei turbinati, del palato duro e del setto nasale, ed hanno decorso aggressivo.

Prognosi

La prognosi è riservata o infausta in rapporto alla variabile aggressività del processo. L'associazione di lesioni cutanee a quelle in altre sedi è sempre indice di decorso aggressivo, e nel 60% dei casi comporta sopravvivenza non superiore ai due anni; vi sono però casi con particolare sensibilità alla chemioterapia antitumorale che possono andare incontro a buone remissioni. In linea generale la sopravvivenza è del 63% a 5 anni, del 50% a 15 anni (Strickler *et al.*, 1994).

Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale va posta nei confronti di altri LNH a cellule T; in particolare della micosi fungoide/sindrome di Sézary e della papulosa linfomatosa (v. sopra) e del raro l. angiotropico a grandi cellule. Il l. della linea mediana dev'essere differenziato soprattutto dal granuloma della linea mediana tipo Wegener, con cui presenta analogie cliniche: ne è distinguibile per le caratteristiche istologiche dell'infiltrato, che nella forma tipo Wegener presenta numerose cellule giganti plurinucleate, assenti nella forma tipo Stewart.

Linfoma angiotropico a grandi cellule

Presenta qualche assonanza clinica con il l. angiocentrico ma se ne distingue per i reperti istopatologici. Il l. colpisce soggetti con ampio range di età preferenzialmente nel settimo decennio. Insorge spesso con sintomi generali B e può avere plurime localizzazioni.

Nella cute si possono osservare noduli, placche (anche ulcerate) con espressioni teleangiectasiche. Il S.N.C. è spesso interessato con manifestazioni varie: stato di confusione mentale, debolezza muscolare, afasia, emianopsia, amaurosi. La localizzazione, non rara, è bilaterale, nei surreni comporta organomegalia e segni di insufficienza funzionale corticosurrenalica, che talora rappresentano la fenomenologia d'esordio del l. (Chu *et al.*, 1996). La lesione dei reni può provocare una sindrome nefrosica. Si osserva spesso cospicua ipertrigliceridemia. Alquanto insolito è il coinvolgimento di linfonodi, milza, fegato, midollo osseo, sangue periferico, almeno per buona parte del decorso (Sheihani *et al.*, 1986; Stroup *et al.*, 1990). Una sindrome di coagulazione intravasale disseminata può complicare il decorso.

Il più delle volte il l. angiotropico costituisce un processo *de novo*, raramente è secondario ad altro LNH. L'esame istologico dimostra che tutti gli organi possono presentare infiltrazione linfomatosa, anche se clinicamente silente. Patognomonicamente è il reperto di una distensione dei capillari, venule ed arteriole da parte di fitti aggregati intravasali di elementi linfoidi blastici pleomorfi, con possibili fenomeni infartuali. Nei linfonodi le cellule linfomatose occupano i sinusoidi, non mostrano alcuna tendenza a superare la parete vasale e non infiltrano il parenchima finitimo. Le cellule presentano solitamente fenotipo B maturo, con sIgM o D monotipiche; CD5 e CD10 negativi; eccezionale è il fenotipo T (Isaacson e Norton, 1994). La prognosi è infausta, benché siano stati segnalati casi notevolmente sensibili alla chemioterapia antitumorale.

Bibliografia

- Chan J. K. C., Sin V. C., Ng C. S., Lau W. H., *Pathology*, 1989, **21**, 164-168.
 Chott A., Rappersberger K., Schlossarek W., Radaskiewicz T., *Human Pathol.*, 1988, **19**, 1093-1101.
 Chu P., Costa J., Lachman M. F., *Human Pathol.*, 1996, **27**, 209-211.
 De Remee A. A., Weiland L. H., McDonald T. J., *Mayo Clin. Proc.*, 1978, **53**, 634-640.
 Grange C., Cabane J., Dubois A. *et al.*, *Medicine*, 1992, **71**, 179-196.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal Lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Jaffe E. S., Chan J. K. C., Su I. J. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 102-111.
 Katzenstein A. L. A., Carrington C. H. B., Liebow A. A., *Cancer*, 1979, **43**, 360-373.
 Khan S. M., Bailey I. S., Addis B. J., *Histopathology*, 1991, **19**, 96-98.
 Liebow A. A., Carrington C. D., *Med. Clin. North. Amer.*, 1973, **57**, 809-843.
 Liebow A. A., Carrington C. D., Friedmann P. J., *Human Pathol.*, 1972, **3**, 457-458.
 Mauri C., *Gli pseudolinfomi*, Atti 29° Congr. Naz. Soc. It. Ematologia, 1983, 197-211.
 Nakamura S., Suchi T., Koshikawa T., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1995, **19**, 284-296.
 Sheihani K., Battifora M., Winberg C. D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1986, **314**, 943-948.
 Stewart J. P., *J. Laryngol.*, 1933, **48**, 657-701.
 Strickler J. G., Meneses M. F., Habermann T. M. *et al.*, *Human Pathol.*, 1994, **25**, 659-665.
 Stroup R. M., Sheihani K., Moncada A. *et al.*, *Cancer*, 1990, **66**, 1781-1788.
 Takeshita M., Akamatsu M., Ohshima K. *et al.*, *Human Pathol.*, 1995, **26**, 1321-1328.

2.2.10. LINFOMA PRIMITIVO INTESTINALE A CELLULE T ASSOCIATO AD ENTEROPATIA

Introduzione

L'*Intestinal T-cell lymphoma (enteropathy associated)* (EATL) può insorgere in corso di *malattia celiaca* dell'adulto (v. CELIACHIA**) già decorrente da tempo o di recente sviluppo od anche in fase latente asintomatica ed ignorata, oppure in soggetti affetti da *dermatite erpetiforme* (v.; o *malattia di Duhring*, vol. IV, 2217-2222), una dermatite bollosa polimorfa talvolta associata ad alterazioni latenti o subcliniche dell'intestino tenue, affini alla *malattia celiaca* per caratteristiche istologiche e funzionali. L'EATL complica la *malattia celiaca* in circa il 7% dei casi, con latenza assai variabile da caso a caso (*range* 3-20 anni). Colpisce ambedue i sessi con pari frequenza, per lo più nel 6°-7° decennio di vita, occasionalmente in età più giovanile.

Quadro clinico

La più frequente modalità di esordio consiste in una ricomparsa di disturbi di malassorbimento e di dolori addominali in soggetto con *malattia celiaca* in remissione a seguito di appropriata dieta. Vi sono però casi, in cui la scena clinica viene aperta — in un soggetto senza pregressi disturbi digestivi — da una improvvisa grave sindrome di malassorbimento non responsiva a dieta priva di glutine oppure da un quadro di addome acuto a seguito di perforazione od occlusione intestinale. La *malattia* può anche presentarsi come *digiunite ulcerativa*, che può talvolta non avere alcun rapporto con processi linfomatosi: decorre in forma subdola, prolungata, con grave malassorbimento e formazione di processi ulcerativi e/o stenotici.

Il l. può insorgere in ogni tratto del tenue o di altri sezioni del tratto gastrointestinale, ma preferenzialmente nel digiuno, e può essere mono o plurifocale. Non rimane circoscritto alla localizzazione intestinale ma tende a propagarsi al mesentere ed ai linfonodi mesenterici e a disseminarsi al fegato, alla milza, al polmone, alla cute ed al midollo osseo. Talora è una di queste localizzazioni a predominare nel quadro clinico ed il l. intestinale, in fase asintomatica o subclinica, può apparire quale evento secondario.

Prognosi

La progressione del quadro morboso è spesso del tutto sfavorevole. Nei casi circoscritti al tenue, ampi interventi di exeresi intestinale possono essere seguiti da prolungate remissioni. Terapia radiante e chemioterapia antitumorale non sono in grado di produrre effetti eradicanti.

Bibliografia

- Chott A., Dragosics B., Radaskiewicz T., *Am. J. Pathol.*, 1992, **141**, 1361-1371.
 Isaacson P. G., *Gastrointestinal lymphomas and lymphoid hyperplasias*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 953-978.
 Isaacson P. G., Norton A., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 55.

2.2.11. LINFOMA/LEUCEMIA DELL'ADULTO A CELLULE T

Introduzione

Il retrovirus HTLV-I (v. sopra *Etiologia*) è l'agente causale della *Adult T cell lymphoma/leukemia* (ATLL; v. LEUCEMIE*, Agg. I, coll. *4518-4522), probabilmente anche di alcuni l. cutanei a cellule T e forse della mielopatia HTLV-I associata (HAM) o paresi spastica tropicale (TSP): ancora scarse sono tuttavia le informazioni circa la storia naturale dell'infezione e circa il ruolo di eventuali cofattori nell'indurre l'uno o l'altro evento morboso (Watanabe *et al.*, 1992). Quale eccezionale evenienza è stata segnalata una forma per ogni altro aspetto analoga all'ATLL ma non associata all'HTLV-I (Shimoyama *et al.*, 1987). Per il singolare cluster geografico presentato dal l., v. sopra *Epidemiologia*, col. **3203.

La trasmissione dell'HTLV-I avviene verosimilmente solo per la via perinatale (allattamento) e sessuale. Il tasso di sieroconversione progredisce lentamente dalla nascita all'adolescenza e tocca il culmine verso i 50 anni, ed anche oltre, in donne. Il l. ha un lungo periodo di latenza e la sua incidenza tra i portatori di HTLV-I è bassa (0,5%) (Tajima e Kuroishi, 1985). È stato calcolato che per lo sviluppo della linfomagenesi è necessaria una serie di almeno 5 eventi diversi e indipendenti (Okamoto *et al.*, 1989). Probabilmente solo i portatori infettati alla nascita arrivano a sviluppare la forma leucemica (Watanabe *et al.*, 1992).

La neoplasia viene riscontrata in entrambi i sessi con pari frequenza, ad un'età media di 56 anni (*range* 30-67) in Giap-

pone, di 45 anni nei Caraibi. Eccezionale è l'esordio clinico in età pediatrica.

Quadri clinico-ematologici

L'ATLL può presentare disparati quadri clinico-ematologici, con diverso decorso. Shimoyama *et al.* (1979) e Yamaguchi *et al.* (1983) ne contemplano 4 tipi principali (tab. XXXV).

Forma acuta/subacuta

È di gran lunga la più frequente (55-75% dei casi). Di tipo eminentemente leucemico, comporta leucocitosi di varia entità (in genere non inferiore a $25 \times 10^9/L$, talora con valori superiori a $400 \times 10^9/L$), con massiva presenza di elementi linfoidei dalla tipica iperlobulazione nucleare («flower cells») (v. col. **3297). L'espressione leucemica non è in rapporto a coinvolgimento del midollo osseo (insolito e sempre modesto) ma trae origine da localizzazioni extramidollari. La sintomatologia d'esordio è quella consueta delle leucemie acute (febbre, anemia, piastrinopenia, manifestazioni emorragiche) e frequenti sono le linfoadenomegalie superficiali e profonde (mediastiniche, retroperitoneali), l'epatosplenomegalia, rash o lesioni infiltrative cutanee, nonché coinvolgimento infiltrativo dei polmoni, del tratto gastrointestinale e del S.N.C. Costanti sono l'elevata concentrazione ematica di LDH ($> 1000 U/L$) e l'ipercalcemia ($> 6,0 mEq/L$) con ipercalcemia. La malattia è rapidamente progressiva, in genere scarsamente responsiva alla chemioterapia antineoplastica, e si conclude fatalmente nel giro di pochi mesi.

Forma cronica

Si riscontra nel 5% dei casi. Può presentare anch'essa leucocitosi, ma più modesta, con minore atipia delle cellule linfoidei circolanti, minore quantità di «flower cells» ed invece prevalenza di piccoli linfociti simili a quelli reperiti nella CLL. Il quadro clinico è paucisintomatico, l'organomegalia (linfonodi, milza, fegato) poco rilevante, le lesioni cutanee non sono sempre presenti, mancano tipicamente l'ipercalcemia e l'aumento della LDH. Il decorso presenta lenta progressione; la sopravvivenza può toccare alcuni anni.

Forma «linfomatosa»

Rappresenta il 15-20% dei casi (Takahashi *et al.*, 1988). Comporta caratteristicamente, all'esordio, lo sviluppo circoscritto di masse linfo nodali, ma ben presto le linfoadenomegalie assumono sviluppo sistemico, mentre epato-splenomegalia e lesioni cutanee sono abitualmente assenti. In alcuni casi si osserva più o meno precocemente la leucemizzazione del processo. Il decorso è più aggressivo della forma cronica comune e la sopravvivenza è solitamente di 1-2 anni.

Forma «smoldering»

È tipicamente indolente, a lentissima progressione. Assume aspetti clinici diversi in rapporto alla preminente localizzazione del l.

Il sottotipo cutaneo mostra esclusivamente lesioni della cute, in parte di natura non neoplastica (dermatofitosi, infezioni virali) e in parte a placche o a noduli assai simili a quelli propri della micosi fungoide. Solo le manifestazioni di tipo papuloso vengono considerate specifiche della ATLL (la papulosa linfoematosa si differenzia per il diverso reperto istologico).

Il sottotipo polmonare comporta reperti clinici e radiologici molto vicini a quelli del l. angiocentrico/granulomatoso linfoematosa (v. col. **3293 e **3410).

I sottotipi «iniziali» e «pre-ATL» rappresentano i prodromi paucisintomatici del l. dopo la fase d'esordio biologico e la latenza pre-clinica asintomatica o associata soltanto a modeste alterazioni ematologiche. Il decorso è in genere prolungatissimo.

Si ritiene che nella patogenesi delle multiforme espressioni cliniche della ATLL giochino due gruppi di fattori: 1) una varia interazione di citochine, quali IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, TNF, linfo-sina, vimentina, sCD30, disregolate a causa della transattivazione dei geni cellulari associata all'infezione di HTLV-I (Greenberg *et al.*, 1990); 2) una compromissione delle risposte immunologiche sia umorali che cellulari, testimoniate anche dalle frequenti e gravi infezioni opportunistiche, causa di decesso nel 50% dei pazienti affetti da ATLL (Watanabe *et al.*, 1992).

Bibliografia

- Catovsky D., Foa R., *The lymphoid leukaemias*, 1990, Butterworth, London, pp. 218-252.
Greenberg S. J., Tendler C. L., Mann A. *et al.*, *Altered cellular gene expression in human retroviral-associated leukemogenesis*, in Bladder W. A. ed., *Human retrovirology. HTLV*, 1990, Raven Press, New York, pp. 87-104.
Okamoto T., Ohno Y., Tsugane S. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1989, 80, 191-195.
Shimoyama M., Kagami Y., Shimotomo K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, 83, 4524-4528.
Shimoyama M., Minato K., Saito H. *et al.*, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1979, 9 (Suppl. 1), 257-372.
Tajima K., Kuroishi T., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1985, 15, 423-430.
Takahashi K., Tanaka T., Fujita M. *et al.*, *Arch. Dermatol.*, 1988, 124, 399-404.
Watanabe S., Kiyoshi M., Shimoyama M., *Adult T cell Leukemia/Lymphoma*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1281-1294.
Yamaguchi K., Nishimura H., Kohrogi H. *et al.*, *Blood*, 1983, 62, 758-766.

2.2.12. LINFOMA A GRANDI CELLULE ANAPLASTICHE CD30 POSITIVE (A CELLULE T O NULL)

Introduzione

Il l. a grandi cellule anaplastiche a cellule T (o «null») CD30 positive (ALCL) rappresenta una entità anatomo-clinica, caratterizzata da grandi cellule a particolare morfologia, a fenotipo T (o, in qualche caso, «null»), e da costante

TAB. XXXV. FORME ANATOMO-CLINICHE DEL LINFOMA/LEUCEMIA DELL'ADULTO A CELLULE T

(da Watanabe S. *et al.*, 1992, modificata)

Forma	Frequenza (%)	Leucocitosi		Rash cutaneo	Linfoadenomegalia	Epatosplenomegalia	Ipercalcemia Elevata LDH	Sopravvivenza (anni)
		flower cells	CLL-like					
Acuta/subacuta	55-75	+++	-	+/	+	++	+++	< 1
Cronica	5-15	+	+++	+/	+	+	-	1-5
«Linfomatosa»	15-20	+/	-	-	+++	-	-	1-2
«Smoldering»	?							
tipo cutaneo		+	++	+++	-	-	-	> 10
tipo polmonare		-	+/	-	-	-	-	alcuni
tipo iniziale		-	-	-	+	-	-	alcuni
Pre-ATL		-	-	-	-	-	-	≥ 10
Portatori (sieronegativi)		-	-	-	-	-	-	talora evoluzione leucemica tardiva

* occasionalmente sono reperibili in circolo cellule linfoidei con modesta atipia (alcune leggermente megaliche)

presenza dell'antigene di attivazione CD30 (Ki-1). Si differenzia sotto vari aspetti dai l. a grandi cellule di linea B (v. coll. **3259 e **3299). È generalmente una forma ad alta malignità, con eccezioni (v. oltre). Può insorgere come neoplasia *primaria* (*de novo*) oppure come neoplasia *secondaria*, che può coesistere *ab initio* con un altro istotipo di l. o manifestarsi entro 3 mesi dalla diagnosi di quello oppure sovrapporsi a varia distanza di tempo ad una malattia di Hodgkin o, più spesso, ad un LNH di linea T (micosi fungoide, papulosi linfomatoide, linfoma angiocentrico, l. linfopiteliale di Lennert, etc.) od anche di linea B. La modalità più frequente d'insorgenza è la prima, e può interessare l'apparato linfonodale e più spesso sedi extralinfonodali.

T-ALCL CD30+ primario

È notevolmente frequente, e tra i l. primari cutanei a cellule T rappresenta ben il 35% dei casi (Beljaards *et al.*, 1989). È del doppio più frequente nel sesso maschile che nel femminile, e la sua distribuzione per età è di tipo bimodale, con un picco nel secondo decennio ed un altro nel sesto (mediana circa 30 anni, con range 8-73, e con maggiore affluenza di casi tra 8-30 anni). Incide pertanto, notevolmente anche nell'età *infanto-giovanile*, dove rappresenta circa il 10% di tutti i LNH che si manifestano in età pediatrica.

Nel 30-40% dei pazienti l'esordio è contraddistinto da segni e sintomi generali (febbre, sudorazione, astenia, calo ponderale) e in circa il 70% dei casi appare in stadio I-II, con precoci *localizzazioni linfonodali*, superficiali (sopra- o sottodiaframmatiche, spesso non contigue) e/o profonde (stazioni para-aortiche e iliaco-inguinali, mentre la localizzazione mediastinica è presente in meno del 20% dei casi, con frequenza tuttavia superiore a quella offerta dai l. a grandi cellule di linea B). Comuni sono però anche le *localizzazioni extralinfonodali*, che spaziano — a seconda delle statistiche — tra il 25 ed il 60% dei casi (l'incidenza è maggiore nei pae-

si orientali). Le localizzazioni extralinfonodali riguardano in primo luogo la cute, specie nell'infanzia, mentre il l. a grandi cellule B predilige sedi viscerali (Shulman *et al.*, 1993).

I *linfonodi* non hanno inizialmente dimensioni cospicue ma tendono ben presto a confluire. La cute sovrastante, infiltrata, può ulcerarsi. Le *lesioni cutanee* sono singole o multiple e per lo più a tipo papula o nodulo (fig. 87) e facilmente ulcerano; possono però anche presentare risoluzione spontanea, probabilmente mediata dal TGF β (Kadin *et al.*, 1990). Tra le altre localizzazioni extralinfonodali, particolare rilievo assumono quelle al *tratto gastrointesti-*

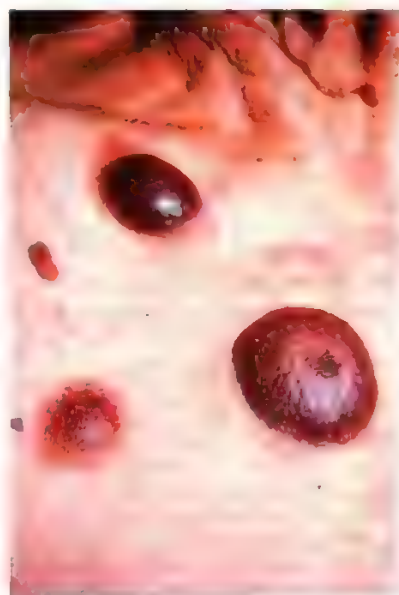


Fig. 87. LNH-T a grandi cellule anaplastiche. Localizzazione cutanea al torace anteriore, in forma di grossi noduli violacei, duri.

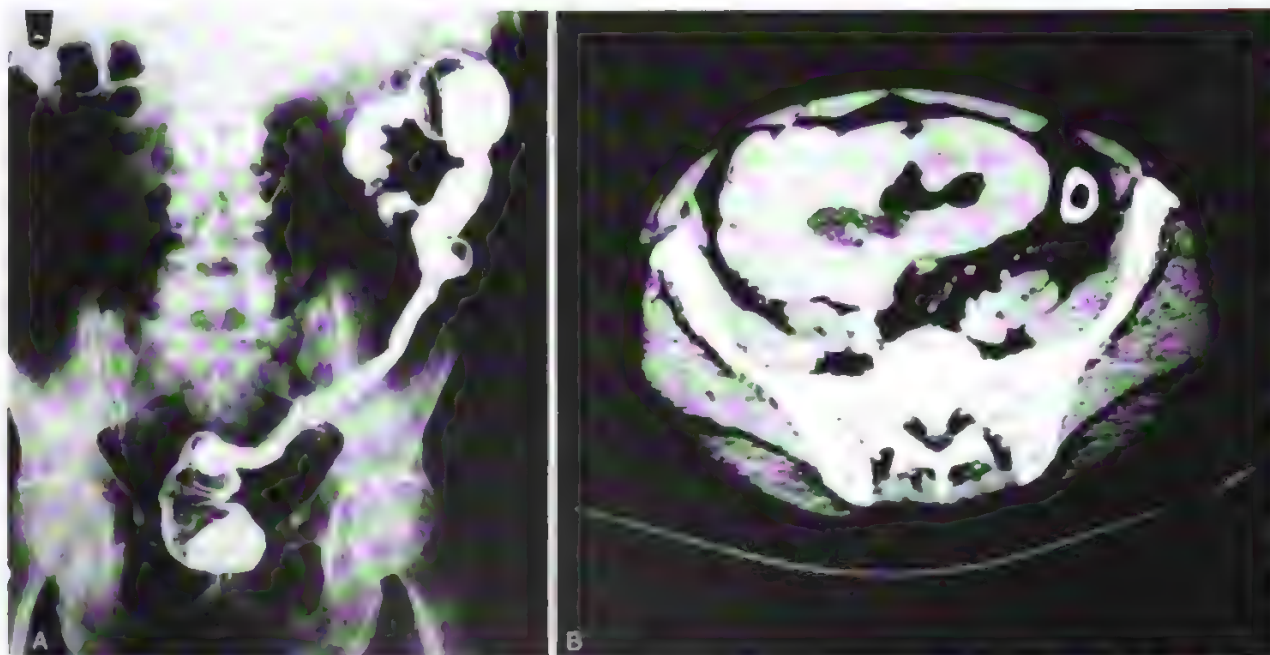


Fig. 88. LNH-T a grandi cellule anaplastiche. A) Clisma opaco. Il mezzo di contrasto si arresta poco oltre l'angolo colico di sinistra. B) TC, addome. Una voluminosa massa densa occupa lo scavo pelvico di destra; ingloba ceco, colon ascendente, trasverso e ileo terminale. Modeste linfoadenomegalie mesenteriche.

nale (fig. 88), alla *pleura* (con cospicui versamenti emorragici), all'apparato scheletrico (con aree osteolitiche), ai tessuti molli. Midollo osseo, milza, fegato, rinofaringe sono coinvolti più raramente. Estremamente inconsueti sono i casi con *fase leucemica*, cospicua leucocitosi e forte componente di cellule linfomatose in circolo (Anderson *et al.*, 1996). Eccezionali sono i casi di compromissione del S.N.C., talora con il quadro della leucoencefalopatia progressiva (Provinciali *et al.*, 1988) o della leptomeningosi infiltrativa (Grove *et al.*, 1993).

La malattia presenta *progressione* più o meno rapida a seconda dei casi (Paulus *et al.*, 1994), in genere più vivace e aggressiva che negli ALCL a cellule B (Coiffer *et al.*, 1990), ma il l. è notevolmente sensibile al trattamento chemioterapico. Vi sono casi, specie nell'infanzia e con prevalenti o isolate lesioni cutanee (stadio IE), che possono andare incontro a lunga sopravvivenza dopo RC terapeutica. In casi pediatrici la sopravvivenza a 5 anni supera il 70% (Murphy *et al.*, 1994).

Del particolare quadro clinico offerto dalla variante «ALCL ricca di granulociti neutrofili» si è già detto a suo luogo (v. col. **3301).

T-ALCL CD30+ secondario

Viene osservato meno frequentemente della forma primaria, talora in soggetti immunodepressi per trapianto d'organo e affetti da AIDS (Griffith *et al.*, 1990). Insorge in età più avanzata (mediana in 5° decennio) e con nettissima prevalenza del sesso maschile (M/F = 3,5/1). Molto frequenti sono i sintomi generali e le localizzazioni extralinfonodali (in specie cutanee) e vi è pure maggiore incidenza di infiltrazione neoplastica del midollo osseo (35% dei casi vs. 15% nelle forme primarie), il che contribuisce alla collocazione all'esordio in stadio IV.

Il l. è particolarmente aggressivo e meno sensibile a trattamenti chemioterapici in confronto alla forma primaria. Si ottengono poche RC complete e durature, sia che l'ALCL sia secondario alla malattia di Hodgkin che ad un LNH. La sopravvivenza mediana non supera i 2 anni (Stein e Dallenbach, 1992).

Bibliografia

- Anderson M. M., Ross C. W., Singleton T. P., *Human Pathol.*, 1996, 27, 1093-1095.
 Beljaards R. C., Meijer C. J. L. M., Scheffer E., *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1989, 135, 1169-1178.
 Coiffer B., Brausse N., Peuchmaur M., *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1990, 1, 45-50.
 Griffith R. C., Sato B. K., Janney C. M., *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990, 93, 280-285.
 Grove A., Vyberg M., *J. Neuropathol.*, 1993, 12, 7-12.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Kadin M. E., Cavaille-Coll N. W., Morton C. C., *Blood*, 1990, 76, 354.
 Murphy S. B., *Ann. Oncol.*, 1994, 5 (Suppl. 1), 31-34.
 Paulus W., Ott M., Stri K. H., *et al.*, *Human Pathol.*, 1994, 25, 1253-1256.
 Provinciali L., Signorino M., Ceravolo G., Pasquini U., *Ital. J. Neurol. Sci.*, 1988, 9, 377-381.
 Shulman L., Frisard B., Autin J. H., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11, 937-943.
 Stein H., Dallenbach F., *Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 675-714.

CARLO MAIRI

NEOPLASIE DELLE CELLULE MONOCITO-MACROFAGICHE E DELLE RETICOLARI DENDRITICHE

SOMMARIO

INTRODUZIONE	col. 3419
NEOPLASIE DEL SISTEMA MONOCITO-MACROFAGICO	col. 3421

Istiocitosi maligna e linfoma istiocitico vero (col. 3421): *Reperiti istiocitologici*. - *Quadro clinico*. - *Decorso*. - *Diagnosi differenziale*.

NEOPLASIE DEL SISTEMA RETICOLARE DENDRITICO col. 3423

Sarcoma delle cellule dendritiche follicolari (col. 3423). - **Sarcoma delle cellule dendritiche interdittate** (col. 3424).

PROLIFERAZIONI ISTIOCITARIE E DENDRITICHE DI INCERTA NATURA col. 3424

Istiocitosi a cellule del Langerhans (istiocitosi X) (col. 3424). - **Istiocitosi a cellule dendritiche «indeterminate»** (col. 3425).

INTRODUZIONE

Le cellule monocito-macrofagiche («istiociti» fissi e mobili) e le dendritiche (comprendenti le interdittate delle aree linfoidi T-dipendenti, le dendritiche follicolari dei centri germinativi, le cellule intraepiteliali epidermiche di Langerhans e le cellule «indeterminate» della cute) rappresentano sistemi cellulari sotto vari aspetti notevolmente affini: il primo gruppo è di derivazione midollare accertata, il secondo di derivazione midollare assai probabile; ambedue sono impegnati nei processi di trattamento («processing») e di presentazione degli antigeni al sistema linfoide immunocompetente. Tale «*Mononuclear Phagocyte and Immunoregulatory Effector (M-PRE) System*» è pertanto coinvolto nelle risposte infiammatorie di tipo immunitario e non immunitario (Foucar *et al.*, 1990; Weiss, 1992).

Questo sistema cellulare può andare incontro a processi iperplastici di natura benigna (ma talora con espressioni *borderline* verso la malignità) ed a processi francamente neoplastici maligni (tab. XXXVI). A suo luogo si è già illustrato come i monocito/macrofagi facciano parte della componente reattiva del processo hodgkiniano e le cellule dendritiche partecipino alla strutturazione dei l. del folli-

TAB. XXXVI. CLASSIFICAZIONE DEI PROCESSI PROLIFERATIVI DELLE CELLULE MONOCITO-MACROFAGICHE (ISTIOCITI) E DELLE RETICOLARI DENDRITICHE

- Iperplasie istiocitarie di natura benigna**
 - Iperplasia istiocitica sinusale
 - Istiocitosi dei seni con linfadenopatia massiva (Rosai-Dorfman)
 - Linfadenite istiocitaria necrotizzante (Kikushi)
 - Sindromi emofagocitiche associate ad infezioni
 - Iperplasia istiocitaria benigna (con o senza eritrofagocitosi) associata a linfomi
- Iperplasie delle cellule dendritiche di natura benigna**
 - Linfadenopatia dermatopatica
- Processi iperplastici delle cellule dendritiche, borderline (con eccezionale evoluzione maligna)**
 - Istiocitosi delle cellule di Langerhans
 - Proliferazioni d'incerta natura di cellule dendritiche di vario tipo
- Proliferazioni delle cellule monocito/macrofagiche di natura maligna**
 - Istiocitosi maligna e linfoma istiocitico vero
 - Istiocitosi maligna associata a tumori teratogeni embrionali del mediastino
 - Leucemia acuta monocitica (M5) e mielomonocitica (M4)
- Proliferazioni delle cellule reticolari dendritiche di natura maligna**
 - Sarcoma delle cellule dendritiche interdittate
 - Sarcoma delle cellule dendritiche follicolari

colo; istiociti e cellule dendritiche svolgono talora spiccata attività emofagocitica in corso di processi linfomatosi linfoidi di natura T_H o di altro tipo. Delle proliferazioni maligne tratteremo qui solo l'istiocitosi maligna (ed il l. istiocitico vero) ed i sarcomi delle cellule dendritiche, mentre per le leucemie monocitiche (M4 e M5) si rinvia alle voci LEUCEMIE (VIII, col. 1534 e seg.; LEUCEMIE*, Agg. I, col. *4557 e seg.).

NEOPLASIE DEL SISTEMA MONOCITO-MACROFAGICO

Dopo l'individuazione del «sistema reticolo-istocitario» ad opera di Maximov e di Aschoff (1911 e seguenti) si è attribuita natura «istocitica» ad una congerie di quadri isto-patologici («reticolosarcomi», «retotelsarcomi») che hanno avuto numerose sistemazioni nosografiche ad opera di vari studiosi, ed in *primis* di Roessle (1929). Innumerevoli sono state tuttavia le controversie, soprattutto perché il riconoscimento della natura istocitaria di tali neoplasie riposava su reperti esclusivamente morfologici in microscopia ottica, interpretati con criteri largamente soggettivi e solo parzialmente atti a riprodurli valutazioni interpersonali. Successivamente Scott e Robb-Smith (1939) descrissero con il nome di «*histiocytic medullary reticulosis*» una neoplasia febbrile linfoadenopato-splenomegalica pancitopenica a decorso rapidamente fatale, sostenuta da una popolazione cellulare atipica riconducibile morfologicamente ad un tipo istocitario maturo spesso in attività eritrofagocitica, frammista a cellule blastiche linfoidi ed a plasmacellule, con predilezione per l'insediamento intrasinusale nei linfonodi. La natura neoplastica istocitaria di tale quadro fu peraltro oggetto di notevoli riserve da parte di non pochi studiosi (Jaffe, 1985). Ulteriori precisazioni vennero da Rappaport (1966), che credè il termine onnicomprensivo di «*istiocitosi maligna*», e da Warnke *et al.* (1975), che descrisse nell'ambito delle proliferazioni «istocitarie» neoplastiche il quadro del «*linfoma istiocitico vero*». I tempi erano ormai maturi perché l'inquadramento delle neoplasie maligne di presunta natura istocitaria potesse essere affrontato con indagini ultrastrutturali, citochimiche, immunocitochimiche, fenotipiche e genotipiche. Anche in base a rigorose revisioni di materiale biotipo appartenente a casistiche neoplastiche originariamente etichettate come «istocitiche» (Falini *et al.*, 1990) risultò che la quasi totalità dei casi descritti come istiocitosi maligna o l. istiocitico erano in realtà neoplasie di natura linfoide, inseribili nell'ambito dei l. a grandi cellule anaplastiche. Se affrontata con rigorosi criteri metodologici, la casistica delle neoplasie «istocitiche» non leucemiche, dianzi abbastanza numerosa, si ridusse a singole eccezionali osservazioni.

Istiocitosi maligna e linfoma istiocitico vero

Reperti istocitologici

L'elemento neoplastico è una cellula di grandi dimensioni (diametro superiore a 50 µm), con ampio citoplasma anfilo o più o meno intensamente basofilo, talora vacuolizzato, e nucleo di varia forma (rotondo, ovale, reniforme) a cromatina finemente dispersa, fornito di uno o due evidenti nucleoli; occasionalmente si reperiscono cellule giganti plurinucleate. Sono frequenti le mitosi ed il 40-70% delle cellule è Ki-67 positiva. Si possono osservare aspetti di eritrofagocitosi (fig. 89).

La reazione citochimica del PAS fornisce positività globulare paranucleare. Le reazioni per la *fosfatasi acida (tartrato-sensibile)* e per l'*alfa naftol acetato esterasi (ANAE)* sono positive in forma di diffusa colorazione del citoplasma, mentre quella per la *alfa-NASDAE* è negativa. Le cellule neoplastiche risultano positive per il *lisozima* (con reazione intracitoplasmatica granulare) ed anche per l'*alfa-1-antitripsina* e per l'*alfa-1-antichimotripsina*. Il particolare tipo di reazione per il lisozima è un marker di grande significato per l'attribuzione delle cellule ad una popolazione istocitica ed esclude che si possa trattare di un assorbimento citoplasmatico per danno di membrana. L'eventuale presenza nel citoplasma di catene immunoglobuliniche pesanti o leggere è in rapporto

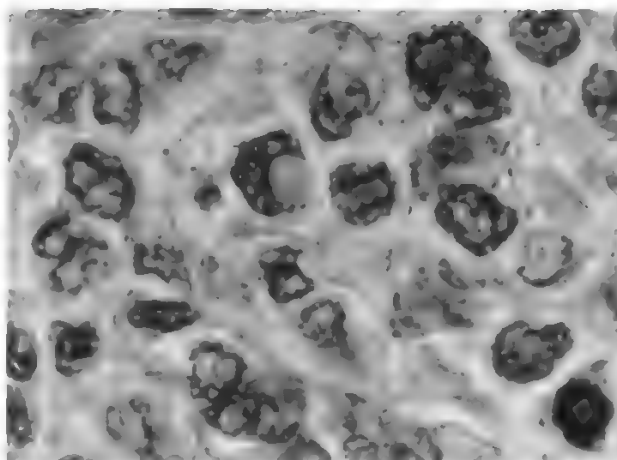


Fig. 89. Istiocitosi maligna. Linfonodo. Cellule di grandi dimensioni, con nucleo pleomorfo, nucleolato. Una cellula presenta eritrofagocitosi.

ad assorbimento di Ig mediata da specifici recettori presenti sulle cellule monocito-macrofagiche.

Le indagini immunofenotipiche (Ralfkiaer *et al.*, 1991) mostrano positività di marcatura per gli antigeni HLA-DR, CD11b, CD11c, CD14, Ber-Mac3/Ki-M8, Mac400, CD67, CD68, nonché per CD4 (presente anche nei monociti oltre che in linfociti T) e per CD45; assenti il CD30, gli antigeni di superficie propri delle linee linfocitarie B e T, e l'R4/23, specifico delle cellule reticolari dendritiche follicolari. In alcuni casi si è osservata positività focale della proteina S-100 unitamente a quella della molecola CD1a. I geni per le catene immunoglobuliniche ed il TCR sono in configurazione germinale.

Nei linfonodi gli istiociti neoplastici invadono prevalentemente i seni linfatici ma la proliferazione può essere così spiccata da cancellare diffusamente la struttura linfonodale, la cui trama fibrillare argentofila appare tuttavia conservata. Nella milza la proliferazione istiocitica interessa sia la polpa rossa che la bianca. Nel fegato sono invasi gli spazi porto-biliari ed i sinusoidi, con compromissione dei lobuli epatocitari. Il midollo osseo appare diffusamente infiltrato e mostra iperplasia del reticolo argentofilo. Nella cute le cellule neoplastiche, a proliferazione non coesiva, infiltrano sia il derma superficiale e profondo che l'ipoderma, ma mostrano scarso epidermotropismo. Nel tubo digerente, non infrequentemente interessato nelle forme disseminate, le cellule neoplastiche infiltrano la tonaca propria provocando ispessimento della mucosa e talora masse protrudenti nel lume.

Né la morfologia cellulare, né l'eventuale presenza di attività eritrofagocitica, né la proliferazione intrasinusale delle cellule neoplastiche, né la maggior parte dei reperti citochimici possono essere considerati patognomici della neoplasia: l'accertamento della sua natura istocitaria riposa essenzialmente sulla presenza intracitoplasmatica granulare di lisozima e sui reperti immunofenotipici dianzi illustrati.

Quadro clinico

La neoplasia istiocitaria colpisce primariamente l'adulto, più raramente l'età infantile-giovanile, senza preferenza di sesso. Può avere già all'esordio diffusione sistemica all'apparato linfonodale superficiale e profondo e in circa il 50% dei casi interessa precocemente anche sedi extralinfono-

dali. Si parla in tal caso di *istiocitosi maligna in senso proprio*. Se invece l'esordio è strettamente circoscritto ad una o a poche stazioni linfonodali o ad una sede extralinfonodale (localizzazione primaria) e mostra scarsa progressione sistemica, si conviene di etichettare il processo come *linfoma istiocitico vero* (Van der Valk *et al.*, 1984).

La localizzazione alla cute si presenta solitamente in forma di noduli singoli o multipli, di colorito roseo o violaceo, talora ulcerati. L'intestino (tenue, colon) può essere colpito in un'unica sede o presentare localizzazioni multiple: possono essere causa di stenosi o di emorragie o di sindrome di malassorbimento. Non raramente si osservano aree di *osteolisi* singole o multiple, talora associate ad ipercalcemia. Sono stati segnalati casi di neoplasia istiocitica primaria della milza (Franchino *et al.*, 1988) ed un tumore istiocitico primario del fegato (Anthony *et al.*, 1990). Un evento anatomo-clinico molto particolare è rappresentato dalla *istiocitosi maligna associata a tumore teratogeno embrionario in sede mediastinica* (De Ment, 1990). È provato che le cellule del teratocarcinoma embrionario sono atte, in coltura *in vitro*, a differenziarsi lungo linee emopoietiche.

Decorso

È per lo più aggressivo con grave compromissione generale dell'organismo e si conclude fatalmente entro un anno, con scarsa risposta alla polichemioterapia antitumorale ed alla radioterapia. Vi sono casi con terminale espressione leucemica monocitica, che rappresentano un ponte tra l'istiocitosi maligna e la leucemia acuta di tipo FAB M5.

Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale clinica ed istiocitologica, va posta anzitutto nei confronti dei l. a grandi cellule anaplastiche CD30 positive, dei l. a grandi cellule B a proliferazione intrasinusale, del l. T_H associato ad eritrofagocitosi istiocitaria e delle iperplasie istiocitarie benigne con emofagocitosi, ma pure della papulosa linfomatoide, dei carcinomi anaplastici e del melanoma amelanotico.

NEOPLASIE DEL SISTEMA RETICOLARE DENDRITICO

Sarcoma delle cellule dendritiche follicolari

Tale eccezionale neoplasia è stata identificata da Monda *et al.* (1986) e da Pallesen e Myrhe-Jensen (1987). L'età media all'esordio è di 46,5 anni (range 27-72); i due sessi vi sono rappresentati con pari frequenza. La più comune forma di esordio (50% dei casi) è quella di un lento coinvolgimento di linfonodi latero-cervicali; meno frequenti sono le localizzazioni ai linfonodi mediastinici e ascellari, alla tonsilla, alla milza, al tessuto molle perisplenico e peripancreatico. La massa neoplastica è solitamente unica, relativamente ben circoscritta, di vario volume, anche in rapporto alla sede coinvolta: in sede laterocervicale comporta diametro massimo di 1-6 cm, in sede ascellare e mediastinica e nelle stazioni addominali diametro di 6-13 cm; la milza sede di tumore può pesare 1500 g (Perez-Ordóñez *et al.*, 1996).

Il sarcoma delle cellule dendritiche follicolari è una neoplasia di basso grado, con discreta tendenza alla recidiva locale dopo radio- e/o chemioterapia, e con occasionale diffusione metastatica (polmone, fegato). La terapia di elezione è l'exeresi chirurgica (se tecnicamente effettuabile), seguita in molti casi da prolungata DFS (12,6 da Free Survival).

La neoplasia è costituita da cellule ovali o fusate, spesso disposte in spirali, con citoplasma a margini indistinti (aspetto simil-sinciziale), nuclei allungati con cromatina dispersa e piccoli nucleoli, raramente le cellule sono necrotiche. L'esame in microscopia elettronica mostra la presenza di propaggini citoplasmatiche congiunte da desmosomi maturi. L'esame immunofluorescente mostra positività di CD21 e CD35 (rispettivamente recettori di C3d e di C3b), di Ki-M4p e Ki-FDC-1p (marcatori specifici per le cellule dendritiche follicolari), talora di proteina S-100, di vimentina e di

ramente di actina. Negativi CD45, CD1a, CD20, EMA, HMB-45. I geni Ig e TCR sono in configurazione *germline*. Il genoma EBV non è solitamente rintracciabile nelle cellule neoplastiche, con rare eccezioni (Shek *et al.*, 1996). Piccoli linfociti sono sparsi tra le cellule neoplastiche o costituiscono manicotti perivasali. La *diagnosi differenziale* va posta nei confronti del meningioma ectopico e del timoma, di carcinomi, melanoma, istiocitoma fibroso maligno, di l. a grandi cellule e del sarcoma delle cellule interdigitate.

Sarcoma delle cellule dendritiche interdigitate

Sono eccezionali i casi in cui la natura reticolare interdigitata della neoplasia può essere ritenuta provata con rigore (Nakamura *et al.*, 1988). Il processo colpisce prevalentemente *maschi* in età adulta; interessa soprattutto i linfonodi, talora con carattere monostazionario, ma può presentare diffusione sistemica con poliadenomegalie superficiali e profonde (mediastino), epatosplenomegalia, localizzazioni al rinofaringe e/o all'intestino. La *morfologia* delle cellule neoplastiche è quella di elementi fusiformi, con nuclei allungati e cromatina finemente dispersa, piccolo nucleolo, oppure si tratta di grandi elementi simili a quelli propri della istiocitosi maligna o dei linfomi a grandi cellule, con ampio citoplasma finemente granuloso e debolmente basofilo, nucleo a contorni irregolari, talora inciso o convoluto. La proliferazione maligna interessa la paracorticale dei linfonodi o regioni T-cellulari spleniche. Non si osservano emorragie intraparenchimali, necrosi, fenomeni di eritrofagocitosi. La microscopia elettronica mostra *reperti ultrastrutturali* analoghi a quelli delle cellule interdigitate normali (proiezioni digitate, granuli elettrondensi di tipo lisosomico) ma non veri desmosomi né corpi di Birbeck. Risultano positive le *reazioni citochimiche* per l'ATPasi e le fosfatasi acide, mentre quelle per l'alfa-1-antritripsina, per l'alfa-1-antichimotripsina e per il lisozima sono incostanti e deboli. Il *fenotipo* non è ancora ben definito: le cellule sono HLA-DR positive ed esprimono tipicamente CD45, CD4, CD14, CD26, proteina S-100, talora l'antigene identificato da Ki-M1; negativi CD21 e CD35; CD1a spesso negativo. I geni delle Ig e del TCR sono in configurazione *germline*. L'*attività proliferativa* non è elevata: non più del 20% delle cellule è Ki-67 positiva.

Il *decorso clinico* è generalmente aggressivo, con esito fatale a distanza di pochi mesi dall'esordio, ma sono stati osservati anche casi sopravvissuti 6 anni.

PROLIFERAZIONI ISTIOCITARIE E DENDRITICHE DI INCERTA NATURA

Istiocitosi a cellule del Langerhans (Istiocitosi X)

Tale processo non viene da alcuni AA. considerato una vera neoplasia (Weiss, 1992) ma sono state fornite casistiche in cui il carattere neoplastico appare provato (Broadbent *et al.*, 1994; Grois *et al.*, 1994; de Graaf *et al.*, 1995). Come è noto sotto il termine istiocitosi X si intendevano un tempo (tra gli anni '50-'80) tre processi morbosi: la malattia di Letterer-Siwe, il granuloma eosinofilo e la malattia di Hand-Schüller-Christian (v. ISTIOCITOSI X, vol. VIII, 692-698). Successivamente negli anni '90 si è arrivati al riconoscimento delle cellule di Langerhans quale elemento caratteristico dell'istiocitosi X (v. ISTIOCITOSI X*, Agg. I, coll. *4204-4208). L'età dei pazienti all'esordio varia tra 6 mesi e 39 anni (mediana circa 2 anni). La malattia può presentarsi quale *processo localizzato* (lesione cutanea o scheletrica isolata, stadio I), oppure con *lesioni multiple di un singolo sistema d'organo* (stadio II) o con *coinvolgimento pluristazionario* (stadio III-IV) comprendente linfonodi, milza, fegato, midollo osseo, S.N.C. Le cellule peculiari della istiocitosi X presentano reperti morfologici affini a quelli delle normali cellule di Langerhans (LCs) cutanee (presenza di *granuli* o *corpi di Birbeck*) ma notevole pleomorfismo e mitosi atipiche (Tani *et al.*, 1992; Isaacson e Norton, 1994). Esprimono *marcatori immunofenotipici* in parte affini a quelli delle LCs «resting» epidermiche (assenza di CD49a/VLA-5, espressione di CD1a e di S-100), in parte marcatori propri delle LCs attivate della linfadenopatia dermatopatica (spiccata espressione dell'integrina CD49d/VLA-4, di CD54/ICAM-1 e CD58; assenza di E-caderina).

Rispetto alle LCs normali, le cellule della istiocitosi X presentano un'espressione anormale di molecole di adesione (assenza di CD49f/VLA-6, espressione di CD2, CD11a/LFA1, CD11b/Mac-1). Ciò sembra indicativo di un arresto dei processi di attivazione e/o differenziazione cellulare e potrebbe spiegare l'abnorme *homing* di

queste cellule nella istiocitosi X (de Graaf *et al.*, 1995). Di recente ne è stata provata la clonalità (Yu *et al.*, 1994).

Istiocitosi a cellule dendritiche «indeterminate»

Sono stati segnalati in adulti singoli casi di neoplasia cutanea (ma talora estesa anche a linfonodi) in cui le cellule tumorali presentavano i caratteri morfologici e fenotipici delle cellule dendritiche «indeterminate» (Berti *et al.*, 1988). Le lesioni cutanee, solitarie o multiple, interessano il derma con eventuale estensione all'epidermide. Le cellule neoplastiche sono piuttosto grandi, con ampio citoplasma e nuclei irregolarmente fessurati; all'esame ultrastrutturale si apprezzano numerose propaggini citoplasmatiche che si allacciano a quelle delle cellule viciniori; non si osservano corpi di Birbeck. Le cellule esprimono antigeni macrofagici: CD45, CD1, proteina S-100. Non è tuttavia ben chiaro se si tratti di un processo veramente diverso da quello della sopradescritta istiocitosi a cellule del Langerhans (Weiss, 1992).

Bibliografia

- Anthony P. P., Sarsfield P., Clarke T., *J. Clin. Pathol.*, 1990, **43**, 1007-1013.
 Berti E., Gianotti R., Alessi E., *Arch. Dermatol.*, 1988, **124**, 1250-1253.
 Broadbent V., Egeler R. M., Nesbit M. E., *Br. J. Cancer*, 1994, **70**, S11-S16.
 de Graaf W. A., Tamminga R. Y. J., Kamps W. A., Timens W., *Am. J. Pathol.*, 1995, **147**, 1161-1171.
 De Ment S. H., *Human Pathol.*, 1990, **21**, 699-703.
 Falini B., Pileri S., De Soles I. *et al.*, *Blood*, 1990, **75**, 434-444.
 Foucar K., Foucar E., *Semin. Diagn. Pathol.*, 1990, **7**, 4-18.
 Franchino C., Reich C., Distenfeld S. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 398-404.
 Grois N., Tsunematsu Y., Barkovich A. J., Favara B. E., *Br. J. Cancer*, 1994, **70**, S24-S28.
 Isaacson P. G., Norton A. J., *Extranodal Lymphomas*, 1994, Churchill Livingstone, Edinburgh.
 Isaacson P. G., Wright D. H., Jones D. B., *Cancer*, 1983, **51**, 80-91.
 Jaffe E. S., *Semin. Diagn. Pathol.*, 1988, **5**, 376-390.
 Monda L., Warnke R., Rosai J., *Am. J. Pathol.*, 1986, **122**, 562-572.
 Nakamura S., Hara K., Suchi T. *et al.*, *Cancer*, 1988, **61**, 562-568.
 Pallesen G., Myhre-Jensen O., *Leukemia*, 1987, **1**, 549-557.
 Perez-Ordóñez B., Erlandson R. A., Rosai J., *Am. J. Pathol.*, 1996, **20**, 944-955.
 Ralfkiaer E., Delsol G., O'Connor N. T. J. *et al.*, *J. Pathol.*, 1990, **160**, 9-17.
 Rappaport H., *Tumors of the hematopoietic system*, in *Atlas of tumor pathology*, 1966, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 49-63.
 Shek T. W., Ho F. C. S., Ng O. L., *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996, **20**, 313-324.
 Tani M., Ishii N., Kumagai M. *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 1992, **126**, 398-403.
 Van der Valk P., Meijer C. J. L. M., Willemze R. *et al.*, *Histopathology*, 1984, **8**, 105.
 Warnke R. A., Kim H., Dorfman R. F., *Cancer*, 1975, **34**, 215-230.
 Weiss L. M., *Histiocytic and dendritic cell proliferations*, in Knowles D. M. ed., *Neoplastic Hematopathology*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, 1459-1484.
 Yu R. C., Chu C., Buluwela L., Chu A. C., *Lancet*, 1994, **343**, 767-768.

CARLO MAURI

INDIRIZZI TERAPEUTICI E PROGNOSI

SOMMARIO

PRINCIPI GENERALI	col. 3426
Radioterapia (RT) (col. 3427). - Chemioterapia (CT) (col. 3428). - Terapia biomodulante e immunoterapia (col. 3437). - Terapia di supporto (col. 3437). - Valutazione dei risultati terapeutici (col. 3439).	
STRATEGIA TERAPEUTICA	col. 3440
MALATTIA DI HODGKIN	col. 3442
Premessa (col. 3442). - Strategia terapeutica primaria (o di induzione) (col. 3443): Gruppo I. - Gruppo II. - Gruppo III. - Gruppo IV. - Trattamenti successivi alla terapia di induzione (recidive comprese) (col. 3445). - Terapia in particolari situazioni cliniche (col. 3447): Malattia di Hodgkin in età pediatrica. - Malattia di Hodgkin nell'età senile. - Malattia di Hodgkin in gravidanza.	

LINFOMI NON-HODGKIN

col. 3448

Linfomi indolenti di basso grado di malignità (col. 3448): Stadi limitati. - Stadi avanzati. - Linfomi aggressivi (col. 3450): Stadi limitati. - Stadi avanzati. - Linfomi altamente aggressivi (col. 3451). - Indirizzi terapeutici in particolari linfomi non-Hodgkin extralinfonodali primari (col. 3452): Linfomi gastrici. - Linfomi intestinali. - Linfomi cutanei. - Linfomi cerebrali.

IMMUNOTERAPIA

col. 3455

Generalità (col. 3455). - Immunotossina (col. 3455). - Radioimmunoterapia (col. 3457). - Vaccini anti-idiotipo (col. 3458).

PRINCIPI GENERALI

All'infuori di una modesta quota del tutto refrattaria, i l. sono suscettibili di controllo più o meno completo e duraturo se sottoposti ad adeguata terapia: frequentemente si ottengono risposte immediate soddisfacenti (remissione completa, RC, o parziale, RP), seguite talora da recidive precoci o da progressione del neoplasma, altre volte da prolungata sopravvivenza esente da malattia (*disease free survival*, DFS), che può concludersi con recidiva tardiva o significare guarigione definitiva. L'esito favorevole è più frequente in casi di l. di Hodgkin (MH) (75-80%) e si riscontra in misura alquanto notevole pure nei l. non Hodgkin (LNH) aggressivi (45-55%), mentre tra i LNH indolenti remissioni sicuramente complete e lunghi periodi di DFS e di sopravvivenza esente da recidiva (*relapse free survival*, RFS) vengono acquisite in una percentuale minore di casi: in quest'ultima classe di l. la terapia antitumorale migliora certamente la qualità di vita ma spesso non consente di prolungare significativamente la sopravvivenza (*overall survival*, OS) che è propria della loro storia naturale.

I mezzi di cui disponiamo per conseguire siffatti risultati sono numerosi: a) *radiazioni ionizzanti* di varia natura emesse da sorgenti esterne (v. **RADIOTERAPIA** [v.; v.*; v.**]); b) numerosi *farmaci citostatici* antitumorali (tab. XXXVII), appartenenti a classi diverse per struttura chimica, metabolismo, meccanismo d'azione (v. **ANTIBLASTICI FARMACI** [v.; v.*]) (chemioterapici e radiazioni vengono spesso associati in schemi di *terapia di combinazione*); c) *alcune sostanze capaci di modulare le risposte dell'organismo al tumore*: corticosteroidi, interferoni, interleuchine; d) *immunotossine* di vario genere e *vaccini anti-idiotipo*; e) *molteplici presidi coadiuvanti*: trasfusioni di sangue *in toto* o di concentrati eritrocitari o di plasma arricchito di piastrine, anabolizzanti, vitamine (A, C, folati), antiemetici, antibiotici e chemioterapici antibatterici e antimicotici, fattori di crescita ematopoietica (G-CSF, GM-CSF, eritropoietina), trapianto di cellule staminali midollari o periferiche (PBSC), autologhe o allogeniche (v. **MIDOLLO OSSEO**, *trapianto* [v.*; v.**]); f) *l'approccio chirurgico* a fini terapeutici ha nei l. scarsa importanza, tranne casi particolari (v. **LINFOMI***, *chirurgia dei linfomi*).

La *sensibilità delle cellule* linfomatose alle radiazioni ed ai citostatici e l'*efficacia eradicante* dei presidi antitumorali sono in rapporto a molte variabili: a) *caratteristiche biologiche* (natura, immunofenotipo, caratteri citogenetici e biomolecolari, etc.) delle cellule linfomatose; b) *entità della frazione di crescita* (dimensioni della popolazione cellulare in ciclo e in mitosi rispetto a quella fuori ciclo); c) *estensione topografica del processo morboso nell'organismo*; d) *volume della massa neoplastica globale o di sue singole localizzazioni*.

La *tolleranza dell'organismo in toto* alle terapie antitumorali è a sua volta in rapporto all'età del paziente e al grado di compromissione dell'organismo per il l. in atto o per eventuali precedenti o concomitanti malattie: tali variabili sono prese in considerazione nella formulazione del *performance status* (PS) e degli *indici prognostici* (IPI) (v. sopra «*Indicazione*», col. **3324).

LINFOMI

I numerosi studi condotti nel campo della prognosi consentono oggi una più razionale programmazione terapeutica e una motivata scelta dei farmaci e delle modalità terapeutiche disponibili.

Radioterapia (RT)

La RT è l'agente singolo di maggiore efficacia citocida in molti tipi di L; non presenta resistenza crociata con nessun chemioterapico attualmente noto. È accertato che le cellule mostrano nei confronti delle radiazioni sensibilità differenziata nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Il danno cellulare da radiazioni comporta, in molti casi, una morte mitotica, in altri morte cellulare intermitotica (v. RADIOBIOLOGIA).

MH e LNH sono tra le neoplasie più sensibili alle radiazioni. Circa le dosi di radiazioni che è possibile erogare, v. RADIOTERAPIA (v.; v.*; v.**).

Per quanto attiene all'erogazione topografica delle radiazioni nei L, si distinguono le seguenti modalità:

1) *Campi localizzati*: sono irradiate solo le aree linfomatose palesemente colpite (*involved fields, IF*).

2) *Campi allargati*: oltre alle stadiazioni linfonodali palesemente coinvolte si irradiano le aree vicine anche se clinicamente indenni, in quanto sedi possibili di micrometastasi inapparenti (*extended fields, EF*). L'irradiazione contemporanea di tutti i distretti linfonodali *sopradiaframmatici* viene detta «a mantellina» (collo, linfonodi occipitali e periauricolari, ascellari, mediastino), e si parla di «mantellina allargata» se sono comprese pure le stazioni linfonodali *sottodiaframmatiche* lomboaortiche alte e quelle dell'ilo splenico. L'irradiazione delle catene linfonodali *sottodiaframmatiche* (lomboaortiche, dell'ilo splenico, iliache e inguinofemorali), è detta «a Y rovesciata». La milza, se necessario, viene irradiata con un campo a parte.

3) *Irradiazione linfonodale assiale completa* (*total nodal irradiation, TNI*): consiste nell'irradiazione di tutti i principali distretti linfonodali sopra- e sottodiaframmatici e della milza. Se vengono esclusi i distretti para-iliaci si parla di *irradiazione linfonodale assiale incompleta* (*subtotal nodal irradiation, sTNI*).

4) In qualche caso è utile irradiare lo stomaco o il letto gastrico, mentre l'irradiazione di altri organi è ormai un evento eccezionale.

5) In caso di localizzazioni linfomatose alla cute (specie nei L. T cutanei primitivi) si impiegano — a seconda dell'entità dell'area interessata — la plesioterapia o la cobaltoterapia a raggi radenti o la radioterapia con elettroni veloci prodotti da acceleratori lineari di bassa energia (*total skin electron radiation*).

6) In tutti i casi è necessario *schermare* opportunamente le aree che non devono essere irradiate: tiroide, campi polmonari, testicoli, ovaie.

L'irradiazione provoca *manifestazioni generali* indesiderate («male da raggi») e *danni somatici acuti e tardivi* (v. RADIOBIOLOGIA, XII, 2298; RADIODERMITI, XII, 2312). Tra questi si deve segnalare il non trascurabile rischio attuariale di un secondo tumore, che può manifestarsi in genere dopo un notevole lasso di tempo.

Chemioterapia (CT)

I farmaci citostatici, numerosi e chimicamente eterogenei (v. tab. XXXVII) agiscono con svariati *meccanismi* sulle cellule neoplastiche (v. ANTIBLASTICI FARMACI [v.; v.*]) provocando pure *effetti tossici* di varia natura, ematologici e non ematologici.

Le *vie di somministrazione* dei farmaci sono varie: orale (*os*), endovena (*e.v.*), intramuscolo (*i.m.*), sottocute (*s.c.*), intratecale (*i.t.*), intracavitaria, percutanea; sono in parte obbligate dalla natura chimica, dal metabolismo e dalla farmacocinetica del prodotto; in parte dal distretto corporeo che deve essere elettivamente trattato.

L'impiego dei citostatici come *presidio singolo* (*monochemioterapia*) esplica spesso effetti favorevoli a breve termine ma non

TAB. XXXVII. PRINCIPALI FARMACI IMPIEGATI NELLA CHEMIOTERAPIA DEI LINFOMI

Nome chimico	Acronimo	Nome commerciale®	Nome chimico	Acronimo	Nome commerciale®
Alchilanti (<i>Mostarde azotate</i>) Mecloretamina Clorambucile Ciclofosfamide Ifosfamide Melfalan (<i>Nitrosouree</i>) Carmustina Lomustina (<i>Dialchiltrialazeni</i>) Dacarbazina	HN ₂ Chl CTX (Cy) IFO MF BCNU CCNU DTIC	Caryolisin, Mutargen Leukeran, Linfolysin Endoxan Holostan Alkeran Nitrumon Belustine Deticene	Antibiotici anti-tumorali (<i>Antraciclinici</i>) Adriamicina (Doxorubicina) Epidoxorubicina Idarubicina Daunomicina (Daunorubicina) (<i>Altri</i>) Bleomicina	ADM, DXR Epi-DXR IDA DNM BLM	Adriblastina Farmarubicina Zavedos Daunoblastina Bleomicina
Antimetaboliti Ametopterina Mercaptopurina Cladribina Pentostatina Fludarabina Citarabina	MTX 6-MP 2-CDA DCF F-ara Ara-C	Methotrexate Purinethol, Ismipur Leustatin Nipent Fludara Aracytin	Miscellanea Procarbazina Cisplatino Carboplatino Mitoxantrone L-asparaginasi	PCZ CDDP CBDCA MIX Aspa	Natulan Platinex, Platamine, Cisplatin, Citoplatino Paraplatin Novantrone Crasnitin
Alcaloidi della Vinca Vincristina Vindesine Vindesine Vinorelbina (Navelin)	VCR VHL VDS VNB (Navelin)	Vincristina, Oncovin Velbe Eldisine Lundres	Corticosteroidi Prednisone Metil-Prednisolone Desametasone	PDN M-PDL Desa	Deltacortene, Delta- Prenovis Urbason, Medrol Decadron
Epipodofilotossine Etoposide Teniposide	VP-16 VM-26	Toposar Vumon	Immunomodulanti Interferone Interleuchina 2 (Aldesleuchina)	IFN-α IL-2	Intron A, Roferon A Proleukin

consente — se non in condizioni particolari — risultati eradicanti, neanche con l'abbinamento a corticosteroidi o ad interferone. Nella malattia di Hodgkin (MH) la monochemioterapia (in genere mecloretamina) trova oggi indicazione soprattutto in alcune insolite condizioni d'emergenza: sindrome mediastinica acuta, lesione acuta del midollo spinale da compressione estrinseca, anuria per stenosi ureterale bilaterale. Pure non frequente nella MH è l'impiego della monochemioterapia a scopo palliativo (v. oltre, col. **3442). Nei linfomi non Hodgkin (LNH) la monochemioterapia condotta con alchilanti (ciclofosfamide, clorambucil) o con analoghi delle purine, quali fludarabina (fluoro-arabinoside-adeninmonofosfato), pentostatina (2-deossicoformicina), cladribina (2-cloro-deossiadenosina), etc., ha invece più numerose indicazioni, in specie nei l. indolenti a bassa malignità.

Attualmente la CT è imperniata per lo più su schemi di polichemioterapia, sviluppati per primi da DeVita *et al.* (1970). Ricorrendo all'impiego simultaneo o in rapida successione di più farmaci non cross-resistenti, reiterati più volte in cicli ripetitivi opportunamente distanziati, si ottiene la sommazione di effetti citocidi senza provocare sommazione di tossicità.

I principali schemi di polichemioterapia impiegati nella MH e nei LNH figurano nelle tabb. XXXVIII-XLI.

Per i principi biologici e farmacologici che sottendono alla elaborazione degli schemi di polichemioterapia, si rinvia alle voci ANTIBLASTICI FARMACI (v. v.°).

È tuttavia opportuno menzionare alcune nozioni di importanza pratica.

1. Si è constatato empiricamente che il potenziamento dell'effetto tumoricida ricorrendo a più farmaci non è indefinito: associando fino a 4 citostatici opportunamente scelti, gli effetti terapeutici aumentano considerevolmente (spesso determinante è l'inserimento di un'antraciclina) senza importante aggravamento degli effetti collaterali indesiderati, ma oltre tale limite l'incremento dell'indice terapeutico è modesto.

2. Allo scopo di esercitare un prolungato effetto citocida sia sulle cellule fuori ciclo, sia su quelle in ciclo e sulle varie fasi di questo, sono state escogitate diverse modalità di abbinamento e di successione cronologica dei farmaci. Migliore efficacia eradicante è stata ottenuta con l'alternanza di due schemi polichemioterapici diversi (ad es. MOPP e ABVD, nella MH) oppure somministrando fino a 10 citostatici nello stesso ciclo secondo schemi ibridi (ad es. MOPP/ABV) od anche con la loro somministrazione sequenziale settimanale (ad es. MACOB-B) (Cannellos *et al.*, 1992). Sull'effetto citocida influiscono anche le modalità di erogazione intravena: la perfusione continua (p.c.) di alcuni citostatici, prolungata anche per più giorni, è talora più efficace della infusione *in bolo*.

3. La massima efficacia che ogni schema polichemioterapico può esprimere viene raggiunta somministrando dosi ottimali ad intervalli ottimali. Se l'insorgenza di effetti tossici acuti non consente di mantenere il prestabilito ritmo di somministrazione, appare più opportuno ridurre il dosaggio dei farmaci (v. tabb. XLII e XLIII) in base alla graduazione dei danni mantenendo invariato il ritmo di somministrazione, piuttosto che prolungare gli intervalli tra i cicli di terapia. Talora potrà essere utile praticare una riduzione posologica selettiva, indipendente dalla progressività generale della riduzione contemplata nella tab. XLIII: ad es. cisplatino e metotrexato dovranno essere ridotti al 50% già in presenza di segni di tossicità renale di grado 1 e del tutto sospesi in presenza di tossicità di grado 2; le nitrosouree dovranno essere del tutto sospese in presenza di tossicità renale di grado 1; l'associazione vinblastina-VP16 dovrà essere ridotta al 50% in presenza di tossicità epatica di grado 1 e sospesa se di grado 2; l'associazione ciclofosfamide - metotrexato dovrà invece essere ridotta solo del 75% in presenza di tossicità epatica di grado 2 e sospesa se di grado 3. Se si impiega bleomicina si terrà presente che la sua dose singola massima è di 25 mg/m² e quella cumulativa a rischio è di 220-240 mg/m². La daunoblastina presenta elevata cardiotossicità dose-dipendente: la dose cumulativa a rischio è di 550-700 mg/m². Pure dose-dipendente è l'effetto cardiotossico della doxorubicina (dose cumulativa massima a rischio 450-550 mg/m²) e quello della epidoxorubicina (dose cumulativa a rischio 1000 mg/m²) e del mitoxantrone. La spiccata neurotossicità periferica della vincristina non consente di superare la dose singola di 2 mg, anche se il calcolo in base alla superficie corporea richiedesse un dosaggio superiore.

4. L'efficacia di uno schema terapeutico dipende sia dalla dose effettivamente assunta e dalla concentrazione raggiunta dal far-

TAB. XXXVIII. PRINCIPALI SCHEMI DI POLICHEMIOTERAPIA PRIMARIA NELLA MALATTIA DI HODGKIN

MOPP		
HN ₂	6 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8
PCZ	100 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 14
PDN	40 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 14 (cicli 1, 4)
ogni 28 giorni × 6 cicli		
ABVD		
ADM	25 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
BLM	10 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
VBL	6 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
DTIC	375 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
ogni 28 giorni × 4-6 cicli		
MOPP/ABV/CAD ibrido		
HN ₂	6 mg/m ² e.v.	giorno 1 (cicli 1, 3, 5)
CCNU	100 mg/m ² e.v.	giorno 1 (cicli 2, 4, 6)
VDS	3 mg/m ² e.v.	giorno 1
MF	6 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 3
PDN	40 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 14
ADM	35 mg/m ² e.v.	giorno 8
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 8
PCZ	100 mg/m ² os	giorno 8 ↔ 14
VBL	6 mg/m ² e.v.	giorno 15
BLM	10 mg/m ² e.v.	giorno 15
ogni 28 giorni × 6 cicli		
Stanford V		
ADM	25 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
VBL	6 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15
HN ₂	6 mg/m ² e.v.	giorno 1
VP-16	60 mg/m ² e.v.	giorno 15, 16
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22
BLM	5 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22
PDN	40 mg/m ² os	a giorni alterni da 1 a 28
ogni 28 giorni × 3 cicli		
EVE		
Epi-DXR	70 mg/m ² e.v.	giorno 1
VBL	6 mg/m ² e.v.	giorno 1
CCNU	100 mg/m ² e.v.	giorno 1
CCNU	150 mg/m ² os	giorno 2 ↔ 3
ogni 21 giorni × 4 cicli		
VBMp		
VBL	6 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8
BLM	10 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8 (cicli 1-2)
BLM	4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8 (cicli 3-6)
MTX	30 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8
PDN	25 mg/m ² os	giorno 1, 5, 8, 12
ogni 32 giorni × 6 cicli		
CEP		
CCNU	80 mg/m ² os	giorno 1
VP-16	100 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5
Prednimustina	60 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5
ogni 28 giorni × 6 cicli		

Nota a). Per le sigle dei farmaci riportate nelle tabb. XXXVIII, XXXIX, XL e XLI, si consulti la tab. XXXVII.

Nota b). Vengono qui spiegati i simboli impiegati in questa tab. XXXVIII e nelle tabb. XXXIX, XL e XLI: e.v.: endovena; i.m.: intramuscolo; s.c.: sottocute; os.: via orale; i.c.: perfusione continua; i.t.: intratecale.

Nota c). Per quanto concerne i giorni di somministrazione, le indicazioni riportate nelle tabelle sopra citate vogliono dire = giorni 1 ↔ 5: dal giorno 1 al giorno 5; giorni 1, 5: giorno 1 e giorno 5; -5, -1: dal giorno 5 al giorno 1 prima del giorno 0.

maco nell'organismo, sia dal tempo impiegato per completare il programma terapeutico. Ogni deviazione da quanto prescritto com-

TAB. XXXIX. PRINCIPALI SCHEMI DI POLICHEMIOTERAPIA PRIMARIA DEI LINFOMI NON-HODGKIN

HD CH-P			MTX	120 mg/m ² e.v.	giorno 8
Chl	15 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5	(Rescue con Leucovorin 10 mg/m ² os q. 6 h × 5, 24 h dopo MTX)		
PDN	100 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5	ogni 21 giorni × 6 cicli		
ogni 28 giorni × 3-5 cicli			LSA₂-L₂		
Variante: HD CH-PE Si aggiunge:			Induzione		
Epi-DXR	60 mg/m ² e.v.	giorno 1	CTX	1200 mg/m ² e.v.	giorno 1
CVP			PDN	60 mg/m ² e.v./os	giorno 2 ↔ 30, poi scalare per 1 settimana
CTX	400 mg/m ² os/e.v.	giorno 1 ↔ 5	VCR	1,5 mg/m ² e.v.	giorno 2, 9, 16, 23
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 1	MTX	6,25 mg/m ² i.t.	giorno 6, 25, 27
PDN	100 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5	DNM	60 mg/m ² e.v.	giorno 10, 11
ogni 21 giorni × 6-8 cicli			Consolidamento		
FND			Ara-C	150 mg/m ² s.c.	giorno 30 ↔ 34, 37 ↔ 41, 44 ↔ 48
F-ara	25 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 3	TG	75 mg/m ² os	10 h dopo Ara-C
MIX	10 mg/m ² e.v.	giorno 1	Asparaginasi	10.000 U/m ² i.m.	giorno 49 ↔ 60
Desametasone	20 mg/m ² e.v./os	giorno 1 ↔ 5	MTX	6,25 mg/m ² i.t.	giorno 62, 64
ogni 28 giorni × 3-4 cicli			Profilassi SNC		
CHOP (-Bleo)			RT cranio	1,8 Gy/die (totale 8 Gy)	giorno 67 ↔ 71, 74 ↔ 78
CTX	750 mg/m ² e.v.	giorno 1	(BCNU)	60 mg/m ² e.v.	giorno 88
ADM	50 mg/m ² e.v.	giorno 1	Mantenimento		
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 1	5 sequenze ad intervalli di 14 giorni; le sequenze vanno ripetute per un anno.		
PDN	50-100 mg/m ² os/e.v.	giorno 1 ↔ 5	1. TG	300 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 4
(BLM	15 mg/m ² e.v.	giorno 8, 5)	CTX	600 mg/m ² e.v.	giorno 5
ogni 21 giorni × 6 cicli			2. Idrossiurea	2400 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 4
Varianti: CEOP-Bleo , l'ADM viene sostituita da Epi-DXR 60 mg/m ² e.v.; CNOP-Bleo , l'ADM viene sostituita da MIX 12 mg/m ² e.v.			DNM	45 mg/m ² e.v.	giorno 5
BACOP			3. MTX	10 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 4
CTX	650 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8	BCNU	60 mg/m ² e.v.	giorno 5
ADM	25 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8	4. Ara-C	150 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 4
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8	VCR	1,5 mg/m ² e.v.	giorno 5
BLM	5 mg/m ² e.v.	giorno 15, 22	5. MTX	6,25 mg/m ² i.t.	giorno 1, 5
PDN	60 mg/m ² os	giorno 15 ↔ 28	BEM-LNH 81		
6 cicli continuativi senza pause			Prefase (tempo 0 alle 24 h tra il dì - 1 e il dì + 1)		
mBACOD			CTX	200 mg/m ² e.v.	giorno -5, -1
MTX	200 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8	PDN	30 mg/m ² os	giorno -5, -1
(Rescue con Leucovorin 10 mg/m ² os q. 6 h × 6, 24 h dopo MTX)			Blocco 1		
BLM	4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 22	MTX	50 mg/m ² e.v. (push)	giorno 1
ADM	45 mg/m ² e.v.	giorno 1, 22	450 mg/m ² e.v. (p.c. 24 h)		
CTX	600 mg/m ² e.v.	giorno 1, 22	12 mg i.t.		
VCR	1 mg/m ² e.v.	giorno 1, 22	(Rescue con Leucovorin 12 mg/m ² e.v. q. 6 h × 6 dopo inizio della p.c. di MTX)		
Desametasone	6 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5, 22 ↔ 26	CTX	200 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 5
ogni 45 giorni × 10 cicli			Ara-C	300 mg/m ² e.v. (infusione 1 h)	giorno 5
MACOP-B			VP-16	165 mg/m ² e.v. (infusione 1 h dopo Ara-C)	giorno 5
MTX	400 mg/m ² e.v.	giorno 8, 36, 64	PDN	30 mg/m ² os	fino al termine del secondo blocco e poi ridotto gradualmente fino alla sospensione
(di cui 100 mg in bolo, 300 mg in infusione 4 h)			Blocco 2		
(Rescue con Leucovorin 15 mg/m ² os q. 6 h × 6, 24 h dopo MTX)			MTX	50 mg/m ² e.v. (push)	giorno 1
ADM	50 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43, 57, 71	450 mg/m ² e.v. (p.c. 24 h)		
CTX	350 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43, 57, 71	12 mg i.t.		
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22, 36, 50, 64, 78	(Rescue con Leucovorin 12 mg/m ² e.v. q. 6 h × 6 dopo inizio della p.c. di MTX)		
PDN	75 mg/m ² os/e.v.	giorno 1 ↔ 64 (scalare nei giorni 65 ↔ 78)	CTX	200 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 5
BLM	10 mg/m ² e.v.	giorno 22, 50, 78	ADM	50 mg/m ² e.v.	giorno 5
ciclo unico			PDN	30 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5 e poi ridotto (v. sopra)
P-G-MACE/CytaBOM			I blocchi 1 e 2 vengono alternati ad intervalli diversi in rapporto allo stadio: 14 giorni negli stadi I-II, 14 giorni negli stadi III-IV, purché PMN > 0,5 × 10 ⁹ /L, PLT > 50 × 10 ⁹ /L (e P > 50 × 10 ⁹ /L). In totale 6 blocchi ± 2 di		
CTX	650 mg/m ² e.v.	giorno 1			
ADM	25 mg/m ² e.v.	giorno 1			
VP-16	120 mg/m ² e.v.	giorno 1			
PDN	60 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 14			
Ara-C	300 mg/m ² e.v.	giorno 8			
BLM	5 mg/m ² e.v.	giorno 8			
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 8			

TAB. XL. PRINCIPALI SCHEMI DI TERAPIA PRIMARIA DI LNH AGGRESSIVI NEGLI ANZIANI

Mini-CEOP			P-VEBEC		
CTX	750 mg/m ² e.v.	giorno 1	Epi-DXR	50 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43
Epi-DXR	50 mg/m ² e.v.	giorno 1	CTX	300 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43
VBL	5 mg/m ² e.v.	giorno 1	VP-16	100 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43
PDN	60 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 5	VBL	5 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22, 36, 50
ogni 21 giorni × 4-6 cicli			BLM	5 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22, 36, 50
P/DOCE (O'Reilly S. E. <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Oncol.</i> , 1993, 11, 2250-2257)			PDN	50 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 15, poi a giorni alterni
EPI-DXR	50/40 mg/m ² e.v.	giorno 1 settimana 1, 2, 7, 8	ciclo unico di 8 settimane		
VCR	1,2 mg/m ² e.v.*	giorno 1 settimana 1, 4, 7	VEMB		
CTX	300 mg/m ² e.v.	giorno 1 settimana 1, 4, 7	CTX	350 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43
VP-16	50 mg/m ² e.v.	giorno 1 settimana 4	MIX	10 mg/m ² e.v.	giorno 1, 15, 29, 43
	100 mg/m ² os	giorno 2, 5 settimana 4	VCR	1 mg	giorno 8, 22, 36, 50
Cotrimossazolo	2 misurini os	settimana 1 ↔ 8	BLM	5 mg/m ² e.v.	giorno 8, 22, 36, 50
PDN	50 mg/m ² os × 10	giorni** settimana 1, 4, 7	PDN	50 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 15, poi a giorni alterni
Ketoconazolo	200 mg/m ² os × 10	giorni** settimana 1, 4, 7	ciclo unico		
Cimetidina	600 mg/m ² os × 10	giorni** settimana 1, 4, 7			

Nota: per le sigle dei farmaci, v. tab. XXXVII. * Non dose massima. ** A cominciare dal giorno 1 delle settimane 1, 4, 7.

TAB. XLI. PRINCIPALI SCHEMI DI TERAPIA DI SALVATAGGIO IN LNH

HDS (High Dose Sequential Therapy)			VP-16		
Debulking APO (1-2 cicli di 21 giorni)			Ara-C	400 mg/m ² e.v.	giorno -6, -3
ADM	50 mg/m ² e.v.	giorno 1	MF	140 mg/m ² e.v.	giorno -2
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8, 15	Reinfusione delle PBSC (minimo 5 × 10 ⁶ /kg)		
PDN	40 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 21	giorno 0		
Fase I			CODOX-M		
CTX	1400 mg/m ² × 5 e.v.	giorno 1 (5 dosi)	CTX	800 mg/m ² e.v.	giorno 1
Mesna	1500 mg/m ² × 5 e.v.	giorno 1 (5 dosi)	VCR	1,5 mg/m ² e.v.	giorno 1, 8
Mesna	1000 mg/m ² × 6 e.v.	giorno 2 (6 dosi)	ADM	40 mg/m ² e.v.	giorno 1
G-CSF	5 mcg/kg s.c.	giorno 2 ↔ 12	Ara-C	70 mg/m ² i.t.	giorno 1
Raccolta PBSC			CTX	200 mg/m ² e.v.	giorno 2 ↔ 5
Fase II			Ara-C	70 mg i.t.	giorno 3
VCR	1,4 mg/m ² e.v.	giorno 16	MTX	1200 mg/m ² e.v.	giorno 10 (1 h)
MTX	8 g/m ² e.v.	giorno 16	MTX	240 mg/m ² /h e.v.	giorno 10 (23 h)
(Ac. folinico	15 mg/m ² os	ogni 6 h × 5, 24 h dopo MTX)	Ac. folinico	192 mg/m ² e.v.	giorno 11 (36 ^a h)
Fase III				12 mg/m ² /6 h e.v.	giorno 11 ↔ 14
VP-16	2000 mg/m ² e.v.	giorno 25	G-CSF	5 mcg/kg s.c.	giorno 13-PMN > 1,0
G-CSF	5 mcg/kg s.c.	giorno 27 ↔ 38	MTX	12 mg i.t.	giorno 15
Fase IV			Ac. folinico	15 mg os	giorno 16
MIX	60 mg/m ² e.v.	giorno 48	MIPE		
MF	180 mg/m ² e.v.	giorno 51	MIX	12 mg/m ² e.v.	giorno 1
Reinfusione PBSC		giorno 52	IFO	1200 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 5
G-CSF	5 mcg/kg s.c.	giorno 52 ↔ 63	Mesna	600 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 5 (h 0 e +4 dopo IFO)
 Variante: HDS (M+)			PDN	60 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5
È in tutto identica all'HDS, salvo lo spostamento della fase III al posto della I e viceversa, previ 3 cicli di desametasone 40 mg e.v. giorno 16 ↔ 19, 26 ↔ 29, 36 ↔ 39. A seguito di questa inversione, la fase IV inizia a partire dal giorno 69 ^a (corrispondente al 48 ^a dell'HDS): MIX giorno 69, MF giorno 72, reinfusione di PBSC giorno 75, G-CSF giorno 75 ↔ 84 (86).			VP-16	120 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 3
MAID			MYMA		
MIX	8 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 3	MIX	10 mg/m ² e.v.	giorno 1
Ara-C	2 g/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 3	CBDCA	100 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 4
Desametasone	4 mg/m ² /12 h e.v.	giorno 1 ↔ 3	M-PDL	500 mg/m ² e.v.	giorno 1 ↔ 4
G-CSF	5 mcg/kg s.c. e.v.	giorno 4 ↔ 17	Ara-C	2000 mg/m ² e.v.	giorno 5
Raccolta PBSC		giorno 15 ↔ 17	ogni 28 giorni × 6 cicli		
1-2 cicli di 21 giorni seguito da:			CIV		
BEAM			CDDP	40 mg/m ² e.v.	giorno 1
BCNU	340 mg/m ² e.v.	giorno -7	IDA	6 mg/m ² e.v.	giorno 1, 2
			(oppure	4 mg/m ² e.v.	giorno 1, 2, 3)
			VRB	30 mg/m ² e.v.	giorno 1
			PDN	40 mg/m ² os	giorno 1 ↔ 5
			ogni 21 giorni × 4-6 cicli		

Nota: per le sigle dei farmaci, v. tab. XXXVII. PBSC = peripheral blood stem cells (cellule staminali da sangue periferico). PMN = polimorfonucleato.

LINFOMI

TAB. XLII. POSOLOGIA DEI FARMACI CITOSTATICI IN PRESENZA DI TOSSICITÀ EMATOLOGICA

Granulociti N ($\times 10^9/L$)	> 2	1.5-1.9	1.0-1.5	< 1
Piastrine ($\times 10^9/L$)	Posologia dei farmaci (%)			
≥ 100	100	75	50	0
50-99	50	50	50	0
< 50	0	0	0	0

Il rinviare la somministrazione dei farmaci, ricontrollare i valori emocromatometrici dopo 8-10 giorni e riprendere la somministrazione se e quando detti valori consentono l'impiego di almeno il 50% della dose. Per il ricorso a fattori di crescita (G-CSF), v. testo.

promette l'efficacia della terapia. Come *intensità di dose* (*dose intensity*), s'intende la dose di un farmaco, o di un insieme di farmaci, somministrata nell'unità di tempo ($\text{dose}/\text{m}^2/\text{settimana}$). Numerosi

studi clinici hanno dimostrato, anche nei l., che una riduzione di più del 30% della *dose intensity* ha un impatto statisticamente significativo sulla frequenza di RC, che appare sensibilmente ridotta, e ancor più sulla durata di DFS (Zuckerman *et al.*, 1994; Silingardi *et al.*, 1995) e quindi incide sulla prognosi in senso sfavorevole. Se ne può concludere che uno dei motivi di insuccesso nel trattamento dei l. è legato all'insufficiente dosaggio dei farmaci impiegati piuttosto che alla chemioresistenza delle cellule linfomatose. Sulla traccia di questo concetto e al fine di migliorare l'efficacia della polichemioterapia, in alcuni schemi si è aumentato il dosaggio dei farmaci contrastandone il maggiore impatto tossico sulla mielopoiesi con la somministrazione di fattori di crescita ematopoietica: il vantaggio appare per lo più modesto, in termini di RC, RFS e di OS. Solo in LNH di alto grado trattati con dosi superiori del 200% a quelle standard (ricorrendo a fattori di crescita) sono state osservate risposte promettenti (Gordon *et al.*, 1992).

Sempre rifacendosi al concetto di *dose intensity*, un altro approccio per erogare i farmaci citostatici alla dose massima tollerabile dai pazienti è quello di impiegare *schemi terapeutici flessibili*, da intendersi quale modificabilità del dosaggio in rapporto al grado di mielotossicità farmaco-dipendente constatato dopo il primo ciclo

TAB. XLIII. RIDUZIONE POSOLOGICA DEI FARMACI CITOSTATICI IN PRESENZA DI TOSSICITÀ NON EMATOLOGICA

Bersaglio	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Tubo digerente				
Mucosa orale	Normale	Dolore, eritema	Ulcere	Necrosi
Nausea/vomito	Assenti o lievi	Presenti, transitori	Vomito persistente	Vomito incoercibile
Diarrea	Assente o < 2 giorni	Lieve ma prolungata	Moderata, persistente	Grave, disidratazione
Rene/vescica				
Clearance creatinina (mL/min)	> 60	30-60	10-29	< 10
Proteinuria (g/dL)	Assente	< 0,3	0,3-1,0	> 1,0
Ematuria	Assente	Microscopica	Macroscopica/disuria lieve	Macroscopica/disuria grave/uropatia ostruttiva
Cuore				
Ritmo	Inalterato	Tachicardia sinusale	Extrasistolia unifocale	Aritmie gravi
Funzionalità	Inalterata	Reperti strumentali alterati	Alterata, sintomatica	Insufficienza cardiaca conclamata
		Anomalie cliniche assenti		
Pericardite	Assente	Asintomatica	Paucisintomatica	Sintomatologia severa
Polmone				
Funzionalità	Normale	Anomalie lievi	Dispnea da sforzo	Dispnea grave, a riposo
Fegato				
Bilirubinemia totale (mg/dL)	< 1,5	1,5-3,0	3,1-5,0	> 5
ALT/AST (IU/L)	< 30	31-59	60-180	> 180
GGT (IU/L)	< 32	> 32	> 32	> 32
Sistema Nervoso				
Coscienza	Vigile	Torpare transitorio	Sonnolenza protratta	Sonnolenza persistente/coma
N. periferici	Normali	ROT depressi, parestesie lievi	Parestesia intensa	Parestesie gravi, atrofia muscolare, paresi
Motilità intestinale	Normale	Stipsi lieve	Stipsi persistente	Ileo paralitico
Cute	Normale	Eritema/Desquamazione secca	Desquamazione umida	Dermatite esfoliativa, necrosi, ulcerazione
Capelli	Normali	Alopecia a chiazze	Alopecia completa reversibile	Alopecia completa irreversibile
Manifestazioni allergiche	Assenti	Edemi	Broncospasmo sporadico	Broncospasmo persistente, crisi anafilattica

a) L'assenza o scarsa evidenza clinica di tossicità d'organo (tossicità di *grado 0*) consente di somministrare i farmaci citostatici a dosaggio pieno (in assenza di tossicità ematologica); in presenza di segni clinici di tossicità di *grado 1* è consigliabile somministrare temporaneamente il 75% dei farmaci; in presenza di *grado 2* si somministra il 50%, in presenza di *grado 3* si sospende la terapia.

b) Per la particolare progressività nella riduzione del dosaggio, la osservare per alcuni farmaci e la dose globale massima che è prudente non superare per altri v. il testo.

c) ROT = riflessi osteo-tendinei

di terapia. Presupposto di questa prassi è che l'assenza di tossicità ematologica alle dosi standard sia la spia di una *clearance* particolarmente rapida dei farmaci o comunque di un obiettivo sottodosaggio della terapia. L'uso di schemi flessibili consente di somministrare a singoli pazienti dosaggi più elevati di citostatici rispetto a quelli previsti inizialmente. Recenti studi sembrano provare l'efficacia e la tollerabilità di un incremento posologico dei citostatici in queste particolari situazioni.

5. Nella terapia dei l. possiamo distinguere forme diverse di terapia: di induzione o primaria, di consolidamento, di mantenimento; delle recidive e dei casi refrattari («terapie di salvataggio»); in condizioni particolari per età (infanzia, senilità) o per sede (polmonare, cerebrale, gastrointestinale, etc.).

6. È opportuno che la chemioterapia dei l. venga effettuata solo in ambienti specialistici e da personale medico e paramedico esperto. Al personale meno specializzato si raccomanda l'uso di schemi standard, tra i più conosciuti, onde evitare insuccessi non imputabili alle condizioni oggettive dei pazienti e danni iatrogeni.

Terapia biomodulante e immunoterapia

In anni recenti sono state proposte strategie terapeutiche innovative, in sostituzione dei tradizionali schemi di CT o abbinate a questi (Schnell *et al.*, 1996): tra le meglio documentate sono quelle impiegate su interferone, interleuchine, anticorpi monoclonali.

L'interferone α (VII, 2109-2114; *3867-3882), di qualsiasi tipo, esplica azione favorevole in LNH: anzitutto nella HCL, ma anche nella CLL, nella B-PLL e nei FCL (dove sembra prolungare — come *progression free survival* (PFS) — la remissione ottenuta con CT. L'IFN si impiega per lo più alla dose di 3 MU/m² s.c., tre volte alla settimana, per molti mesi.

Le interleuchine (v.*; v.***) non sembrano dare risultati felici, sia nella MH che in LNH: si riscontrano notevole tossicità renale e cardiaca, piastrinopenia e *vascular leak syndrome*. Effetti favorevoli a breve termine, in LNH, sono stati segnalati con rIL-2, somministrata in infusione continua ad alte dosi (fino a 20 × 10⁶ U/m²) per 3 cicli rispettivamente di 5-4-3 giorni durante la prima, terza, quinta settimana.

La terapia genica e con oligonucleotidi anti-senso è tuttora solo in fase sperimentale (Devereux e Cotter, 1996). Circa l'immunoterapia dei l., v. sotto (col. **3455).

Terapia di supporto

La gravità della malattia linfomatosa e l'impatto della terapia rendono spesso necessario l'impiego di presidi di supporto.

a) La profilassi e la terapia dell'iperuricemia e delle possibili complicanze renali tipiche della *sindrome da lisi tumorale* richiedono l'incremento dell'idratazione (2-3 litri di liquidi oltre la dieta normale) e la somministrazione di allopurinolo (Zyloric®, 300 mg/die) o di urato ossidasi (Uricozyme®, 1000 U. e.v. o i.m. × 1-3/die) 24 h prima di CT o RT aggressive. Tale terapia andrà proseguita durante tutto il primo ciclo di terapia.

b) Per il controllo dell'iperemesi immediata o ritardata, che si riscontra in corso di RT o di somministrazione di alcuni citostatici (soprattutto cisplatino e mecloretamina, ma pure di dacarbazina, ciclofosfamide, carboplatino ed altri), è di fondamentale importanza la prevenzione del sintomo piuttosto che il suo trattamento una volta che si sia manifestato. Molto efficaci sono l'ondansetron (v.*; Zofran®) e il granisetron (Kytril®). Questi farmaci hanno soppiantato l'armamentario farmacologico tradizionalmente impiegato a fini antiemetici e oggi considerato solo quale complementare: proclorperazina, tietilperazina, metoclopramide, alizapride, levosulpiride, clorpromazina, desclorfeniramina, prometazina, delorazepam, desametasone.

c) La febbre risente favorevolmente della terapia etiologica (antibiotici o CT/RT a seconda della sua natura). Cortisonici, indometacina, paracetamolo, diclofenac sono efficaci quali sintomatici.

d) Durante le fasi di polichemioterapia aggressiva è utile la profilassi continua antibatterica, antiprotzoaria (*Pneumocystis carinii*) e antimicotica: in prima istanza si darà la preferenza al cotrimossazolo (Bactrim forte®); tra gli antimicotici ci si avvale di solito dell'itraconazolo (v.; Sporonox® o Triasporin®) oppure del fluconazolo (Diflucan® o Elazor®) (v. anche ANTIMICOTICI [v.*; v.**]).

e) Per il trattamento del frequente *herpes zoster* si ricorre, oltre ai rimedi analgici e topici, all'aciclovir (v.*; v.**; Zovirax®); è consigliabile il controllo quotidiano della *clearance* della creatinina.

f) Per la profilassi e la terapia delle *mucositi* sono utili l'accurata igiene del cavo orale e l'uso di colluttori (acqua e bicarbonato, acqua e allopurinolo), eventualmente, se esiste dislalia, preparazioni di benzidina (Tantum verde®) addizionate con lidocaina; inoltre violetto di genziana, acetarsfenamina addizionata di argento proteinato (Arscolloid®); Mycostatin® o Fungilin®, se vi è mugghetto. Le lesioni del cavo orale da metotrexato ad alte dosi richiedono l'impiego di ac. folinico (Lederfolin®; v. FOLINICO ACIDO**) controllando l'ametopterinemica: concentrazioni plasmatiche > 10⁻⁴ M/L sono da considerare tossiche e impongono di continuare il trattamento con ac. folinico; è pure necessario alcalinizzare le urine con assunzione di bicarbonato sodico.

g) In donne in età fertile può essere indicato il trattamento anticoncezionale con estroprogestinici (Trinordiol® o Minulet® o similari). Dubbio è l'effetto protettivo sulla oogenesi.

h) La *cistite emorragica da ossazafosforine* (ciclofosfamide, ifosfamide, etc.) può essere evitata o controllata almeno in parte aumentando l'apporto idrico e somministrando gruppi tiolici, come il MFSNA (v.*; Uromitexan®, in linea generale una dose equivalente a quella di ossazafosforina).

i) Il *prurito* risente in genere favorevolmente della terapia antilinfomatosa; scarsamente efficaci sono gli altri medicamenti proposti (antistaminici, cimetidina, colestiramina, levopromazina, prometazina, clorpromazina).

l) L'ipercalcemia (v.*) non è frequente nei l., ma in talune forme, come l'ATLL, costituisce un evento pressoché costante e di cospicua rilevanza. La terapia si basa sulla eradicazione o la riduzione della massa neoplastica, sull'espansione della volemia mediante infusione di soluzione salina 0,9% in quantità variabile a seconda dello stato di idratazione del paziente (di solito 3L/die) associata a contemporanea infusione e.v. di pamidronato (Aredia®) (90 mg/24 h se calcemia > 3,0 mmol/L; 60 mg infusi in 8 h per calcemia < 3,0 mmol/L); in caso di ipercalcemia grave con sintomatologia neurologica si aggiunge calcitonina 8 U/kg i.m. ogni 6 h; i glucocorticoidi sono utili (in quanto inibiscono l'assorbimento intestinale di Ca) solo nei casi in cui l'ipercalcemia è vitamina D-mediata. La risposta favorevole a tale schema è in genere rapida (24 h) e il nadir dei valori calcemici si raggiunge in 5-7 giorni. L'eventuale insorgenza di segni di ipervolemia per eccessiva idratazione viene controllata con furosemide. In caso di fallimento si può ripetere lo schema con dosi maggiorate di pamidronato o si ricorre a terapie alternative con gallio nitrate o plicamicina (Mithramycin®). In condizioni di emergenza si procede alla dialisi.

m) La *neutropenia* da farmaci può essere corretta più o meno prontamente con l'impiego di fattori di crescita ematopoietica: G-CSF (Filgrastim; Granulokine®, Neupogen®; Lenograstim; Granocyte®); GM-CSF (Molgramostim; Mielogen®), impiegati alla dose di 4-8 µg/kg/die s.c., inizialmente almeno 24 h dal termine della chemioterapia citotossica (senza attendere il nadir dei polinucleati) e proseguendo finché la concentrazione ematica dei granulociti neutrofili non sia ritornata a livelli normali. L'uso dei fattori di crescita è finalizzato alla riduzione dei periodi di neutropenia iatrogena, di febbre e di processi infettivi, e non deve essere indiscriminato. Vi si ricorrerà soprattutto nei periodi intervallari tra i cicli, dopo la fine del primo in cui si sia riscontrata concentrazione di neutrofili ≤ 0,5 × 10⁹/L, evitando (eventualmente somministrare dosi ridotte a 150 µg/die o a giorni alterni) di superare concentrazioni di neutrofili di 16 × 10⁹/L; si sospenda il trattamento almeno 3 giorni prima del controllo emocromocitometrico e della ripresa dei citostatici.

n) Per l'anemia ci si avvale di solito dell'eritropoietina (v.*; v.**; Eprex®; Eritrogen®) 1000-5000 U s.c. a giorni alterni, benché la sua efficacia sia tuttora *sub judice*. Di qualche utilità è l'impiego degli androgeni e loro derivati ad effetto anabolizzante, soprattutto di fluoximisterone (Halotestin®), metenolone (Primobolan®), norandrosteronolone (Decadurabolin®). Il ricorso alle emotrasfusioni non è frequente.

o) Difficilmente la *piastrinopenia* può essere corretta. I fattori di crescita ematopoietica (G-CSF, GM-CSF) ed il danazolo (Danatrol®) sono scarsamente o per nulla efficaci. In situazioni di emergenza si ricorre alle trasfusioni di plasma arricchito di piastrine.

Sempre di qualche utilità i capillaroprotettori: vitamina C, etamsilato (Eselin[®], Dicynone[®]).

Valutazione dei risultati terapeutici

La valutazione della risposta al trattamento terapeutico è un momento importante dello studio del paziente linfomatoso. Dev'essere effettuata in due momenti del programma primario: dopo il completamento di metà del programma di induzione, e un mese dopo la conclusione di questa. Nel primo caso ci si prefigge di constatare il grado di riduzione delle localizzazioni linfomatose e di dedurre la sensibilità del linfoma alla terapia prescelta: una scarsa risposta favorevole o addirittura una progressione della malattia in corso di terapia può consigliare modificazioni posologiche dello schema originario o la sua sostituzione con presidi presumibilmente più attivi. Nel secondo caso si procede ad un bilancio della situazione mediante ristadiatione (*restaging*) della malattia con tutti gli esami più opportuni già impiegati in fase diagnostica, escludendo quelli invasivi se negativi all'inizio (eccetto la biopsia osteomidollare). Si ricorre alla laparotomia e alla splenectomia solo nei casi di SC I-IIA sopradiaframmatici sottoposti esclusivamente a RT IF o EF e in origine non splenectomizzati, se gli esami non invasivi lasciassero dubbi interpretativi circa la presenza di localizzazioni sottodiaframmatiche. In base ai reperti del *restaging* si programma la successiva condotta terapeutica (v. oltre). I criteri di valutazione della risposta alla terapia sono illustrati nella tab. XLIV. La presenza in LNH con RC clinica post-terapeutica, di reperti (soprattutto midollari) che facciano supporre l'esistenza di *malattia minima residua* può indurre ad un monitoraggio molecolare; di indubbia importanza può essere la ricerca di t(14;18) con PCR in casi di L. centrollicolari in apparente RC dopo CT. Si deve tuttavia tener presente che in linea generale il reperto di traslocazioni cromosomiche specifiche può talora non costituire un tassativo indizio di mancata eradicazione del L. (con conseguente

orientamento verso ulteriori aggressioni terapeutiche); non sono poche le documentazioni che talora si tratta di una «alterazione innocente», cui può anche non seguire recidiva del processo linfomatoso (Gribben, 1994).

STRATEGIA TERAPEUTICA

Le radiazioni ionizzanti sono il solo presidio terapeutico dei L. con potere sicuramente eradicante. Il loro effetto citocida è tuttavia circoscritto all'area direttamente irradiata ed il loro dosaggio è contenuto da non superabili limiti imposti dalla lesività esplicata anche sulle strutture normali contenute nel volume d'organo irradiato. Nella prassi clinica la RT coglie pertanto i migliori successi nel controllo di aree linfomatose distrettuali, mentre in stadi più avanzati di estesa diffusione in ambito linfatico e/o in sedi extralinfonodali, la possibilità di un controllo ubiquitario della proliferazione linfomatosa offre difficoltà talora insormontabili. La chemioterapia citostatica ha un potere citocida inferiore alle radiazioni, almeno in alcuni tipi di L., ma è idonea a controllare, spesso con efficacia, proprio i casi ampiamente disseminati: i suoi limiti sono costituiti dalla difficoltà a permeare grosse masse neoplastiche, spesso poco irrorate, e dalla lesività esercitata anche su organi e strutture normali.

L'opzione per la RT o la CT o per una terapia di combinazione (CT + RT) e la scelta dello schema presumibilmente ottimale, si basano sulla valutazione del *quadro anatomo-clinico* del processo linfomatoso e dei *fattori prognostici* presenti nel singolo caso.

In casistiche per lo più retrospettive l'analisi multivariata dei segni e sintomi presentati dalle numerose entità anatomo-cliniche dei L., ha consentito infatti di identificare fattori di vario ordine, clinici e biologici, che incidono sulla prognosi del processo neoplastico e sulle risposte, immediate e a lungo termine (*overall survival*, OS; *relapse free survival*, RFS; *progression free survival*, PFS; *freedom from progression*, FFP; *disease free survival*, DFS) alla terapia. Tra i *fattori più accreditati* figurano l'età, il sesso, la presenza di sintomi sistemici B, il *performance status*, condizioni di immunodeficienza, il tipo istologico, la sede e l'estensione del coinvolgimento linfonodale ed extralinfonodale, il volume della massa linfomatosa (complessivo o di singole localizzazioni), le concentrazioni sieriche di LDH e di sβ2microglobulina strettamente legate all'entità della massa neoplastica, nonché, nell'ambito di una stessa classe di L., alcune caratteristiche del fenotipo. Il significato ed il peso prognostico dei diversi parametri e la loro indipendenza reciproca sono stati oggetto di numerosi studi, che in questa sede non è possibile analizzare (cfr. in particolare Gobbi, 1990-1993; Diehl, 1996; Linch, 1996). I più importanti di tali fattori concorrono alla formulazione dell'indice prognostico internazionale (IPI) (v. sopra *Stadiation*, col. **3346).

Per la loro rilevanza pratica alcuni punti devono essere sottolineati. Già agli inizi dell'era polichemioterapica (anni '70) due parametri erano emersi per il loro particolare peso prognostico, il grado di disseminazione del processo linfomatoso (*stadio*) ed il grado di malignità istocitologica (*tipo istologico*), e si era notato (Mauri *et al.*, 1979) che nella MH lo stadio faceva aggio sull'oncotipo mentre l'opposto avveniva nei LNH. I buoni risultati terapeutici ottenibili con gli schemi recenti hanno successivamente attenuato nella MH l'impatto dei predetti (e di altri) fattori prognostici, cui ora si fa capo al fine di identificare la terapia ottimale, più che per prevedere la sopravvivenza causa-specifica.

Quanto ai LNH, sulla base di criteri di malignità istopatologica e clinica si è addivenuti ad una loro *classificazione in tre forme*, caratterizzate da diverso tipo di decorso e di

TAB. XLIV. CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

(Da Lister T. A. *et al.* (Costwolds Meeting), *J. Clin. Oncol.*, 1990, 7, 1930; modificata)

RC	(<i>remissione completa</i>): scomparsa completa, per almeno 4 settimane, di qualsiasi sintomo e di qualsiasi segno clinico o strumentale o biochimico misurabile, imputabile alla malattia quale si presentava prima dell'inizio della terapia; mancata comparsa di nuove lesioni; possono essere presenti reliquati o esiti attinenti alla terapia.
RP	(<i>remissione parziale</i>): riduzione di almeno il 50% della somma dei prodotti dei diametri massimi ortogonali di tutte le masse neoplastiche misurabili, confrontate con i reperti osservati pre-terapia, stabili da almeno 4 settimane, durante le quali non compaiono nuove lesioni. Coesistono scomparsa dei sintomi generali ed un obiettivo miglioramento delle lesioni o delle alterazioni non misurabili ma comunque clinicamente valutabili.
RC(m)	(<i>remissione completa incerta, in attesa di conferma</i>): scomparsa dei sintomi e segni clinici di malattia ma persistenza di alterazioni di dubbia natura degli indici aspecifici della fase acuta e di alterazioni radiologiche, specie in area mediastinica e retroriperitoneale (reperti Rx o TC, reperti linfografici).
RN	(<i>nessuna risposta, malattia stabile</i>): riduzione inferiore al 50% o aumento inferiore al 25% della somma dei prodotti dei diametri massimi ortogonali di tutte le lesioni misurabili, non comparsa di nuove lesioni per 8 settimane; persistenza dei sintomi generali.
Progressione o recidiva : incremento del 25% o più delle dimensioni di almeno una lesione o di nuove lesioni all'ingresso allo studio o, in pazienti rispondenti, rispetto al momento di massima regressione oppure comparsa di nuove localizzazioni tumorali o di sintomi generali.	

TAB. XLV. RAGGRUPPAMENTI CLINICI DEI LNH (CLASSIFICATI SECONDO LA REALC)

(da Armitage J. O. *et al.*, *Blood*, 1997, 89, 3909)

Neoplasie linfocitarie di linea B	Neoplasie linfocitarie di linea T/NK
A. Linfomi indolenti (sopravvivenza di pazienti non trattati, misurabile in anni)	
a. Linfomi/leucemie disseminati indolenti B-CLL/SLL/PLL L. linfoplasmacitico Tricoleucemia (HCL: <i>Hairy Cell Leukemia</i>) L. splenico della zona marginale/SLVL	T-CLL/PLL L. a grandi linfociti granulati (LGL)
b. Linfomi extralinfonodali indolenti L. extralinfonodale della zona marginale/MALT linfomi	Micosi fungoide
c. Linfomi linfonodali indolenti L. linfonodale della zona marginale L. a cellule centrollicolari (nodulari) L. a cellule del mantello (nodulari, a piccole cellule)	
B. Linfomi aggressivi (sopravvivenza di pazienti non trattati, misurabile in mesi)	
L. diffusi a grandi cellule di linea B (compresi taluni FCL e MCL)	L. a grandi cellule anaplastiche L. a cellule di linea T-periferica (T-PDL e «varianti specifiche»)
C. Linfomi/Leucemie altamente aggressivi (sopravvivenza di pazienti non trattati, misurabile in settimane)	
L. di Burkitt L/L linfoblastici a precursori di linea B	ATLL (HTLV-I+) L/L linfoblastici a precursori di linea T

versa sopravvivenza globale: *indolenti, intermedie ed aggressive* (così nelle classificazioni WF e UKC). Recentemente — con riferimento alla classificazione REAL — è stato proposto di distinguere nei LNH 3 gruppi in base alla sopravvivenza, misurabile in anni, mesi o settimane, di casi non trattati (tab. XLV) oppure in 4 gruppi in base alla frequenza di sopravvivenza (OS e FFS) a 5 anni in casi trattati secondo i criteri vigenti nel periodo 1978-1990, come si evince dalla tab. XLVI.

TAB. XLVI. GRUPPI PROGNOSTICI DI SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI PER TIPI ISTOLOGICI DI LNH (PAZIENTI TRATTATI SECONDO GLI ORIENTAMENTI TERAPEUTICI VIGENTI NEL PERIODO 1978-1990)

(Dati riferiti in Armitage J. O., for The NHL Classification Project, *Blood*, 1997, 89, 3909)

Gruppi di sopravvivenza a 5 anni	Diagnosi	Frequenza (%) di OS/FFS
A (> 70%)	ALCL T/null	77/58
	B-MZL, tipo MALT	74/60
	FCL, tutti i gradi	72/40
B (50-70%)	LPL	59/52
	B-MZL, tipo linfonodale	57/29
	CLL/SLL	51/25
C (30-49%)	MedLBC	50/48
	Burkitt-like	47/43
	DLBCL	46/41
	BL	44/44
D (< 30%)	MCL	27/11
	T-LbL	26/28
	PTCL (tutti i tipi)	25/18

ALCL, L. anaplastico a grandi cellule T/null; BL, L. Burkitt; CLL/SLL, L. linfocitica cronica/L. linfocitico a piccole cellule; DLBCL, L. diffuso a grandi cellule B; FCL, L. centrollicolare; LPL, L. linfoplasmacitico; MCL, L. a cellule mantellari; MedLBC, L. a grandi cellule B primario del mediastino; MZL, L. della zona marginale; PTCL, L. a cellule T-periferiche; T-LbL, L. linfoblastico a precursori T. OS, *overall survival*; FFS, *failure free survival*.

MALATTIA DI HODGKIN

Premessa

Il fine che ci si deve proporre nella terapia della malattia di Hodgkin (MH), e che in circa l'80% dei casi si può conseguire, è l'eradicazione del processo neoplastico e la guarigione del paziente. Il futuro dell'hodgkiniano riposa in buona parte sulla felice scelta e la corretta applicazione della *terapia di induzione primaria* applicata all'esordio clinico della malattia. Da più di un ventennio è infatti evidente che il risultato favorevole della terapia è strettamente correlato al rapido ottenimento di una RC con la terapia primaria. Una remissione, anche completa, raggiunta senza avere salvaguardato la *dose intensity* o espletando ulteriori schemi terapeutici dopo l'insuccesso del primo, non garantisce nella stessa misura una prognosi favorevole. Ciò non implica che la scelta debba obbligatoriamente cadere in ogni caso sullo schema terapeutico più aggressivo: la molteplicità delle situazioni anatomo-cliniche della MH all'esordio deve suggerire piuttosto approcci terapeutici diversificati, sì da graduare l'aggressività delle cure in ragione della gravità prognostica stimabile alla diagnosi, assicurando — a parità di efficacia antitumorale — la minore tossicità d'organo possibile e la migliore qualità di vita. Solo in ben definite circostanze si può rinunciare ad una terapia eradicante e ripiegare su un trattamento puramente palliativo o assumere un atteggiamento di attesa.

Si praticherà *terapia palliativa* qualora sia presumibile che gli effetti collaterali indesiderati saranno di gran lunga prevalenti sui benefici terapeutici: è il caso dell'età assai avanzata, dello scadente *performance status*, della grave insufficienza cardiaca, epatica, renale, respiratoria, e di una ridotta riserva midollare.

L'attesa può essere razionalmente valida quando eventi intercorrenti, ad es. una malattia infettiva acuta o la gravidanza (v. oltre), non permettano né la stadiazione approfondita né una terapia adeguata: si deve trattare solo di una dilazione di tempo, accettabile se non compromette le probabilità di successo terapeutico.

Diversi sono gli scopi ed i presidi terapeutici in successive fasi di malattia. Lo stato di *recidiva* o di *progressione di malattia* in corso di chemioterapia d'induzione richiede di riconsiderare l'esattezza della diagnosi e della estensione della malattia, nonché l'idoneità del regime terapeutico prescelto e la correttezza dell'applicazione; comporta generalmente un intervento terapeutico più aggressivo, peraltro non sempre destinato a pieno successo. Diverso ancora può essere il programma terapeutico in condizioni particolari, quali l'età *pediatrica* o quella *senile* e la *gravidanza* con malattia in atto (v. oltre).

Strategia terapeutica primaria (o di induzione)

I fattori prognostici che condizionano la scelta terapeutica all'esordio clinico della MH sono fondamentalmente l'estensione anatomica (stadio), il sottotipo istologico, il volume delle masse neoplastiche, l'età avanzata, la presenza di sintomi sistemici (B) e/o di infiltrazione midollare, l'elevata concentrazione sierica di LDH, la bassa concentrazione sierica di albumina, l'esistenza di anemia, linfocitopenia, cattivo PS. Dato il rilevante peso prognostico dello stadio, le linee direttive della strategia terapeutica primaria della MH fanno capitale riferimento a questo parametro. Attualmente la terapia primaria della MH è articolata in quattro livelli, definiti soprattutto in base all'estensione della malattia ed alla presenza o meno di fattori prognostici sfavorevoli (figg. 90-91).

Gruppo I

Concerne gli stadi iniziali (IA-IIA) a presentazione favorevole: età 15-65 anni, PS ECOG 0-3; coinvolgimento linfonodale sopradiaframmatico (< 3 sedi), non *bulk*, non ilare, non extralinfonodale. La RT EF allargata od anche la sTNI (dosaggio 40-46 Gy) costituiscono i presidi di elezione nei casi in stadio SP IA-IIA sopradiaframmatici, con sottotipo istologico LP o SN(I) e senza altri fattori di rischio. Eccellenti risultati si osservano soprattutto in donne, con stadio IA, sottotipo istologico LP: in tale situazione il rischio di diffusione sottodiaframmatica all'esordio di malattia è assai basso. Se invece la stadiazione è solo clinica (SC) e non vi sono fattori di rischio, è opportuno fare precedere alla RT (IF se è coinvolta una sola sede, negli altri casi EF o sTNI, dosi 36 Gy) una CT non eccessivamente mielo- ed organo lesiva, qual è lo schema VBM, ripetuto per 4-6 cicli. L'intervallo tra CT e RT dev'essere di almeno un mese. Tale combinazione non provoca danno alle gonadi, non sembra essere leucemogena, comporta tossicità polmonare per lo più modesta, correlata all'irradiazione del mediastino più che alla somministrazione di bleomicina (Bates *et al.*, 1994). Ancora minori effetti indesiderati sono stati notati impiegando 4 cicli dello schema VBMP, caratterizzato da un minore dosaggio di bleomicina e dalla aggiunta di prednisone: la sopravvivenza a 3

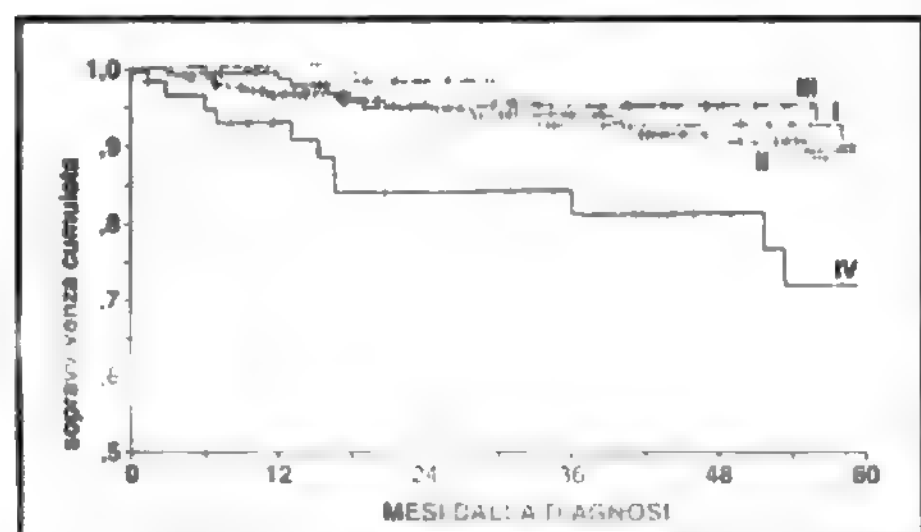


Fig. 90. Malattia di Hodgkin, sopravvivenza attuale a 60 mesi in base allo stadio.

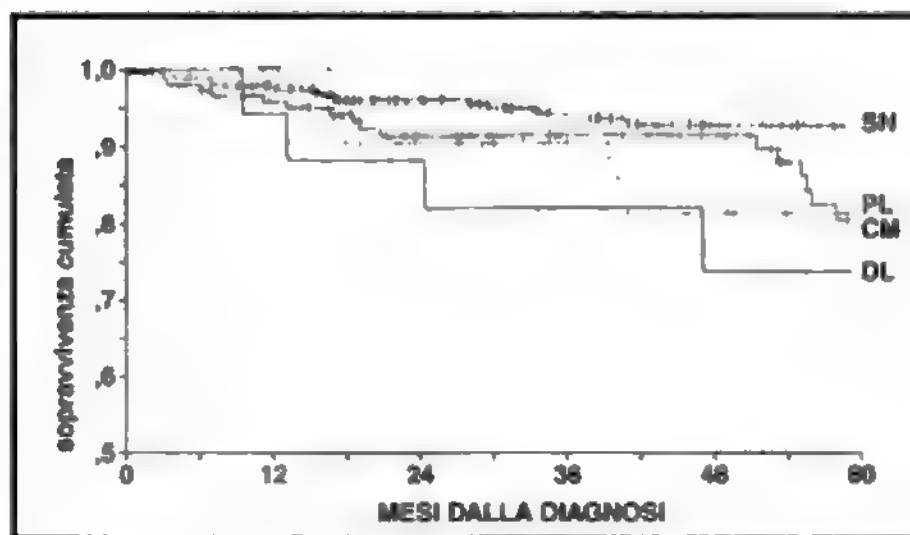


Fig. 91. Malattia di Hodgkin, sopravvivenza attuale per istotipo. Casistica personale (491 casi) 1985-1997.

anni è dell'89% e quella proiettata a 5 anni è dell'82% (Gobbi *et al.*, 1996a).

Questa è una prassi largamente seguita, ma vi sono studiosi (Longo *et al.*, 1991) che preferiscono evitare una terapia combinata CT + RT per le sequele a lungo termine che ne potrebbero derivare, e ricorrono alla sola CT, avvalendosi di schemi polichemioterapici di solito impiegati in stadi meno favorevoli, come MOPP o ABVD o MOPP/ABV ibrido o similari. I risultati immediati (RC) o a medio termine (RFS) sono sostanzialmente analoghi a quelli riferiti per lo schema VBM + RT.

Gruppo II

Concerne gli stadi iniziali (SC IA-IIA sopra- o sottodiaframmatici, SP IB-IIIB, I₁A, II₁A) a presentazione sfavorevole. Vi sono comprese situazioni diverse.

a) Casi (SP/SC) IA-IIA di ogni sottotipo istologico e con almeno uno dei seguenti fattori di rischio: *bulk* mediastinico, più di tre stazioni linfonodali coinvolte, massiva infiltrazione splenica (> 5 noduli o infiltrazione diffusa), presenza di localizzazione ilare o extralinfonodale, VES > 50 mm. Il German Hodgkin Study Group (GHSG) (Tesch *et al.*, 1996) considera tali casi quali stadio *intermedio* di MH e li sottopone ad una terapia a sandwich con 2 cicli di un regime MOPP-derivato (COPP) alternati a 2 cicli di ABVD, seguiti da RT EF (su *bulk* 40 Gy; a dosaggio ridotto, 20 Gy, sulle sedi clinicamente non coinvolte). La sopravvivenza globale a 7 anni è di circa l'85%, la RFS del 74%. Questo schema ha il vantaggio di ridurre la dose sia della CT che della RT: non presenta tuttavia risultati più brillanti di quelli ottenibili con altri schemi. Il GHSG tende ad inserire nel gruppo II pure gli SC IIB e IIIA non NS(II) né I.D, senza fattori di rischio: vengono anch'essi sottoposti ad analoga terapia combinata.

Nello stadio intermedio il GISL ha seguito negli anni 1988-1993 uno schema a sandwich consistente in 3 cicli di CT con CVPP (MOPP-derivato escogitato da Cooper *et al.*, 1980, in cui NH₂ e VCR sono sostituiti rispettivamente da CCNU e VBL), seguiti da RT EF e poi da altri cicli dello stesso schema chemioterapico iniziale (Gobbi *et al.*, 1996b). Si è ottenuta sopravvivenza a 5 anni dell'80%, con 10% di recidive. Dopo il 1993 il GISL ha sperimentato un regime imperniato sullo schema ABVD, di cui è stata largamente dimostrata la maggiore efficacia e la minore tossicità in confronto al MOPP: si attuano 4-6 cicli (a seconda dei risultati ottenuti alla fine del terzo ciclo) seguiti da RT IF 36 Gy (su aree *bulk* 40 Gy); l'efficacia appare sovrapponibile a quella del precedente regime.

b) Nei non frequenti (3-4%) stadi SP/SC IA-IIA sottodiaframmatici, di tutti i sottotipi istologici tranne SN(II) e DL, con assenza di fattori di rischio, si pratica CT con ABVD seguita da RT a Y rovesciata + milza.

Gruppo III

Concerne stadi avanzati (IIIA NS(II) o LD, IIIB, IVB/B). Alcuni, centratamente competenti praticano in stadio SP/IIIA la RT. L'esito è favorevole per quanto attiene alla frequenza di RC.

ma le recidive sono numerose, specie nello stadio III2A. Nella prassi abituale si ricorre invece all'uso della CT: ABVD (Bonadonna *et al.*, 1975); MOPP/ABVD (o ABV) alternato (Bonadonna *et al.*, 1986); MOPP/ABV/CAD alternato o ibrido (Gobbi *et al.*, 1993); Stanford V (Bartlett *et al.*, 1995). La successiva RT potrà essere proposta come IF, se vi sono localizzazioni *bulky* o masse residue o a lenta remissione dopo CT. I risultati ottenuti con tali schemi non sono profondamente diversi: quelli con MOPP/ABV/CAD ibrido appaiono molto soddisfacenti (RC 87%, DFS 79%, a 5 anni), con tossicità ematologica accettabile.

Gruppo IV

Concerne stadi avanzati molto sfavorevoli. Negli stadi III1B, III2B e nel IVB, con sottotipi istologici aggressivi (MC, LD) e con almeno 2 fattori di rischio (localizzazione mediastinica *bulky*, LDH elevata, 2 o più localizzazioni extra-linfonodali, localizzazione inguinale, almeno 2 sedi extralinfonodali interessate, anemia) è necessaria una CT aggressiva (MOPP/ABVD alternato 4 + 4 cicli, MOPP/ABV/CAD ibrido o varianti, Stanford V), completata da RT IF sulle aree *bulky* presenti all'esordio o sulle localizzazioni residue dopo CT. I risultati sia immediati che a distanza risultano più favorevoli con gli schemi maggiormente aggressivi: nei casi che dopo 4 cicli ottengono una risposta favorevole è stato proposto (Federico *et al.*, 1996) di optare — in sostituzione del proseguimento con altri 4 cicli dello stesso schema terapeutico — per una megachemioterapia con trapianto autologo di cellule staminali da midollo osseo o da sangue periferico (*autologous stem cell transplantation*, ASCT). È prematuro esprimere un giudizio circa la validità della scelta ma i primi dati sono promettenti.

Trattamenti successivi alla terapia d'induzione (recidive comprese)

Completata la terapia primaria si valutano i risultati secondo i criteri precedentemente illustrati (tab. XLIV). Se la risposta è stata del tutto favorevole (RC) ci si limita a sottoporre il paziente a controlli periodici non invasivi: ogni 3 mesi nei primi due anni, in seguito ogni 6 mesi, fino al 5° anno. Se invece la risposta sarà stata meno favorevole (RP) o del tutto insoddisfacente, bisognerà procedere ad un ulteriore approccio terapeutico, con schemi diversi e non *cross-resistenti*, come del resto si attuerà in caso di recidiva dopo RC (v. oltre).

I pazienti con malattia di Hodgkin, adeguatamente trattati, vanno incontro a RC nell'80-90% dei casi ma tra questi circa il 30% presenta successivamente una recidiva, per cui la DFS a lungo termine si aggira sul 60-70%. In complesso circa 1/3 dei pazienti hodgkiniani è candidato ad una terapia di terza linea dopo quella primaria di induzione (Urba e Longo, 1992).

È importante distinguere tra *recidive precoci* (entro 12 mesi dalla conclusione della terapia primaria) e *recidive tardive*, e tra recidive localizzate o pluristazionali; il trattamento infine è diverso a seconda che la terapia primaria si sia avvalsa di RT o di CT o di terapia combinata, e se la

TAB. XLVII. RISULTATI DELLA TERAPIA PRIMARIA IN MH, SC I-IIA (SOPRADIAFRAMMATICI)

Terapia	RC %	DFS % (5 anni)	OS % (5 anni)
RT-IF ¹	100	58	59
RT-EF ¹	100	70	80
RT(sTNI)-VBM ²	98	88	89

¹ Gospodarowicz M., *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1992, 22, 859

² Gobbi P. G. per il GISL, *J. Clin. Oncol.*, 1996a, 14, 527

TAB. XLVIII. RISULTATI OTTENUTI CON ALCUNI SCHEMI DI POLICHEMIOTERAPIA PRIMARIA IN MH, SC III-IVB

[Casistica del Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi - GISL (anni 1988-1996)]

Terapia	RC %	DFS % (5 anni)	OS % (5 anni)
MOPP	67	50	66
ABVD	82	61	73
MOPP/ABVD alternati	83	65	75
MOPP/ABVD/CAD ibrido	93	94 (3 anni)	95 (3 anni)

recidiva sia insorta in sedi già irradiate (*bulky* o non *bulky*) oppure in distretti precedentemente non irradiati.

Nei casi con *recidiva distrettuale in sede non precedentemente irradiata* si può procedere a RT IF se non si ritiene che il paziente sia candidato a ulteriore CT. Negli *altri casi* si ricorre invece ad una policheioterapia. Nei soggetti giovani viene sempre più spesso proposto un trattamento chemioterapico ad alte dosi con successiva reinfusione di cellule staminali autologhe (ASCT). Negli *altri casi* si ricorre alla CT a dosi standard. In caso di *recidiva tardiva* si può ripetere lo stesso schema impiegato nella terapia primaria: se l'effetto è favorevole, significa che è stata conservata l'originaria chemiosensibilità; più spesso si impiegano schemi CT diversi e non *cross-resistenti* rispetto al primario. È stato osservato che il MOPP è più efficace nel controllare le recidive successive ad ABVD, che non viceversa (Canellos *et al.*, 1992), e ciò perché l'espressione del gene *MDR* (v. LEUCEMIE**, col. **3152) non riguarda la sensibilità agli alchilanti. La sopravvivenza mediana dall'epoca della recidiva è superiore ai 4 anni e nel 25-35% dei casi si ottiene guarigione. Se invece la *recidiva* è *precoca* si applicano sempre schemi diversi da quello iniziale (e verso questo non *cross-resistenti*) e in genere più aggressivi. Tra questi figurano il MOPP/ABVD alternato o ibrido, il MABOP e il MOPP/ABV/CAD ibrido (o sue varianti), se già non impiegati in fase di induzione. La sopravvivenza mediana in questi casi è però piuttosto breve (2-6 anni dall'epoca della recidiva).

La CT aggressiva, di tipo sopramassimale associata ad ASCT, è indicata in caso di manifesto insuccesso per *refrattarietà alla terapia primaria* o con *progressione di malattia* in corso di questa o manifestatasi dopo una fugace regressione del processo. La prognosi in tali casi è estremamente riservata poiché la sopravvivenza mediana dalla ripresa di malattia è di poco superiore ad 1 anno.

Le figg. 90-91 e le tabb. XLVII-L illustrano i risultati terapeutici ottenuti nella casistica personale seguendo i criteri dianzi esposti.

TAB. XLIX. MALATTIA DI HODGKIN, SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE A 60 MESI IN BASE ALLO STADIO. CASISTICHE PERSONALI OSSERVATE IN TRE DIVERSI PERIODI

Stadio	Anni 1970-79 casi 764	Anni 1980-84 casi 242	Anni 1985-97 casi 491
I	76%	89%	88%
II	74%	87%	89%
III	61%	81%	89%
IV	31%	61%	71%

TAB. I. MALATTIA DI HODGKIN: SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE A 60 MESI IN BASE ALL'ISTOTIPO. CASISTICHE PERSONALI OSSERVATE IN TRE DIVERSI PERIODI

Istotipo	Anni 1970-79 casi 560	Anni 1980-84 casi 242	Anni 1985-97 casi 491
LP	68%	91%	93%
NS	71%	85%	81%
MC	50%	81%	80%
LD	30%	58%	74%

Terapia in particolari situazioni cliniche

Malattia di Hodgkin in età pediatrica

Nella infrequente MH in età pediatrica la strategia terapeutica viene impostata con criteri analoghi a quelli illustrati per la malattia dell'adulto, con alcuni adeguamenti posologici al fine di ridurre gli effetti tardivi della RT e della CT pur senza sacrificare alte frequenze di sopravvivenza (Schellong *et al.*, 1995).

Le sequele indesiderate della terapia sono, come nell'adulto, l'interstiziopatia polmonare, la miocardiopatia con infarto, i tumori secondari. L'infertilità (soprattutto azoospermia) si manifesta negli adolescenti come negli adulti ma non è ben noto quali siano le conseguenze gonadiche tardive della terapia effettuata in età pre-puberale. Alcuni eventi sono propri della giovane età dei pazienti: a) la riduzione o l'arresto della crescita scheletrica provocata dalla irradiazione con alte energie è più grave nei bambini di età inferiore ai 6 anni e nell'età puberale: le alterazioni più frequenti sono ipoplasia della clavicola, deformità del rachide e della gabbia toracica; b) la splenectomia effettuata in età inferiore ai 6 anni predispone ad infezioni (anche meningiti e setticemie) dovute per lo più allo *Streptococcus pneumoniae*. In questi casi sono indispensabili la sistematica e prolungata somministrazione di penicillina ritardo e la vaccinazione antipneumococcica (peraltro di non costante efficacia) e anti-*Haemophilus influenzae*. Questo problema è del resto superato giacché dal 1990 la splenectomia a fini di stadiazione in pazienti in età pediatrica non viene più eseguita.

Malattia di Hodgkin nell'età senile

L'età senile costituisce un fattore di rischio nella prognosi della MH e una remora all'attuazione di metodi invasivi di stadiazione e di terapie aggressive (compreso il trapianto midollare). Non tutti gli AA tuttavia sono concordi nel fissare il livello della senilità: > 60-65 anni per alcuni, > 70 per altri. Nella prassi clinica ha comunque maggior valore l'età biologica di quella anagrafica. La valutazione del PS può in tal senso essere di aiuto. L'età senile come fattore di rischio attiene soprattutto alla maggiore lesività d'organo e alla minore capacità di recupero del midollo osseo dopo l'impatto citostatico. Ciò impone spesso di dare nell'anziano la preferenza a schemi di CT meno aggressivi e di ricorrere più di frequente a fattori di stimolo ematopoietico. Il regime CT con VBMp + RT IF, di solito riservato agli stadi limitati, può essere utilmente impiegato nell'anziano anche in presentazioni diverse da quelle del primo gruppo.

Malattia di Hodgkin in gravidanza

L'insorgenza di MH in corso di gravidanza pone al curante delicati problemi sia in fase diagnostica che terapeutica. Tra i mezzi di diagnosi strumentale sono ovviamente controindicati gli esami radiologici estesi e la scintigrafia, mentre è consentito di eseguire la radiografia del torace con schermatura dell'addome. Le decisioni terapeutiche sono determinate dal periodo di gravidanza in cui la MH viene diagnosticata. Si dovrà prendere in considerazione l'aborto se la diagnosi è posta nel primo trimestre, e se per quadro clinico, sottotipo istologico, stadio clinico la malattia appare particolarmente aggressiva. Negli altri casi, con gravidanza più avanzata, si opterà per un atteggiamento di attesa, se non pregiudica la prognosi della gestante. Tuttavia, qualora per la gravidanza l'aspettativa si ritenesse necessaria una condotta terapeutica attiva, è pos-

sibile praticare RT sovradiafammatica schermando il feto, e si può ricorrere anche alla CT. Molti reperti depongono per una notevole resistenza del feto, dopo il 2° mese di gestazione, all'azione mutagenica e citostatica delle radiazioni e degli antiblastici; il problema appare però ancora largamente aperto ed ogni presa di posizione comporta una quota di soggettività e di aleatorietà. È indispensabile che la paziente gravida sia consapevole della questione e venga coinvolta in ogni decisione del curante. Nelle gravidanze in donne sottoposte in passato a CT e/o RT per MH e da tempo in RC, si può prospettare l'opportunità di un esame citogenetico del feto, mediante amniocentesi o prelievo biotico di villi coriali.

LINFOMI NON-HODGKIN

I presidi terapeutici impiegati nei l. non-Hodgkin (LNH) sono essenzialmente la radio- e la chemioterapia; ma con maggiore frequenza di quanto non accada nella MH, alla CT vengono talora associati modulatori biologici (IFN, interleuchine) e l'immunoterapia. La chirurgia riveste un ruolo importante solo qualora sia indicata l'exeresi di localizzazioni extralinfonodali (milza, stomaco, etc.) uniche o prevalenti e — nel l. di Burkitt — quale mezzo per ridurre il volume di masse linfomatose addominali.

La strategia terapeutica è precipuamente correlata al grado di malignità istologica e biologica del processo morboso (v. quanto esposto nella trattazione generale), mentre lo stadio vi influisce solo nell'ambito di ciascuna forma di l. Distinguiamo pertanto i l. in indolenti (a basso grado di malignità), aggressivi e molto aggressivi (v. tab. XLV e fig. 92).

Linfomi indolenti di basso grado di malignità

Dato il decorso inizialmente paucisintomatico, la lunga sopravvivenza, la frequente età avanzata dei pazienti, la strategia terapeutica di questi processi è molto varia: si va da un'astensione all'esordio da interventi terapeutici attivi, all'uso di terapie non molto aggressive (anche a costo di rinunciare al conseguimento di RC), fino all'uso delle alte dosi. Invero l'applicazione di schemi terapeutici tendenzialmente eradicanti consentono in genere RC più o meno prolungata ma non incidono in modo rilevante sulla sopravvivenza dei pazienti. È stato infatti documentato che negli ultimi 30 anni la sopravvivenza globale non è sostanzialmente migliorata (Horning, 1994), e in uno studio retrospettivo ventennale di l. follicolari, quella mediana si aggira sui 9 anni (Johnson *et al.*, 1995). L'obiettivo principale della terapia è quindi di restituire il paziente alla normalità e di garantire il più a lungo possibile una buona qualità di vita, ma difficilmente si otterrà la guarigione e quasi tutti i pazienti muoiono del loro l. (fig. 93).

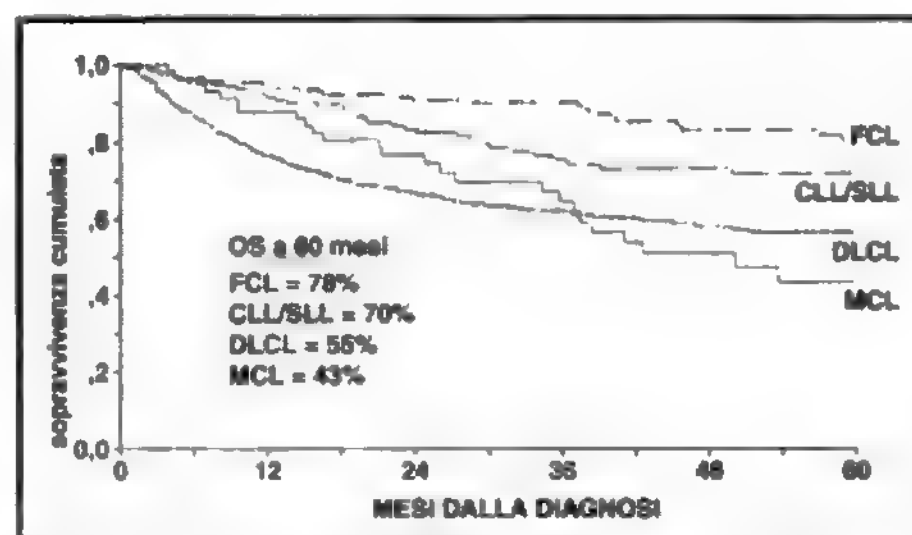


Fig. 92. LNH a cellule B: sopravvivenza attuariale in base al sottotipo OS. Over survival.

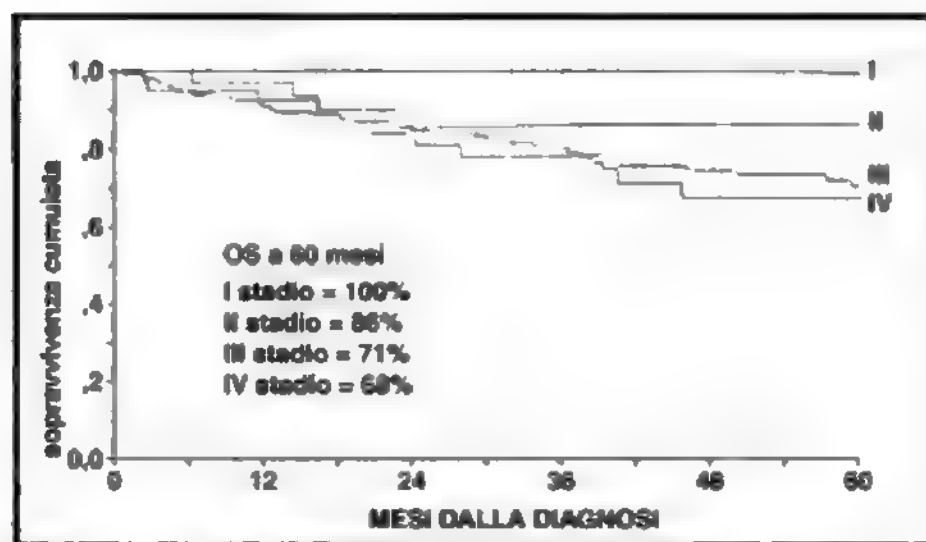


Fig. 93. LNH indolenti (WF: istotipi A-B-C-D): sopravvivenza attuariale in base allo stadio. OS: overall survival.

Stadi limitati

Negli stadi I-II si può ricorrere alla sola RT o ad una terapia di combinazione: la RT IF (35 Gy) è tuttavia palesemente inadeguata e non evita recidive a distanza ed anche locali, tranne nei casi, insoliti, con neoplasia circoscritta di piccolo volume (diametro inferiore a 5 cm): in tal caso la sopravvivenza mediana a 15 anni è dell'85%. In alternativa alla RT può essere attuata l'exeresi chirurgica, se la massa è facilmente aggredibile. Vi sono scarsi dati circa l'esito della RT in stadio I_e. Buoni risultati sono conseguibili con TNI (dose 30-35 Gy): la sopravvivenza globale a 10 anni è del 68%, con DFS 54% (Rosenberg 1985), la «progression free survival» (PFS) si aggira sul 40%, ma in ogni momento, anche nelle fasi più tardive, si possono osservare recidive (con un tasso costante del 10%/anno), sicché nella curva di sopravvivenza mai si configura un plateau. Non è ancora accertato se la sola CT (monochemioterapia con alchilanti o con analoghi delle purine, od anche semplici schemi di polichemioterapia contenenti antracicline) o l'associazione CT-RT dia negli stadi I-II risultati migliori e che si possano osservare effetti eradicanti.

Stadi avanzati

Negli stadi III-IV che caratterizzano la maggior parte dei l. indolenti, le strategie terapeutiche possono essere diverse. In particolare nella CLL si ritiene utile un *iniziale astensionismo*, che consente di valutare la velocità di progressione del processo (tempo di raddoppio della concentrazione ematica dei linfociti) e di programmare più razionalmente la successiva terapia. Anche in casi di FCL nodulare il gruppo di Stanford (Horning, 1994) sostiene la legittimità della cosiddetta «watch and wait policy» nelle forme con malattia stabile in assenza di fattori prognostici sfavorevoli (localizzazioni bulky, LDH elevata), e di iniziare la terapia attiva solo in fase di successiva progressione di malattia: la terapia può allora essere differita di anni senza compromettere la durata della sopravvivenza globale, che è mediamente superiore a 5 anni (Young *et al.*, 1988).

Efficace ma raramente eradicante è il ricorso alla *monochemioterapia*, in cui si impiegano alcuni alchilanti: clorambucil o ciclofosfamide, associati o meno a prednisone. Nella CLL ha largo impiego soprattutto il clorambucil, che viene somministrato in cicli quindicinali (10 mg/die + Prednisone 50 mg/die, per os) o — a dosi minori — in modo continuativo fino alla normalizzazione dei reperti ematici e clinici o all'insorgenza di manifestazioni tossiche. La frequenza di RC cliniche varia tra il 20 e il 60% con terapie protratte per 12-18 mesi, in seguito si osserva lenta ripresa del processo e talora refrattarietà agli antiblastici; tardivamente può instaurarsi trasformazione in l. ad alta malignità (sindrome di Richter). Remissioni cliniche (talora RC) si ottengono nella CLL e in FCL ed in altri l. a bassa malignità, anche con altri antiblastici tollerabili per lungo tempo: sono derivati della *Vinca*, antibiotici antraciclinici, analoghi della pirimidina e delle purine (F-ara, DCF, 2 CDA). Molto interesse suscita attualmente la fludarabina (v. **), dotata di un complesso meccanismo d'azione: si impiega generalmente alla dose di 25 mg/m²/die in infusione lenta (30 min) per 5 giorni, in cicli più volte ripetuti a 3-4 settimane di distanza. In CLL

all'esordio, la F-ara dà risposte favorevoli in più del 70% dei casi. Può provocare tuttavia mielosoppressione, fino alla necrosi midollare fulminante (Aboulafia e Demirel, 1995), grave immunodepressione, anemia emolitica autoimmune; particolarmente frequenti e temibili sono le complicanze infettive (citomegalovirus, *Pneumocystis carinii*, aspergillosi) non necessariamente in rapporto a neutropenia (Zinzani *et al.*, 1993).

La monochemioterapia viene tuttavia impiegata raramente in l. diversi da CLL/SLL, specie quale trattamento di prima scelta, mentre ha indicazioni qualora si opti per una terapia puramente palliativa. Più generale è il ricorso alla *polichemioterapia*, che viene attuata con numerosi schemi più o meno aggressivi. Ci si può avvalere di schemi semplici a base di alchilanti (CVP, COP) o di alcaloidi della *Vinca*, a cicli con intervalli di 3 settimane. Taluni ritengono vantaggioso ricorrere fin dall'esordio a terapie più aggressive (CHOP, ProMACE/CytaBOM, schemi comprendenti analoghi delle purine, mitoxantrone, prednisone). Benché tra i pazienti sottoposti a terapie aggressive si noti nell'immediato elevata frequenza di RC e più lunghi periodi di FFP, la OS è simile nei due tipi di strategia terapeutica: sopravvivenza mediana di circa 10 anni, 20% sopravvissuti a 20 anni.

L'impiego di monoterapia blanda o di terapia intensiva intermittente nella fase di mantenimento successiva all'induzione, probabilmente non migliorano la prognosi dei pazienti con l. a basso grado (Mc Laughlin *et al.*, 1993).

La mancata risposta anche agli schemi più aggressivi comporta prognosi assai riservata. Nei casi refrattari a ripetuti cicli di CT o con reiterate recidive a breve scadenza (non insoliti in FCL anche in assenza di trasformazione istologica in forme di maggiore grado di malignità), si può attuare — all'insegna di «*more is better*» — la terapia sopramassimale micloablattiva (TBI + CTX ad alte dosi) seguita da ASCT. L'esito felice di tale presidio è in stretto rapporto alla manipolazione *in vitro* del midollo (o del sangue) (*purging*) prima della infusione, e al grado di tolleranza del paziente: comporta mortalità precoce nel 5% dei casi, prolungata DFS, ma è dubbio che influisca significativamente sulla sopravvivenza globale; inoltre è spesso causa, tardivamente, di mielodisplasia e di leucemie secondarie. La terapia trapiantologica ha le migliori indicazioni nella malattia minima residua dopo CT standard.

In fasi protratte di malattia, nel 40% dei casi si osserva trasformazione in l. a grandi cellule: la CT tradizionale è di rado efficace, e spesso deludenti sono pure le terapie più aggressive e l'approccio trapiantologico.

Tra i *presidi biologici* il più usato è l'IFN. IFN α linfoblastoide e ricombinante inducono lentamente remissioni incomplete in molti l. di basso grado: un effetto del genere si riscontra nel 30-40% dei casi di FCL nodulare, e una somministrazione continuativa risulta di qualche efficacia anche in l. T-periferici cutanei. Notevole è l'efficacia dell'IFN α nella tricoleucemia (v. *), anche quale unico presidio terapeutico, purché a lungo protratto (v. col. *7258). Modesti, ma non trascurabili, sono i risultati ottenibili con IFN in terapie di mantenimento dopo CT.

Le varie *terapie immunologiche* sono tuttora in fase sperimentale (v. sotto).

Linfomi aggressivi

La strategia terapeutica è diversa nelle *forme localizzate* in ambiti limitati rispetto a quelle *avanzate* di malattia disseminata e diversi sono pure i risultati terapeutici (fig. 94).

Stadi limitati

Una estesa esperienza conseguita con varie forme di terapia (solo RT IF o a campi estesi fino alla TNI, sola CT blanda o aggressiva, terapia di combinazione) induce ad optare, nella maggior parte dei casi a sviluppo localizzato (stadi I e II), per una polichemioterapia aggressiva, completata eventualmente da RT IF (40 Gy) su masse linfomatose originariamente bulky o residue dopo CT. La sola RT costituisce di rado la terapia di prima scelta, benché in casi selezionati (SP I e II di minima estensione, esenti da caratteri peggiorativi) siano state osservate sopravvivenze a 10 anni nel 70-90% e talora guarigioni.

La terapia primaria con schemi tipo CHOP o ProMACE/CytaBOM e senza terapia di mantenimento, è seguita quasi sempre da RC e da lunga sopravvivenza: in stadio I quasi il 100% a 10 anni, 80% in stadio II (Connors *et al.*, 1987).

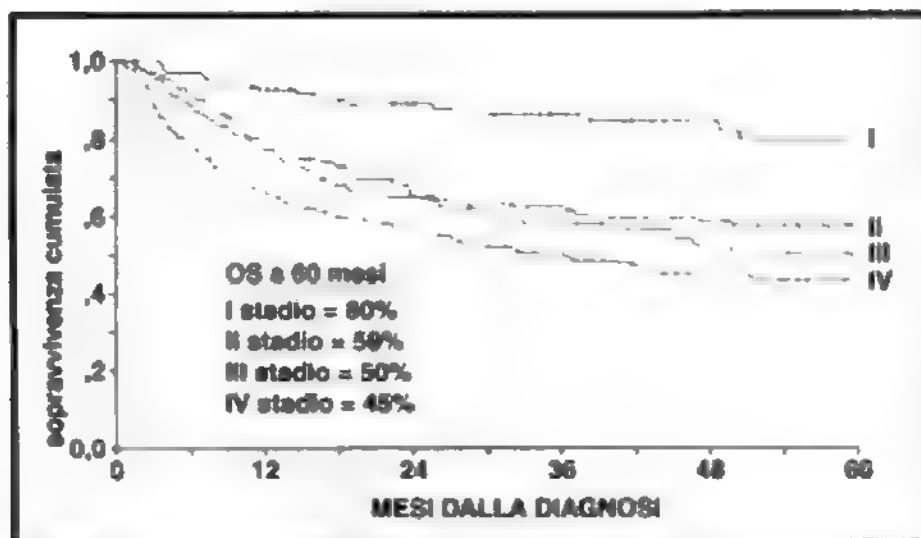


Fig. 94. LNH aggressivi (WF: istotipi F-G-H-I): sopravvivenza attuariale in base allo stadio. OS: overall survival.

Stadi avanzati

Fin dagli anni '70 si è optato per una CT aggressiva: lo schema CHOP (Jones *et al.*, 1979) rappresenta tuttora lo schema con cui quelli elaborati successivamente vengono confrontati. I risultati non sono tuttavia del tutto soddisfacenti (RC nel 50-75% dei casi) come non lo sono quelli ottenuti con altri schemi di prima generazione (C-MOPP, BACOP) ed anche di seconda (I-CHOP, ProMACE/MOPP, M-BACOD, COPBLAM) che hanno tuttavia fornito risultati migliori (RC circa 70%, lunga sopravvivenza in circa il 45% dei casi). Ciò ha indotto ad applicare regimi cosiddetti di terza generazione, quali ProMACE/CytaBOM, BACOP, F-MACHOP, COPBLAM III, MACOP-B, LNH 81, ed altri schemi orientati particolarmente alla terapia dei LNH aggressivi dell'anziano (v. tab. XL). Con tali schemi si ottengono RC in oltre il 70% dei casi, sopravvivenze di circa il 50% a 5 anni con configurazione di un plateau. Tutti questi schemi sono caratterizzati da rapida alternanza di antitumorali diversi e da elevata dose-intensity. Gli effetti sono quindi notevoli, ma la mortalità iatrogena non è trascurabile (3-5%), le gravi mucositi si aggirano sul 50% ed anche la tossicità generale ed ematologica è rilevante. Il gruppo EORTC (Carde *et al.*, 1991) è propenso ad integrare con RT uno schema polichemioterapico a 6 farmaci, comprensivo di antracicline. Nei L. aggressivi in stadio avanzato il GISEL propone una condotta terapeutica definita in base all'età ed al rischio, stabilito dall'Indice Prognostico Internazionale. Nelle forme a rischio basso o basso-intermedio (IPI 0-2) si propongono 6 cicli di ProMACE/CytaBOM (PC) seguiti da RT (30-36 Gy) sulle masse residue; nelle forme a rischio intermedio o intermedio-alto (IPI 3-5) si propone un trattamento ad alte dosi già all'esordio nei soggetti con meno di 55 anni, con 8 cicli di PC seguiti da RT sulle masse residue o inizialmente bulky. Anche se è possibile ottenere RC in oltre il 70% dei casi, le recidive sono ancora molto frequenti, ed interessano circa il 40% dei casi. Le remissioni durature e quindi le probabili guarigioni vere e proprie sono nell'ordine del 35-45% dei casi a rischio intermedio o alto. In soggetti anche molto anziani con DLCL in stadio avanzato, O'Reilly *et al.* (1993) vantano buoni risultati con lo schema P/DOCE (tab. XL): RC 62%, 8% di mortalità terapia-correlata, sopravvivenza attuariale (OS) 45% (con FFS 41%).

Un recente lavoro di Miller *et al.* (1998), basato sull'impiego di tre cicli di CHOP seguito da radioterapia involved-field, ha dato risultati superiori agli otto cicli di solo CHOP nel trattamento dei L. non-Hodgkin localizzati di grado medio ed elevato.

Le terapie alternative, biologica (IFN, interleuchine), immunologica e immunoradiologica, sono state finora deludenti.

Linfomi altamente aggressivi

Comprendono un gruppo limitato di linfomi/leucemie sia di linea B che T, spesso contraddistinte anche da processi di meningosi linfomatosa e da localizzazioni cerebrali. Specie nei L. linfoblastici con localizzazioni testicolari è pertanto opportuno procedere alla profilassi del S.N.C., con schemi

di tipo LSA₂-L₂ ed altri analoghi a quelli impiegati nelle leucemie acute (v. LEUCEMIE**). Le localizzazioni meningeo o cerebrali sono scarsamente controllabili a lungo termine: terapia intratecale, RT cranica, corticosteroidi danno qualche risultato momentaneo, quasi mai guarigione.

Nei L. linfoblastici T, a crescita esponenziale e spesso a decorso rapidamente fatale, si impiegano gli stessi schemi in uso per la LAL-T, ottenendo remissioni in circa il 75% dei casi se il paziente è in età infantile-giovanile e non presenta fattori sfavorevoli (interessamento midollare esteso e/o del S.N.C., LDH elevata, masse linfomatose bulky); se invece si tratta di adulti e ancor più se vi sono fattori prognostici sfavorevoli, scarsa è la risposta alle terapie — anche a quelle sovramassimali seguite da ASCT — e la frequenza di RC è inferiore al 50%. Particolarmente frequente e temibile se non adeguatamente trattata è la sindrome da lisi tumorale (col. **3437).

Il L. di Burkitt guarisce talora con la sola somministrazione di ciclofosfamide ad alte dosi, se la massa linfomatosa è circoscritta e suscettibile di exeresi chirurgica. Per le localizzazioni intratecali è indicato il ricorso all'Ara-C, e in ogni caso è necessario procedere a CT aggressiva con rigoroso rispetto della dose-intensity. Con uno schema comprendente CTX, MTX e VCR, si è ottenuto l'82% di DFS a lungo termine e Magrath (1996), con intensa terapia di combinazione, vanta guarigioni in circa il 90% dei casi.

In tutti i L. aggressivi non responsivi alla chemioterapia tradizionale, si potranno prendere in considerazione schemi alternativi, quali MIPE, HDS, MAD/BEAM, CODOX-M, CTV ed altri (v. tab. XLI). Tali schemi sono tutti notevolmente tossici e consentono risposte favorevoli (RC o RP) nel 35-40% dei casi.

Tutti i tentativi terapeutici espletati nella Adult T leukemia/lymphoma (ATLL) hanno deluso (Takatsuki, 1995), sia che si ricorra a IFN ed a VCR o CTX o etoposide, sia che si opti per schemi aggressivi con antracicline associate ad altri antitumorali, del tipo MACOP-B o ProMACE/CytaBOM oppure che si pratichi terapia di combinazione: la frequenza di RC difficilmente supera il 30%, le forme acute hanno sopravvivenza mediana di 2-6 mesi e quella comprensiva di tutti i sottotipi di decorso è, a 5 anni, del 20%. Solo le forme smoldering mostrano sopravvivenza più lunga (63% a 4 anni). Tentativi con terapie biologiche, quali AcMo anti-Tac combinati con immunotossina (Px. exotaxin) o con isotopi radioattivi (⁹⁰Y) hanno avuto qualche parziale successo nell'immediato (RC + RF circa 30%, persistenti per 1-30 mesi) (Waldman, 1995).

Indirizzi terapeutici in particolari linfomi non-Hodgkin extralinfonodali primari

I LNH a sede primaria extralinfonodale non sono insoliti: la loro frequenza si aggira sul 25%, e le sedi più colpite sono tonsille, anello di Waldeyer, tubo digerente, cute ed encefalo. Si tratta sia di forme ad alto grado (molto spesso a grandi cellule) che a basso grado di malignità (in preponderanza di tipo MALT).

Linfomi gastrici

Dibattuto è il problema se la terapia di elezione debba essere chirurgica o quella di combinazione (CT + RT). La gastrectomia è stata spesso eseguita a scopo diagnostico oltre che terapeutico, nella presunzione che si trattasse di un carcinoma, ma se la diagnosi viene posta correttamente sulla base dei rilievi gastroscopici e biotipici, ci si può orientare a seconda della natura e del grado di malignità del processo e della eventuale presenza di disseminazione nel perigastrio o in altre aree (linfonodi, fegato, pancreas), il cui interessamento costituisce un fattore prognostico peggiorativo (Morton *et al.*, 1993). Non sembra giustificato addurre quale indicazione alla gastrectomia il timore di gravi sanguinamenti, la cui frequenza (5-10% dei casi) è pari e forse inferiore a quella della mortalità attribuibile all'intervento in sé. La gastrectomia nei malati di basso grado è seguita nell'80-90% dei casi da prolungate remissioni (Taal *et al.*, 1993); la RT, da sola o successiva a gastrectomia consentita, in L. aggressivi ma localizzati, il 70% di sopravvivenza a 5 anni in stadio I ed il 37% in stadio II (Taal *et al.*, 1989). La CT o la terapia di combinazione danno risultati altrettanto favorevoli della gastrectomia (Gobbi *et al.*, 1990), con il 67% di sopravvivenza a 5 anni (Brinker e d'Amore, 1995). L'insorgenza di recidive tar-

dive a distanza dall'area irradiata è indice che il solo trattamento locale non è valido. In casi di l. aggressivi si impongono CT o terapia di combinazione: i risultati sono meno brillanti che nelle forme a basso grado.

In presenza di MALT-LNH gastrici indolenti, con positività dell'*H. pylori*, non va mai trascurato un tentativo preliminare con antibiotici (amoxicillina, claritromicina ed omeprazolo), che in stadi iniziali può provocare in più del 50% dei casi regressione anche totale e duratura del linfoma (Roggero *et al.*, 1995).

Linfomi intestinali

I l. di linea B del tenue, di basso grado, associati ad IPSID compreso il cosiddetto l. mediterraneo (*α-chain disease*), vanno trattati, se localizzati e in fase ancora precoce di evoluzione, con antibiotici intestinali: si ottiene talora regressione parziale o totale, ma spesso è necessario procedere successivamente alla resezione chirurgica ed alla CT: la sopravvivenza a 5 anni è inferiore al 50%. Nei più frequenti l. aggressivi di linea B ed in tutti i l. a fenotipo T (compresi quelli associati ad enteropatia, ETCL), si interviene come nei l. linfonodali di analogo tipo e grado di malignità. L'utilità dell'excisi chirurgica non può essere negata (Rossi *et al.*, 1993). Il rischio di perforazione e di sanguinamento, forse sovrastimato, e la coesistente sindrome di malassorbimento (che peggiora il *performance status*), impongono talora di praticare solo CT coadiuvante: la sopravvivenza a 1 anno è del 75% nei linfomi B, del 25% in quelli di linea T. Comunque tuttavia nei l. ad istologia aggressiva si procede ad una terapia di combinazione, con CT più breve (3 cicli) in stadio I e più lunga (6 cicli) in stadio II: nel primo caso si sono osservate RC a 42 mesi nel 100% dei casi, nel secondo RC nel 77%, con 57% di RFS a 31 mesi (Bron *et al.*, 1996). Il confronto fra trattamento chirurgico e conservativo non evidenzia significative differenze di decorso: vi è elevata frequenza di guariti (70-75%) tra i pazienti in stadio I trattati con terapia chirurgica talora associata a CT adiuvante, e 40-50% in pazienti in stadio II.

Negli insoliti l. del colon e del retto ci si orienta terapeuticamente in modo analogo.

Linfomi cutanei

I l. cutanei di linea B primari e di basso grado sono spesso caratterizzati da protratto decorso indolente e da scarsa propensione alla disseminazione: rappresentano una sorta di controparte cutanea dei MALT-LNH del tubo digerente. Ciò consente spesso di astenersi a lungo da ogni terapia attiva generale e di trattarli solo con RT distrettuale (*electron beam*) o con blanda monochemioterapia: si ottengono spesso RC, seguite peraltro da recidiva, talora localizzata in altre aree del mantello cutaneo. I l. di linea T di basso grado richiedono maggiore attenzione e terapia più attiva. Nei l. diffusi a grandi cellule la CT aggressiva è d'obbligo.

I casi di *micosi fungoide* (e di *sindrome di Sézary*) vanno trattati in modo diverso a seconda della fase evolutiva della malattia e della sua estensione. In fase di l. limitato il processo è potenzialmente curabile, ma gli stadi avanzati non sono facilmente controllabili ed il fine del terapeuta talora non va oltre quello di conseguire un sollievo sintomatico, una regressione parziale delle manifestazioni cutanee, eventualmente una RC clinica. I presidi più largamente adottati sono i medicamenti topici (corticosteroidi, mecloretamina, BCNU), la fototerapia U.V.B. e la fotochemioterapia PUVA, l'irradiazione con fotoni o con *electron beam*, la CT sistematica con singoli antitumorali (alchilanti, analoghi delle purine, antracicline, etoposide, metotrexato) o con polichemioterapia e/o IFN. In fase sperimentale sono i retinoidi, la ciclosporina, l'aciclovir, la timopentina, alcune interleuchine (IL-2), gli anticorpi monoclonali, il trapianto autologo di cellule staminali. La fotochemioterapia extracorporea (ECP, 6 cicli seguiti da terapia di mantenimento per 6 mesi) dà qualche risultato favorevole nella *sindrome di Sézary* (Vowels *et al.*, 1992). Sono state vantate risposte favorevoli ma in genere incomplete (RP) in meno del 50% dei casi, la frequenza di DFS a 5 anni è del 10-20%. Nelle fasi di *micosi fungoide extracutanea* il trattamento è in genere solo palliativo e deve essere strettamente individualizzato: si giova per lo più di schemi comprendenti alchilanti, antracicline, corticosteroidi.

Linfomi cerebrali

Il l. cerebrale primario è divenuto più frequente negli ultimi anni ed appare spesso in rapporto ad infezione da EBV e ad immuno-

depressione congenita o acquisita, soprattutto AIDS-correlata; non è molto responsivo alle terapie. Queste si compendiano soprattutto in CT con antitumorali atti a superare la barriera emato-encefalica (Ara-C ad alte dosi e in rapida infusione, MTX ad alte dosi, idarubicina, nitrosouree ad alte dosi), eventualmente dopo «rottura osmotica» della barriera cerebrale. Alla CT si fa spesso seguire RT ad alte dosi e vi si associa desametasone soprattutto in funzione antiedema. La terapia esclusivamente radiologica (RT erogata sull'intero encefalo) è alquanto deludente (sopravvivenza mediana di circa 1 anno). Se il liquor è indenne da infiltrazione linfomatosa è dubbio che la terapia intratecale (Ara-C, MTX) sia vantaggiosa. Gli effetti favorevoli della terapia di combinazione sono spesso drammatici nell'immediato e la sopravvivenza mediana è di 2-5 anni, ma raramente si osserva eradicazione: la recidiva, o meglio, la progressione più o meno precoce del l., è la regola, e la curva di sopravvivenza non configura mai un *plateau*. Nell'immunodepresso HIV+ la sopravvivenza è assai breve (2,5 mesi) mentre nell'immunocompetente supera i 18 mesi (Fine e Mayer, 1993). L'aggressione chirurgica ha importanza solo ai fini diagnostici, in casi con localizzazione encefalica primaria.

Bibliografia

- Aboulafia D. M., Demirer T., *Leuk.-Lymphoma*, 1995, **19**, 181-184.
 Bartlett N. L., Rosenberg S. A., Hoppe R. T., *J. Clin. Oncol.*, 1995, **13**, 1080-1083.
 Bates N. P., Williams M. V., Bessel E. M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 288-296.
 Brinker H., d'Amore F., *Leukemia Lymphoma*, 1995, **18**, 281-288.
 Bron D., Monfardini S., Sacco C. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1996, **7** (suppl. 3), 129 (Abstr 477).
 Canellos G. P., Anderson J. R., Propert K. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1478-1484.
 Dana B. W., Dahlberg S., Bahrat N. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 644.
 Devereux S., Cotter F. E., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9** (4), 819-834.
 De Vita V., Serpick A., Carbone P. P., *Ann. Int. Med.*, 1970, **73**, 281.
 Diehl V. ed., *Hodgkin's Disease*, *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9** (3).
 Federico M., Cio V., Carella A. M., *Leukemia*, 1996, **10** (suppl. 2), S68-S71.
 Fine U. A., Mayer R. J., *Ann. Intern. Med.*, 1993, **119**, 1093.
 Gobbi P. G., Dionigi P., Barbieri F. *et al.*, *Cancer*, 1990, **65**, 2528-2536.
 Gobbi P. G., Pieresca C., Cavanna L. *et al.*, *Haematologica*, 1996b, **81**, 503-512.
 Gobbi P. G., Pieresca C., Federico M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 712-719.
 Gobbi P. G., Pieresca C., Frassoldati A. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1996a, **14**, 527-533.
 Gribben J. C., *J. Clin. Oncol.*, 1994, **12**, 1531-1534.
 Horning S. J., *Blood*, 1994, **83**, 881-884.
 Jelic S., Frino O., Jovanovic V. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1996, **7** (suppl. 3), Abstr 188.
 Johnson P. W. M., Rohatiner A. Z. S., Whelan J. S. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1995, **13**, 160-167.
 Lichter A. S., *Radiation Therapy*, in Abeloff M. D., Armitage J. O., Lichter A. S., Niederhuber J. E. eds., *Clinical Oncology*, 1995, Churchill Livingstone Edinburgh, 219-263.
 Linch D. C. ed., *Non Hodgkin's Lymphomas*, *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9** (4).
 Longo D. L., Glatstein E., Duffley P. L. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1991, **9**, 906-917.
 Magrath I. T., Adde M., Shad A. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1996, **14**, 925-934.
 Mauri C., Perugini S., Silingardi V. *et al.*, *Malattia di Hodgkin e linfomi non-Hodgkin*, Relazione, 80° Congr. Soc. It. Med. Int. Palermo, 1979.
 Mauri C., Silingardi V., Federico M. eds., *La malattia di Hodgkin*, 1987, Mucchi ed., Modena.
 McLaughlin P., Cabanillas F., Hagenmeister F. B. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1993, **4**, 205.
 Miller Th. P. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339**, 21-26.
 Morton J. E., Leyland M. J., Vaughan Hudson G. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1993, **67**, 776.
 Roggero E., Zucca E., Pinotti G. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1995, **122**, 767-769.
 Rossi A., Rohatiner A. Z. S., Lister T. A., *Ann. Oncol.*, 1993, **4**, 802-803.
 Schellong G., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9** (4), 619-634.
 Schnell R., Barth S., Diehl V., Engert A., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, **9** (4), 573-593.

- Silingardi V., Federico M., Cavanna L. et al., *Leukemia Lymphoma*, 1995, 17, 313-326.
 Taal B. G., Burges J. M. V., van Heerde P. et al., *Ann. Oncol.*, 1993, 4, 839.
 Tesch H., Sieber M., Diehl V., *Baillière's Clinical Haematology*, 1996, 9 (4), 543-551.
 Urban W. J., Longo D. L., *N. Engl. J. Med.*, 1992, 326, 678-687.
 Vowels B. R., Cassin M., Boupal M. H. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 1992, 98, 686.
 Waldmann T. A., White J. D., Carrasquillo J. A. et al., *Blood*, 1995, 86, 4063-4075.
 Zinzani P. L., Lauria F., Rondelli D. et al., *Ann. Oncol.*, 1993, 4, 575-578.
 Zuckerman K. S., *Semin. Oncol.*, 1994, 21 (suppl. 1), 59-64.

MAURI CARLO, VERA CIÒ, MASSIMO FEDERICO

IMMUNOTERAPIA

Generalità

I primi tentativi di utilizzare anticorpi nella terapia contro il cancro risalgono alla fine dell'Ottocento (cfr. Silverstein, 1989). Tuttavia, solo con l'avvento della tecnologia degli ibridomi (Köhler e Milstein, 1975), si è potuto esplorare il potenziale terapeutico di anticorpi monoclonali contro cellule tumorali (v. MONOCLONALI ANTICORPI*). L'immunoterapia passiva con anticorpi monoclonali (v. MONOCLONALI ANTICORPI**) nativi (non-coniugati) ha portato solitamente a risposte di tipo incompleto e di breve durata. La dipendenza dell'attività anti-tumorale degli anticorpi nativi dalla loro capacità di attivare i meccanismi citotossici endogeni (complemento e/o cellule effettrici) rende conto degli scarsi effetti osservati. Nel tentativo di migliorarne il potenziale tumoricida, gli anticorpi monoclonali sono stati quindi coniugati con agenti tossici (immunotossine [v.*]) o radioisotopi (radioimmunoconiugati [v.**]) (Grossbard et al., 1992) (fig. 95).

V. anche TUMORI**, immunoterapia dei tumori.

Immunotossine

Le immunotossine sono prodotti ibridi di sintesi che consistono di un anticorpo specifico per un dato antigene bersaglio, legato chimicamente ad una potente tossina di origine vegetale o batterica (Vitetta et al., 1987; Frankel, 1988; Grossbard et al., 1992; Vitetta et al., 1993; Pai e Pastan, 1993; Vallera, 1994; Pasqualucci et al., 1995a).

Le tossine vegetali sono state quelle maggiormente im-

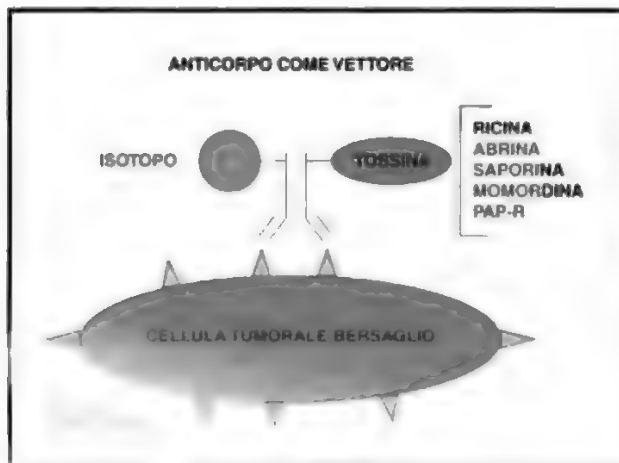


Fig. 95. Le cellule tumorali bersaglio possono essere eliminate con anticorpi legati a tossine (alcune delle quali sono di origine vegetale).

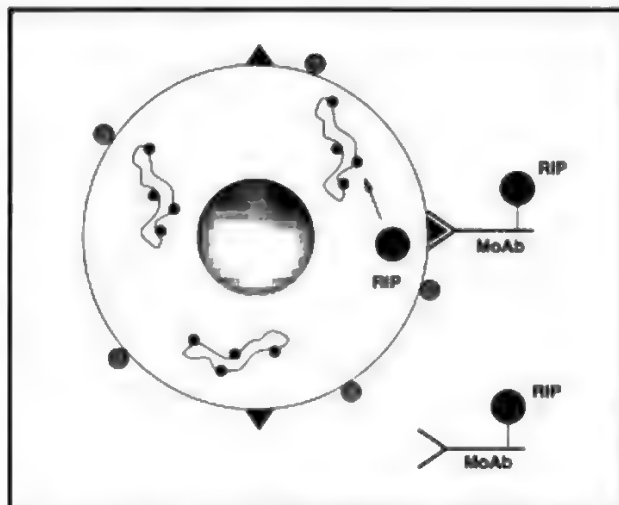


Fig. 96. Meccanismo d'azione delle immunotossine contenenti RIP. L'azione citotossica si esplica attraverso le seguenti tappe: a) legame dell'immunotossina all'antigene bersaglio (▲) sulla superficie delle cellule tumorali; b) internalizzazione del complesso; c) scissione della componente anticorpale da quella tossica; d) trasferimento della tossina al compartimento ribosomiale dove essa determina il blocco della sintesi proteica a cui segue la morte cellulare (cfr. testo). MoAb indica l'anticorpo monoclonale; RIP indica la tossina vegetale.

piegate in clinica. Esse sono proteine inattivanti i ribosomi (RIP) che esistono in natura in due forme: RIP di tipo 1 e di tipo 2 (Stirpe et al., 1992; Stirpe e Barbieri, 1996). Queste ultime, il cui prototipo è la ricina, sono tossine complete (olotossine) contenenti due catene peptidiche A e B. La catena A, quella enzimaticamente attiva, è legata tramite ponti disolfuro alla catena B che è in grado di riconoscere i residui di galattosio presenti sulle proteine di membrana della maggioranza delle cellule animali, favorendo così la traslocazione della catena A nel citoplasma dove essa esercita la sua azione citotossica. Le RIP di tipo 1 (saporina, momordina, PAP-S, etc.) sono emittossine che contengono soltanto la catena A e sono facilmente purificabili in elevate quantità dai semi di diverse specie di piante (ad es. *Saponaria officinalis*) (Stirpe e Barbieri, 1996).

Le immunotossine contenenti ricina mancano di specificità poiché sono in grado di legarsi (attraverso la catena B) ai recettori per la tossina presenti su tutte le cellule animali. Questo problema può essere superato legando covalentemente all'anticorpo la catena A della ricina, precedentemente separata dalla catena B e poi deglicosilata (Thorpe et al., 1988; Ghetie et al., 1991; Vitetta et al., 1993), o la ricina intera, previo blocco del sito di legame della catena B per il galattosio (cosiddetta ricina bloccata) (Lambert et al., 1991). Un approccio alternativo prevede l'uso di RIP di tipo 1 difettive per la catena B ma contenenti la catena A funzionalmente attiva (Stirpe et al., 1992; Uckun et al., 1992).

In genere, le immunotossine contenenti RIP vegetali agiscono sulle cellule eucariotiche inattivando irreversibilmente la subunità ribosomiale 60S e impedendone il legame al fattore di allungamento 2 (*Elongation Factor 2*) (Endo et al., 1987) (fig. 96). Queste sostanze sono estremamente potenti, come dimostrato dal fatto che l'introduzione di poche molecole di ricina nel citoplasma può determinare la morte cellulare (Eklund et al., 1980).

Alcuni prerequisiti importanti dovrebbero essere soddi-

sfatti perché una immunotossina possa essere impiegata in clinica. In primo luogo, è necessario che l'antigene bersaglio sia fortemente espresso sulla superficie delle cellule neoplastiche, ma assente o poco espresso nei tessuti umani normali (Falini *et al.*, 1992a). Le cellule tumorali bersaglio dovrebbero inoltre essere accessibili all'immunotossina. A questo riguardo, le emopatie maligne (linfomi e leucemie) appaiono bersagli più adatti dei tumori solidi, dal momento che questi ultimi sono generalmente caratterizzati da scarsa vascolarizzazione ed elevata pressione interstiziale. Una volta avvenuto il legame dell'immunotossina con le cellule tumorali, essa deve essere internalizzata ed indirizzata al compartimento ribosomiale dove può esercitare il suo effetto citotossico (Grossbard *et al.*, 1992; Valleria, 1994). Un altro fattore importante è rappresentato dall'emivita sierica dell'immunotossina che dovrebbe essere abbastanza lunga da garantire un effetto citotossico adeguato.

Negli ultimi cinque anni sono state impiegate diverse immunotossine dirette contro antigeni B e T linfoidi per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin (Vitetta *et al.*, 1991; Grossbard *et al.*, 1992; Amlot *et al.*, 1993; Sausville *et al.*, 1995) e della malattia di Hodgkin (Engert *et al.*, 1990; Falini *et al.*, 1992b; Falini *et al.*, 1995; Barth *et al.*, 1996). Da questi studi clinici sono emersi alcuni problemi di tossicità legati all'impiego delle immunotossine. L'effetto collaterale più importante (non previsto da studi preclinici) è risultato la cosiddetta *Vascular Leak Syndrome* (VLS). Il meccanismo patogenetico della VLS non è completamente noto, ma sembra legato ad un danno dell'endotelio vascolare mediato direttamente o indirettamente dalla tossina. Non è altresì chiaro quale ruolo possano svolgere i glicocorticoidi nella prevenzione o nel trattamento della VLS.

In presenza di malattia avanzata, le immunotossine hanno in genere dato esito a risposte cliniche di tipo parziale e transitorio limitate a una piccola quota di pazienti. Tali risultati sono attribuibili ad una serie di fattori che includono: a) la notevole massa tumorale che preclude l'efficiente penetrazione di questi composti ad alto peso molecolare; b) l'incapacità di somministrare più dosi dell'immunotossina per lo sviluppo di anticorpi dell'ospite nei confronti sia dell'anticorpo monoclonale murino che della tossina; e c) la presenza *ab initio* o l'emergenza nel corso della malattia di cloni neoplastici antigene-negativi che sfuggono all'azione dell'immunotossina.

Possibili soluzioni a questi problemi sono: a) l'impiego delle immunotossine per il trattamento della malattia minima residua dopo chemioterapia convenzionale o autotrapianto di midollo osseo (cosiddetta immunoterapia adiuvante) (Grossbard *et al.*, 1993; Grossbard *et al.*, 1994; Pasqualucci *et al.*, 1995b); b) umanizzazione delle immunotossine; e c) superamento della eterogeneità fenotipica mediante impiego di *cocktail* di immunotossine.

Radioimmunoterapia

La radioimmunoterapia ha per scopo quello di veicolare, tramite il vettore anticorpale, un isotopo radioattivo sulla cellula tumorale bersaglio. Gli isotopi esplicano la loro azione citotossica emettendo radiazioni a distanza [0,8 mm per lo iodio-131 (^{131}I), 5 mm per l'ittrio-90 (^{90}Y)] che danneggiano il DNA (Grossbard *et al.*, 1992).

Non è, pertanto, richiesta la diffusione del radioimmunoconjugato (v. RADIOIMMUNOCONIUGATI**) attraverso la massa tumorale né la sua endocitosi da parte delle cellule neoplastiche, perché si abbia un effetto citotossico.

Grazie a queste proprietà dei radioisotopi (irradiazione a distanza), la radioimmunoterapia fornisce una valida soluzione al problema della eterogenea espressione antigenica nell'ambito della popolazione tumorale (fig. 97).

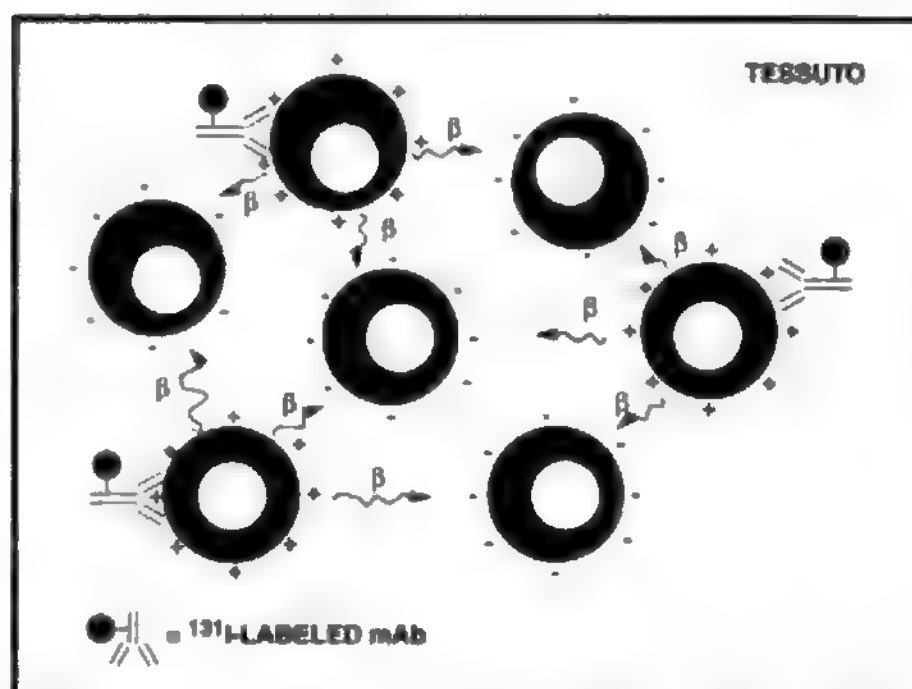


Fig. 97. Meccanismo d'azione dei radioisotopi. Il tessuto tumorale è solitamente composto da cellule neoplastiche antigene-positive (+) e antigene-negative (-). Solo le cellule maligne esprimenti l'antigene (+) saranno raggiunte dal radioimmunoconjugato ma, grazie alla capacità dei radioisotopi di emettere radiazioni β (β) a una certa distanza, anche le cellule tumorali antigene-negative (-) verranno irradiate e distrutte. Il problema della eterogeneità fenotipica della popolazione tumorale viene così ad essere superato.

Il radioisotopo maggiormente impiegato è stato lo ^{131}I che emette radiazioni β e γ e richiede una protezione appropriata per evitare gli effetti indesiderati di una irradiazione corporea totale (determinata dalle radiazioni γ). Almeno da un punto di vista teorico, l' ^{90}Y sembrerebbe un radioisotopo più adatto dello ^{131}I , dal momento che emette solo radiazioni β a breve emivita (circa 64 ore). Tuttavia, esistono ancora problemi di coniugazione di tale isotopo all'anticorpo.

I l. rappresentano un bersaglio ottimale per la radioimmunoterapia data la loro spiccata radiosensibilità e la disponibilità di una varietà di anticorpi monoclonali diretti contro vari antigeni associati a molecole di differenziazione linfoidi. Kaminski *et al.* (1993) hanno somministrato anticorpi anti-CD20 coniugati con ^{131}I a 10 pazienti affetti da linfomi B a basso grado di aggressività refrattari a regimi di chemioterapia convenzionale. La somministrazione di basse dosi di ^{131}I -anti-CD20 (20-30 mCi ogni settimana) è stata in grado di indurre una qualche risposta clinica, solitamente di tipo parziale, in 6 dei 10 pazienti trattati. Risultati ancora più incoraggianti, cioè una elevata percentuale di remissioni complete, sono stati ottenuti somministrando a pazienti affetti da linfomi B alte dosi di ^{131}I -anti-CD20 (fino a 800 mCi) seguite da *rescue* midollare con cellule staminali (Press *et al.*, 1996). L'efficacia terapeutica dei radioimmunoconjugati appare condizionata da una serie di fattori che includono il tipo di antigene bersaglio, l'affinità anticorpale, l'entità della massa tumorale, la presenza di splenomegalia rilevante e gli elevati livelli di antigeni circolanti (Goldenberg *et al.*, 1995).

Ulteriori studi clinici controllati sono necessari per stabilire se la radioimmunoterapia abbia o meno dei vantaggi rispetto alla radioterapia convenzionale.

Vaccini anti-idiotipo

Recentemente, sono state adottate strategie per indurre una risposta anticorpale dell'ospite nei confronti delle cellule tumorali. Esse si basano sulla somministrazione di determinanti idiotipici corrispondenti alla regione variabile

(V) delle immunoglobuline di superficie delle cellule B linfomatose, che rappresentano esempi di antigeni tumore-specifici (George e Stevenson, 1989; Kaminski *et al.*, 1987; Kwak *et al.*, 1992). Proteine di fusione idiotype/GM-CSF sembrano più immunogeniche dell'idiotype da solo (Tao e Levy, 1993). Purtroppo, la difficoltà di preparare vaccini proteici, specifici per ogni singolo paziente, ha rallentato l'applicazione clinica della metodica.

Un'affascinante alternativa all'immunizzazione con proteine è costituita dai vaccini a DNA (Stevenson *et al.*, 1995). Questi sono plasmidi semplici, contenenti la regione variabile delle immunoglobuline, che possono essere transfettati *in vivo* (sottocute o intramuscolo) al fine di indurre la formazione di anticorpi anti-idiotype (Hawkins *et al.*, 1993). Gli animali rispondono in maniera diversa alla immunizzazione con proteine o DNA. Infatti, l'immunizzazione con proteine presumibilmente determina la presentazione dell'antigene nel contesto della classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) attraverso la via esogena, mentre l'immunizzazione con DNA ha per effetto la presentazione dell'antigene nel contesto della classe I e II del MHC poiché l'immunoglobulina è sia prodotta per via endogena che secreta. Uno dei problemi connessi all'impiego di vaccini a DNA *in vivo* è la produzione continua nel tempo di antigene (come frammento variabile a singola catena o scFv) che rappresenta un ostacolo all'instaurarsi di una immunità protettiva, probabilmente perché la continua secrezione di antigene è in grado di bloccare l'attività anticorpale attraverso la formazione di immunocomplessi. In futuro sarà, pertanto, necessario regolare la secrezione dell'antigene nonché le vie di processazione dell'antigene stesso per ottenere la massima efficacia dai vaccini prodotti.

Nei modelli animali, l'immunizzazione con vaccini proteici o a DNA è risultata in una risposta anticorpale specifica, che ha determinato la protezione del topo dalla successiva somministrazione intraperitoneale di cellule tumorali (George *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1994; Syrengelas *et al.*, 1996).

L'unica esperienza clinica in questo campo è rappresentata da pazienti affetti da l. B a basso grado di malignità che, dopo chemioterapia convenzionale, sono stati sottoposti a vaccinazione con il relativo idiotype specifico. Dai dati fin qui acquisiti, sembra che: a) circa il 50% dei pazienti con buona risposta alla terapia convenzionale sia in grado di montare una risposta anticorpale anti-idiotype; b) il gruppo di pazienti che ha manifestato una risposta anti-idiotype abbia un vantaggio significativo in termini di sopravvivenza e di FFP (*Freedom From Progression*) rispetto al gruppo non responsivo (Levy *et al.*, *International Workshop on Idiotype Vaccination in Lymphoproliferative Disorders*, Turin, 1996).

Bibliografia

- Amlot P. L., Stone M. J., Cunningham D. *et al.*, *Blood*, 1993, **82**, 2624.
- Barth S., Schnell R., Diehl V. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1996, **7**, (Suppl. 4), 135.
- Chen T. T., Tao M. H., Levy R., *J. Immunol.*, 1994, **153**, 4775.
- Fiklid K., Olsnes S., Pihl A., *Exp. Cell Res.*, 1980, **126**, 321.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 1018.
- Imbert A., Burrows F., Jung W. *et al.*, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 84.
- Palini B., Flenghi L., Fedeli L. *et al.*, *Brit. J. Haematol.*, 1992a, **82**, 38.
- Palini B., Bolopnesi A., Flenghi L. *et al.*, *Lancet*, 1992b, **339**, 1195.
- Palini B., Pileri S., Pizzolo G. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 1.
- Frankel A. E., *Immunotoxins*, 1988, Kluwer Academic Press, Boston.
- George A. J. T., Folkard S. G., Hamblin I. J. *et al.*, *J. Immunol.*, 1988, **6**, 2168.
- George A. J. T., Stevenson F. K., *Intern. Rev. Immunol.*, 1994, **4**, 1.

- Ghetie V., Thorpe P., Ghetie M. A. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1991, **142**, 223.
- Goldenberg D. M., Larson S. M., Reisfeld R. A. *et al.*, *Immunology Today*, 1995, **16**, 261.
- Grossbard M. L., Press O. W., Appelbaum F. R. *et al.*, *Blood*, 1992, **80**, 863.
- Grossbard M. L., Gribben J. G., Freedman A. S. *et al.*, *Blood*, 1993, **81**, 2263.
- Grossbard M. L., O'Day S., Gribben J. G. *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. (ASCO)*, 1994, **13**, 293.
- Hawkins R. E., Zhu D., Oveck M. *et al.*, *Blood*, 1993, **83**, 3279.
- Kaminski M. S., Kitamura K., Maloney D. G., Levy R., *J. Immunol.*, 1987, **138**, 1289.
- Kaminski M. S., Zasadny K. R., Francis I. R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 459.
- Kohler G., Milstein C., *Nature*, 1975, **256**, 495.
- Kwak L. W., Campbell M. J., Czerwinski D. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1209.
- Lambert J. M., Goldmacher V. S., Collinson A. R. *et al.*, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 6236.
- Pai L. H., Pastan I., *JAMA*, 1993, **269**, 78.
- Pasqualucci L., Flenghi L., Terenzi A. *et al.*, *Haematologica*, 1995a, **80**, 546.
- Pasqualucci L., Wasik M., Teicher B. A. *et al.*, *Blood*, 1995b, **85**, 2139.
- Press O. W., Eary J. F., Martin P. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 1996, **7**, 33.
- Sausville P. A., Headlee D., Stetler-Stevenson M. *et al.*, *Blood*, 1995, **85**, 3457.
- Silverstein A. M., *A History of Immunology*, 1989, Academic Press, San Diego.
- Stevenson F. K., Zhu D., King C. A. *et al.*, *Immunol. Rev.*, 1995, **145**, 211.
- Stirpe F., Barbieri L., *FEBS Letters*, 1986, **195**, 1.
- Stirpe F., Barbieri L., Battelli M. G. *et al.*, *BioTechnology*, 1992, **10**, 405.
- Syrenelas A. D., Chen T. T., Levy R., *Nature Med.*, 1996, **2**, 1038.
- Tao M., Levy R., *Nature*, 1993, **362**, 152.
- Thorpe P. E., Wallace P. M., Knowles P. P. *et al.*, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 6396.
- Uckun F. M., Manivel C., Arthur D. *et al.*, *Blood*, 1992, **79**, 2201.
- Vallera D. A., *Blood*, 1994, **83**, 309.
- Vitetta E. S., Fulton R. J., May R. D. *et al.*, *Science*, 1987, **238**, 1098.
- Vitetta E. S., Stone M., Amlot P. L. *et al.*, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 4052.
- Vitetta E. S., Thorpe P. E., Uhr J. W., *Immunology Today*, 1993, **14**, 252.

BRUNANGELO PALINI, ARCANGELO LISO,
LEONARDO FLENGHI, ADELMO TEREZI E LAURA PASQUALUCCI

LINFORITICOLOSI BENIGNA DA INOCULAZIONE:

V. LINFADENITI INFETTIVE DISTRETTUALI SUPERFICIALI*, malattia da graffio di gatto (*4623-4631); GRAFFIO DI GATTO, MALATTIA DI* (*2541-2546).

LINGUAGGIO [v. vol. VIII, coll. 2026-2045; Agg. I, coll. *4665-4672]

LINGUAGGIO E MODELLI CONNESSIONISTICI

Negli ultimi anni i modelli connessionistici dell'apprendimento del linguaggio hanno suscitato grande interesse presso gli psicologi, i linguisti e i filosofi. L'aggettivo «connessionistici», reintrodotto da Feldman e Ballard (1982) ma usato fin dalla prima metà di questo secolo, sta ad indicare che questi modelli si ispirano ad un approccio *subsymbolico* basato sull'utilizzo di reti neurali (V. RETI NEURALI ARTIFICIALI**).

Molto sinteticamente si può dire che il termine «reti neurali» indica in generale dei sistemi (simulabili tramite apposito software o realizzati fisicamente tramite un opportuno hardware) composti da unità e da linee di connessione tra queste unità. Ogni unità (chiamata anche «nodo» o «neurone») è un dispositivo ingresso-uscita che, in funzione dei segnali ricevuti in ingresso (i quali possono derivare da stimolazioni esterne o da segnali provenienti da altre unità), dà luogo ad un'uscita o «stato di attivazione». La legge che stabilisce il modo con cui l'uscita dipende dai segnali ricevuti in ingresso viene denominata «funzione di attivazione». Generalmente, in una data rete, essa è la stessa per tutte le unità. L'attivazione prodotta da un'unità può essere trasmessa, attraverso le linee

di connessione, agli ingressi di altre unità. L'intensità con cui il segnale da un'unità viene trasmesso ad un'altra è determinata da un numero associato alla linea di connessione tra la prima e la seconda. Questo numero è chiamato «peso» o «coefficiente di connessione» associato alla linea in questione. Se esso è positivo, la connessione viene chiamata «eccitatoria», se è negativo «inibitoria».

Per quanto riguarda il termine «approccio subsimbolico», esso sta ad indicare una impostazione che vede le strutture cognitive alla stregua di entità «emergenti», coincidenti con i *pattern* macroscopici di attivazione di un gran numero di unità microscopiche interagenti nell'ambito di una rete neurale. Mentre nel tradizionale «approccio simbolico», sostenuto per molti anni dall'Intelligenza Artificiale (v.**) e dal Cognitivismo, i costituenti fondamentali dei processi cognitivi sono i simboli, dotati di un proprio significato, e le relazioni strutturali tra di essi, nell'approccio subsimbolico ogni unità si attiva solo in presenza di una particolare «microcaratteristica» del *pattern* di stimolazione proveniente dall'ambiente, priva di per sé di un significato globale. La strutturazione cognitiva, dunque, con i suoi significati, è qualcosa che esiste solo ad un livello «collettivo», nello stesso modo in cui la temperatura di un gas è una variabile che esiste solo al livello macroscopico, connessa alla distribuzione statistica delle variabili microscopiche (posizione e velocità) che descrivono il moto delle singole molecole. Ne deriva l'enfasi particolare che l'approccio subsimbolico attribuisce allo studio della dinamica delle reti, sia a livello microscopico che a livello macroscopico, vista come rappresentativa della dinamica dei processi cognitivi stessi. In sostanza, mentre per l'approccio simbolico la domanda fondamentale cui rispondere è: «Come è strutturata la conoscenza?», per l'approccio subsimbolico è: «Come funziona la conoscenza?».

L'impostazione fornita dall'approccio subsimbolico può dare origine, però, a modelli di tipo differente, specie nell'ambito dell'apprendimento del l., a seconda della filosofia di fondo adottata. A questo proposito Pinker e Prince (1988) hanno introdotto una distinzione tra due fondamentali tipi di connessionismo: quello «implementazionale» e quello «eliminazionista». Il primo riconosce che le strutture simboliche tradizionali sono costituenti essenziali dei processi cognitivi, ma sostiene che esse possono essere più facilmente implementate tramite reti neurali. Il secondo, invece, afferma che, una volta costruiti modelli di reti neurali in grado di riprodurre correttamente il funzionamento cognitivo osservato negli esseri umani o negli animali, non vi sarà alcuna necessità di continuare a descrivere questo funzionamento tramite strutture simboliche. Anzi, in linea di principio sarà impossibile farlo, dal momento che, secondo questa corrente, non si può stabilire alcuna relazione di corrispondenza tra *pattern* di attivazione e pesi, da una parte, e strutture simboliche, dall'altra. Come si intuisce, per sostenere una tesi così radicale come quella eliminazionista, occorrerebbe disporre almeno di modelli di reti neurali ben più sofisticati di quelli finora concretamente costruiti. Di fatto, invece, la maggior parte dei modelli connessionistici dell'apprendimento del l. finora sviluppati sono stati formulati utilizzando architetture assai semplicistiche, ma interpretando i risultati forniti dalle reti neurali secondo un'ottica eliminazionista. Questa circostanza non ha fatto altro che fornire argomenti a favore dei detrattori dei modelli connessionistici, come Fodor e Pylyshyn (1988), che sostengono l'incapacità di questi ultimi di rendere conto dei dati sperimentali ottenuti negli esperimenti con soggetti umani.

I modelli connessionistici dell'apprendimento del l. si presentano, a prima vista, quali sostenitori di una posizione empirista: il l. viene appreso solo in quanto si è esposti a stimoli linguistici e ciò che si apprende dipende esclusivamente da quali stimoli sono stati ricevuti in ingresso. Questo apprendimento, inoltre, è di tipo supervisionato, nel senso che è determinato da un complesso di fattori sociali e

culturali che si riflettono nelle strutture linguistiche considerate come corrette da un opportuno gruppo di parlanti. Tale posizione rende i modelli connessionistici particolarmente adatti a descrivere, nel modo più semplice, la situazione di un bambino che impara il l. in funzione dei messaggi ricevuti dagli adulti con cui viene in contatto. Dietro questo empirismo, per altro, vi è una sorta di innatismo: nei modelli connessionistici i meccanismi di apprendimento del l. in funzione dell'esperienza vengono considerati universali, uguali per tutti gli esseri umani, in grado di spiegare l'apprendimento tanto della lingua inglese quanto di quella eschimese. Ciò che cambia sono solamente gli stimoli ricevuti in ingresso. Si tratta di una posizione che, sotto alcuni aspetti, si avvicina a quella tipica di Chomsky. Va rilevato, di contro, che, mentre Chomsky predica la natura innata di schemi linguistici e concettuali di livello elevato, i modelli connessionistici finora costruiti non sono in grado di parlare di schemi veri e propri, ma solo di leggi di apprendimento di basso livello.

Nello specifico, i principali modelli connessionistici dell'apprendimento del l. possono essere distinti in due categorie fondamentali: a) quella dei modelli dei processi di riconoscimento di *fonemi* o di *parole* e b) quella dei modelli dei processi di apprendimento dell'uso corretto dei verbi.

Per quanto riguarda i primi, il più antico è il modello di riconoscimento delle parole noto come *Interactive Activation Model* (brevemente IA), proposto da McClelland e Rumelhart (1981). Questo modello ha lo scopo di render conto degli effetti dovuti al contesto sperimentale osservati nella percezione delle parole, il più interessante dei quali è quello chiamato «l'effetto di superiorità delle parole». Esso consiste nel fatto che lettere dell'alfabeto presentate visivamente per brevissimi intervalli di tempo vengono riconosciute meglio quando compaiono all'interno di una parola piuttosto che quando compaiono isolatamente (cfr. Wheeler, 1970). Tale effetto è assai difficile da spiegare utilizzando un approccio di tipo simbolico, mentre viene simulato correttamente dal modello IA. L'architettura di quest'ultimo è basata su tre strati di unità: uno strato di ingresso le cui unità rappresentano le singole caratteristiche delle lettere dell'alfabeto, uno strato intermedio le cui unità corrispondono alle lettere stesse ed uno strato superiore le cui unità corrispondono alle singole parole. Le prestazioni di questo primo modello sono state sorprendenti. Non solo esso ha riprodotto l'effetto di superiorità delle parole, ma ha evidenziato la capacità di completare ed interpretare i *pattern* di ingresso, aggiungendo elementi in essi originariamente non presenti. Questo successo ha stimolato la creazione di successivi modelli connessionistici, tra i quali citeremo per primo TRACE, proposto da McClelland e Elman (1986) per simulare i processi di riconoscimento del l. parlato. La struttura è in parte simile a quella di IA, con tre strati successivi di unità: uno per le caratteristiche dei fonemi, uno per i fonemi stessi ed uno per le parole. I risultati delle simulazioni effettuate hanno evidenziato la capacità del modello di riprodurre l'andamento dei dati ottenuti in esperimenti su soggetti umani. Disgraziatamente ciascuno dei differenti effetti sperimentali che si volevano riprodurre ha richiesto differenti insiemi di valori dei pesi e dei parametri. Massaro (1988) ha evidenziato, con una serie di argomentazioni sia teoriche che sperimentali, la discrepanza tra le previsioni ottenibili sia con IA che con TRACE e alcuni risultati sperimentali relativi ai soggetti.

Un secondo modello connessionistico ispirato da IA è il modello del processo di lettura CID (*Connection Information Distribution*), proposto da McClelland nel 1985 e da lui perfezionato nel 1986. Esso ha ottenuto un certo successo nel simulare il processo di migrazione delle lettere da una

parola all'altra, evidenziato da Mozer (1983) nei soggetti umani quando si presentano simultaneamente per breve tempo due parole affiancate. Se le parole sono immediatamente seguite da uno stimolo di mascheramento ed il compito dei soggetti è di riferire solo una delle due, essi in un certo numero di casi riferiscono quest'ultima in modo errato sostituendo al posto delle lettere originali altre lettere contenute nell'altra parola. La buona *performance* del modello, però, è dovuta unicamente ad una scelta opportuna dei parametri e ad una interpretazione molto discutibile dei risultati. Un modello molto più sofisticato della percezione di parole è stato costruito nel 1989 da Mozer e denominato BLIRNET. Tuttavia, nonostante la sua complessità, esso ha incontrato serie difficoltà nella elaborazione di *pattern* di ingresso comprendenti almeno due parole.

Una categoria molto differente di modelli connessionistici del processo di apprendimento della lettura ha avuto inizio da un lavoro di Seidenberg e McClelland (1989). In esso gli autori implementano solo la parte relativa all'apprendimento della corretta pronuncia delle parole lette. Quest'ultima è realizzata tramite una rete a tre strati: uno strato di ingresso, che codifica la rappresentazione ortografica delle parole, uno strato di unità intermedie (o nascoste) ed uno strato che codifica la rappresentazione fonologica delle parole lette. Il modello è sottoposto ad un apprendimento di tipo supervisionato tramite la celebre regola di *error-backpropagation*, introdotta nel 1986 da Rumelhart, Hinton e Williams. La *performance* mostra interessanti somiglianze con quella degli esseri umani nei compiti di decisione lessicale e di denominazione, pur di adottare opportuni criteri di corrispondenza tra attività della rete e misure effettuate sui soggetti. Le cose non vanno così bene se la rete viene testata su *pattern* non facenti parte dell'insieme di addestramento (cfr. Besner *et al.*, 1990). Sono da menzionare anche alcuni interessanti simulazioni numeriche compiute lesionando le connessioni del modello e osservando la sua *performance* nell'intento di trovare analogie con i fenomeni di dislessia (Patterson, Seidenberg e McClelland, 1989). Modelli sotto alcuni aspetti analoghi a quello di Seidenberg e McClelland sono quelli formulati da Hinton e Sejnowski nel 1986 e da Hinton e Shallice nel 1989 per rappresentare il processo di comprensione del significato di un testo scritto. L'interesse maggiore è stato dedicato allo studio del comportamento di questi modelli dopo una lesione delle connessioni, con l'intento di simulare i fenomeni di dislessia profonda ed eventualmente le patologie proprie dei pazienti che hanno subito lesioni cerebrali. La valutazione della *performance* di questi modelli è, per ora, così strettamente basata su regole di corrispondenza «ad hoc» con il comportamento dei soggetti umani che è impossibile poter dire se questo intento sia stato realizzato o no.

Come abbiamo detto in precedenza, una seconda classe di modelli connessionistici dell'apprendimento del I. riguarda i processi di apprendimento dell'uso corretto dei verbi. Il più celebre di questi modelli è quello proposto nel 1986 da Rumelhart e McClelland per descrivere l'apprendimento del tempo passato dei verbi inglesi. A questo proposito ricordiamo che i dati sperimentali relativi a questa forma di apprendimento nei bambini evidenziano una tipica forma a «U» (cfr. Pinker e Prince, 1988), caratterizzata da tre fasi successive: 1) produzione di forme passate corrette, sia quando i verbi sono regolari, sia quando sono irregolari, 2) produzione di forme passate scorrette per quanto concerne i verbi irregolari (per i quali si applica la stessa regola usata per i verbi regolari), 3) produzione di forme passate corrette sia per verbi regolari che per verbi irregolari, associata al riconoscimento di questi ultimi come

eccezioni rispetto ai primi. È molto difficile render conto di questo tipo di andamento utilizzando modelli di tipo simbolico in cui si presuppone che i bambini apprendano gradualmente l'uso di regole specifiche. Il grande merito di Rumelhart e McClelland è stato quello di aver mostrato come, invece, esso possa essere riprodotto servendosi di un modello basato su una rete neurale in cui la conoscenza è rappresentata in modo distribuito e non vi è la necessità di postulare alcun sistema di regole separate.

La struttura del modello è sostanzialmente quella di una rete a due strati successivi di unità, il primo (di ingresso), che codifica opportunamente le caratteristiche fonologiche del tempo presente dei verbi, ed il secondo (di uscita) che codifica le caratteristiche fonologiche del tempo passato. Le connessioni sono solo di tipo *bottom-up* e vengono determinate tramite un processo di apprendimento supervisionato. La buona *performance* del modello dipende in modo critico sia dai *pattern* di addestramento usati che dalle forme di codifica fonologica adottate. Nel 1991 Mac Whinney e Leinbach hanno modificato il modello originario di Rumelhart e McClelland, sia per quanto riguarda la forma della codifica fonologica, che per quanto riguarda l'architettura. In particolare in quest'ultima hanno introdotto uno strato di unità intermedie tra ingresso e uscita e si sono serviti come regola di apprendimento della *error-backpropagation*. Un modello analogo è stato utilizzato nel 1993 da Plunkett e Marchman, variando però la procedura utilizzata per l'addestramento della rete. Questi autori sostengono che le prestazioni di tali modelli riproducono molto meglio di quello di Rumelhart e McClelland i dati sperimentali rilevati sui bambini. Tuttavia nel 1993 Ling e Marinov hanno inferto un serio colpo alla validità di queste conclusioni, mostrando che un modello di tipo simbolico del processo di apprendimento (basato sull'algoritmo ID3 proposto da Quinlan nel 1986) rende ragione dei dati molto meglio dei modelli connessionistici. Tale circostanza mette in luce come questi ultimi contengano, in realtà, implicitamente una gran quantità di conoscenza di tipo simbolico, ad esempio nelle forme di codifica adottate dei *pattern* di ingresso e di uscita. Ciò costituisce un forte argomento a sfavore delle posizioni eliminazioniste e suggerisce un approccio integrato, in cui aspetti simbolici e reti neurali convivano fianco a fianco. La costruzione di nuovi modelli di quest'ultimo tipo è il principale compito che la Scienza Cognitiva del futuro dovrà affrontare. Esso potrà, probabilmente, essere affrontato solo utilizzando una visione di tipo sistemico, non parcellizzata, dei vari processi cognitivi implicati nell'uso del I.

Bibliografia

- Besner D. *et al.*, *Psychol. Rev.*, 1990, **97**, 432.
Feldman J. A., Ballard D. H., *Cognitive Sci.*, 1982, **6**, 205.
Fodor J. A., Pylyshyn Z. W., *Cognition*, 1988, **28**, 3.
Ling C. X., Marinov M., *Cognition*, 1993, **49**, 235.
Massaro D. W., *J. Mem. Lang.*, 1988, **27**, 213.
McClelland J. L., Rumelhart D. E., *Psychol. Rev.*, 1981, **88**, 375.
McClelland J. L., Rumelhart D. E. eds., *Parallel Distributed Processing. Explorations in the Microstructure of Cognition*, 1986, MIT Press, Cambridge, MA.
McWhinney B., Leinbach J., *Cognition*, 1991, **40**, 121.
Mozer M. C., *J. Exp. Psychol. Human Perc. and Perf.*, 1983, **9**, 531.
Mozer M. C., *J. Exp. Psychol. Human Perc. and Perf.*, 1989, **15**, 287.
Patterson K. E., Seidenberg M. S., McClelland J. L., *Connections and disconnections: acquired dyslexia in a computational model of reading process*, in Morris R. G. M. ed., *Parallel Distributed Processing. Implications for Psychology and Neurobiology*, 1989, Clarendon Press, Oxford, p. 131.
Penna M. P., Pessa E., *Introduzione alla Psicologia Connessionistica*, 1993, Di Renzo, Roma.
Pessa E., *Reti neurali e processi cognitivi*, 1993, Di Renzo, Roma.
Pinker S., Prince A., *Cognition*, 1988, **28**, 73.
Plunkett K., Marchman V., *Cognition*, 1993, **48**, 21.

Quinlan P., *Connectionism and Psychology*, 1991, Harvester Wheatsheaf, New York.
 Seidenberg M. S., *Cognition*, 1994, **50**, 385.
 Seidenberg M. S., McClelland J. L., *Psychol. Rev.*, 1989, **96**, 523.
 Wheeler D., *Cognit. Psychol.*, 1970, **1**, 59.

ELIANO PESSA

LIPEMIA [v. vol. VIII, coll. 2059-2070; Agg. I, col. *4672]

Affidabilità dei metodi per la determinazione del colesterolo

I numerosi metodi proposti per la determinazione della colesterolemia, molti dei quali tuttora in uso, rappresentano ancora oggi dei tentativi non del tutto soddisfacenti per venire incontro all'esigenza di economicità, semplicità e rapidità nell'esecuzione e di maggiore accuratezza e precisione nei risultati. Essi si basano su reazioni colorimetriche non enzimatiche (reazione di Liebermann-Burchard, reazione al $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$, reazione all'ac. *p*-toluensulfonico) o sull'uso della reazione enzimatica catalizzata dalla colesterolo ossidasi. I dettagli tecnici relativi ad alcuni dei metodi sono stati esposti in precedenti articoli (v. COLESTEROLEMIA, IV, 426; LIPEMIA, VIII, 2059).

La reazione di Liebermann-Burchard avviene in un mezzo reso fortemente acido in presenza di ac. solforico, ac. acetico e anidride acetica e consiste nella graduale ossidazione del colesterolo fino a formare un cromoforo dell'ac. colesta-esaene-sulfonico. Malgrado sia la metodica non enzimatica più frequentemente usata, la reazione di Liebermann-Burchard risente di numerose variabili quali la concentrazione dei reagenti, la quantità d'acqua presente nella miscela finale, la temperatura e il tempo di reazione e la lunghezza d'onda della luce utilizzata per la misura del prodotto finale. Il colore che si sviluppa nella reazione è instabile nel tempo ed è più intenso quando il colesterolo è esterificato rispetto a quando è libero. Infine, alcune sostanze presenti nel campione biologico (bilirubina, retinolo) o aggiunte nella miscela di reazione (digitonina, utilizzata per precipitare il colesterolo non esterificato) possono interferire nel dosaggio dando luogo ad una sovrastima dell'analita.

La reazione al $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ dà luogo ad un colore più intenso e costante nel tempo rispetto a quanto osservato con la reazione di Liebermann-Burchard per l'effetto stabilizzante del metallo sulla formazione del catione enilico ad alte concentrazioni di ac. solforico, cosa che rende questa procedura particolarmente adatta per lo sviluppo di micrometodi. Inoltre, quando l'ac. solforico è aggiunto nella miscela di reazione separatamente dagli altri reagenti (ma non quando viene premiscelato a questi), il colesterolo libero e quello esterificato sviluppano un colore di medesima intensità, rendendo superflua una preventiva saponificazione dell'analita. L'azide sodica (a volte usata per inibire la crescita batterica), gli alogeni, i perossidi e certi farmaci e vitamine possono interferire con la reazione al $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$. È inoltre preferibile deproteinizzare il campione prima di far sviluppare il colore. Ciò può essere fatto indifferentemente per aggiunta di un solvente organico o per precipitazione in acido. Questo secondo metodo è apparentemente più semplice, ma può determinare una rimozione del ferro con le proteine, causando così un insufficiente sviluppo del colore, o rendere più difficoltosa una eventuale, successiva rimozione della bilirubina dall'estratto.

La reazione all'ac. *p*-toluensulfonico ha i seguenti vantaggi rispetto alla reazione di Liebermann-Burchard: i reagenti sono più stabili, il colore del prodotto di reazione non si modifica nel tempo, il colore sviluppato dal colesterolo libero e quello sviluppato dal colesterolo esterificato hanno la medesima intensità. Tuttavia, in questo caso la bilirubina

interferisce notevolmente nella determinazione del colesterolo dando luogo spesso ad una sovrastima dell'analita.

La determinazione enzimatica del colesterolo prevede l'idrolisi del colesterolo esterificato, l'ossidazione del colesterolo libero a colest-4-en-3-one a spese dell'ossigeno atmosferico con produzione di perossido di idrogeno e il dosaggio di quest'ultimo composto mediante reazioni enzimatiche e/o colorimetriche. Questo metodo presenta il vantaggio di un'elevata specificità per cui la reazione può essere eseguita direttamente nel siero. Il principale problema risiede nel fatto che l'idrolisi degli esteri del colesterolo è spesso solo parziale e che quindi la concentrazione del colesterolo totale può essere sottostimata. Si è visto, inoltre, che il grado di idrolisi raggiungibile nel corso della reazione enzimatica dipende sia dalla natura dell'acido organico esterificante (gli esteri dell'ac. arachidonico e dell'ac. acetico sono particolarmente resistenti all'azione delle esterasi) sia dal tipo di enzima usato (le esterasi di origine microbica hanno maggiore difficoltà, rispetto alle esterasi di origine animale, ad idrolizzare gli esteri del colesterolo con acidi grassi polinsaturi a catena lunga). Ciò pone seri problemi all'affidabilità del metodo.

Determinazione del colesterolo-HDL

I metodi più frequentemente usati nella determinazione del colesterolo-HDL si basano sulla precipitazione selettiva delle VLDL e delle LDL (v. LIPOPROTEINE, VIII, 2132; *4672) e sul dosaggio del colesterolo sul supernatante così ottenuto. Gli agenti precipitanti maggiormente usati sono l'eparina-cloruro di manganese, il destrano solfato-cloruro di calcio o magnesio e il fosfotungstato di sodio.

Il metodo basato sull'uso dell'eparina-cloruro di manganese non è compatibile (per la presenza di ioni Mn^{+2}) con gran parte dei metodi enzimatici utilizzati per la determinazione del colesterolo mentre può essere accoppiato alla reazione di Liebermann-Burchard. Le VLDL e le LDL precipitano solo parzialmente in campioni con un contenuto di trigliceridi superiore a 4.000 mg/l.

La precipitazione delle lipoproteine con destrano solfato e sali di calcio o magnesio permette un successivo dosaggio del colesterolo mediante il metodo enzimatico. Tuttavia, molte delle procedure utilizzando il destrano (specie se a peso molecolare inferiore a 50.000) tendono a sottostimare il colesterolo-HDL.

Anche il metodo utilizzando il fosfotungstato di sodio sottostima il colesterolo-HDL, ma in misura minore rispetto al metodo utilizzando il destrano. Esso è particolarmente utile per precipitare le VLDL e le LDL in sieri ipertrigliceridici. Il suo principale svantaggio è di essere molto sensibile a variazioni di temperatura o di concentrazione dei reagenti.

Bibliografia

Hainline A. et al., *Clin. Chem.*, 1986, **32**, 611.
 Naito H. K., *Am. J. Cardiol.*, 1985, **56**, 65.
 Rifai N., Warnick G. R., *Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins*, 1994, AACC Press, Washington.
 Warnick G. R., Nguyen T., Albers A. A., *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 217.
 Wiebe P. A., Smith S. J., *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 746.

COSTANTINO SALERNO

LOSARTAN: v. ANGIOTENSINA II, ANTAGONISTI DEI RECETTORI DELLA** (coll. **407-409).

LOWN-GANON-LEVINE, SINDROME DI: v. TACHICARDIA**.

LTD (Long Term Depression): v. SINAPSI**.

LTP (Long Term Potentiation): v. SINAPSI**.

LYME, MALATTIA DI [v. Agg. I, coll. *4736-4744]

La malattia di Lyme [m. di L.] è una malattia multisistemica caratterizzata da manifestazioni reumatologiche, neurologiche, cardiache e dermatologiche. L'agente causale, la *Borrelia burgdorferi*, viene trasmessa all'uomo principalmente dalla zecca *Ixodes dammini*.

Il decorso della malattia può essere suddiviso in tre stadi: nel primo dominano le manifestazioni dermatologiche, nel secondo le manifestazioni neurologiche, cardiache ed artro-mialgiche, mentre l'artrite è la tipica manifestazione del terzo stadio. L'artrite può manifestarsi anche parecchi mesi dopo l'inizio della malattia, può durare mesi, fino a raggiungere uno stadio di vera e propria artrite cronica.

Attualmente, il trattamento della m. di L. consiste nella somministrazione appropriata di antibiotici (v. *4744). Il trattamento ha più probabilità di successo nello stadio precoce, ma la malattia può rispondere al trattamento in tutti gli stadi. Per molte manifestazioni, come quelle del S.N.C. e per l'artrite, non è stata ancora definita la terapia ottimale.

Poiché la malattia può porre dei problemi di diagnosi precoce e le strategie terapeutiche non sono ancora in grado di risolvere alcune delle manifestazioni della malattia, la ricerca è stata diretta verso lo sviluppo di un vaccino.

I primi modelli animali avevano dimostrato che l'immunizzazione con spirochete inattivate proteggeva l'*hamster* da una successiva infezione con spirochete vive. La protezione sembrava essere essenzialmente mediata da anticorpi, perché anche il trasferimento del siero da animali immunizzati conferiva protezione agli animali riceventi. Tuttavia, l'immunizzazione con spirochete intere può essere teoricamente responsabile di effetti collaterali. Infatti alcuni episodi di artrite delle grandi articolazioni durante l'infezione da *B. burgdorferi* hanno fatto ipotizzare possibili reazioni crociate tra la *Borrelia* ed antigeni umani; una reazione crociata tra l'antigene flagellare ed una proteina assonale è stata in effetti riportata.

Perciò, negli ultimi anni, si è cercato di identificare gli antigeni protettivi da usare in un vaccino contenente solo gli antigeni essenziali. Come dimostrato nei modelli animali, l'immunità umorale riveste un ruolo importante nel proteggere dall'infezione. Il contributo della risposta cellulo-mediata non è noto. Anche gli antigeni responsabili della produzione di anticorpi protettivi non sono noti; tuttavia, diverse proteine della superficie esterna sono possibili candidati. La membrana esterna di *B. burgdorferi* è ricoperta da una proteina da 31 kD, nota come proteina della superficie esterna A (OspA) e da una proteina da 34 kD nota come proteina B (OspB). Inoltre, una proteina da 41 kD è associata con il flagello di *B. burgdorferi*. Durante l'infezione umana gli anticorpi verso l'antigene flagellare 41 kD vengono prodotti precocemente nel corso della malattia e quelli verso OspA e OspB più tardivamente.

Per la valutazione di un possibile vaccino è stato messo a punto un modello di m. di L. nel topo; il topo infatti, a differenza dell'*hamster*, dopo infezione con *B. burgdorferi* presenta alcune delle manifestazioni cliniche della m. di L. dell'uomo.

Studi recenti hanno dimostrato che, nel topo, l'immunizzazione attiva con la proteina OspA ottenuta con tecniche di ricombinazione genetica era in grado di proteggere i topi da una infezione successiva con ceppi diversi di *B. burgdor-*

feri. L'esame istopatologico delle articolazioni e del cuore degli animali immunizzati con la proteina OspA purificata non mostravano alcuna evidenza di malattia, mentre gli animali di controllo avevano sviluppato rapidamente artrite e cardite. Inoltre, come previsto, le colture del sangue e della milza di animali immunizzati con OspA non erano infette a differenza di tutti i topi di controllo. Per vedere se la protezione era mediata da anticorpi, il siero raccolto da animali immunizzati con OspA è stato usato per immunizzare passivamente altri topi. I topi sono risultati completamente protetti dall'infezione.

La conclusione raggiunta in questi studi era che i topi erano protetti da una successiva infezione con spirochete mediante l'immunizzazione con la proteina OspA e che la protezione era trasferibile con il trasferimento di anticorpi monoclonali o di anticorpi policlonali diretti verso la proteina OspA. Oltre a conferire protezione, l'immunizzazione non era associata ad effetti collaterali. Quindi la lipoproteina purificata OspA si era dimostrata un candidato promettente per un vaccino umano per la m. di L.

È stato già fatto un primo studio clinico controllato nell'uomo per esaminare la sicurezza e l'immunogenicità di un vaccino costituito dalla proteina OspA ricombinante. I risultati hanno dimostrato che questo vaccino è ben tollerato. Non è stato infatti osservato alcun effetto collaterale grave o inusuale. Questo risultato è molto importante, perché alcuni dati avevano suggerito un'associazione temporale tra l'insorgenza dell'artrite di Lyme e la produzione di anticorpi verso la proteina della superficie esterna. Nello studio le manifestazioni articolari sono state seguite attentamente e, sebbene i vaccinati abbiano riportato con una certa frequenza dolore articolare, la maggior parte degli episodi erano di modesta entità, transitori, non infiammatori e non erano caratteristici dell'artrite di Lyme. Nel corso dell'infezione umana gli anticorpi verso la proteina di superficie A vengono infatti prodotti tardivamente e inoltre solo in una parte dei pazienti.

La vaccinazione con la lipoproteina OspA ha indotto una risposta precoce di tipo IgG in più del 90% dei vaccinati. Sebbene i titoli declinino nel tempo, gli anticorpi sono stati determinabili per almeno 5 mesi.

Due recenti studi in doppio cieco (Sigal *et al.*, 1998; Steere *et al.*, 1998) hanno dimostrato l'efficacia del vaccino ricombinante OspA in soggetti a rischio di contrarre la m. di L. Praticate due iniezioni iniziali si è provveduto ad una terza iniezione dopo un anno. In entrambi gli studi, il vaccino OspA è risultato sicuro ed efficace per la prevenzione della m. di L.

Bibliografia

- Barbour A. G., Fish D., *Science*, 1993, **260**, 1610-1616.
Centers for Disease Control and Prevention, Lyme disease, *MMWR*, 1993, **42**, 345-348.
Johnson R. C., Kodner C., Russel M., *Infect. Immun.*, 1986, **54**, 897-898.
Johnson R. C., Kodner C., Russel M., *Infect. Immun.*, 1986, **53**, 713-714.
Fikrig E., Barthold S. W., Kantor F. S., Flavell R. A., *Science*, 1990, **250**, 553-556.
Keller D., Koster F. T., Marks D. H. *et al.*, *JAMA*, 1994, **271**, 1764-1768.
Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R., *Infectious Diseases*, 4 ediz., 1995, Churchill Livingstone, New York, pp. 2143-2155.
Sigal L. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339**, 216-222.
Steere A. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339**, 209-215.

MARINA GIULIANO

MACHADO-JOSEPH, MALATTIA DI

La malattia di Machado-Joseph [m. di M.-J.] (indicata anche come MJD1; atrofia spinopontina; atassia cerebellare autosomica dominante tipo I, atassia spinocerebellare 3, o degenerazione nigrospino-dentale), è una forma ereditaria di atassia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da atassia, sintomi parkinsoniani, ridotti movimenti oculari, fascicolazioni e atrofia dei muscoli, perdita dei riflessi periferici, nistagmo, tremori cerebellari, e diabete mellito. L'esame autoptico mostra degenerazione dei neuroni e gliosi della *substantia nigra* e dei nuclei dei nervi cranici e vestibolari (v. ATASSIE SPINOCEREBELLARI**, col. **662). La malattia ha una evoluzione progressiva e la maggior parte dei pazienti è costretta alla sedia a rotelle, e successivamente all'immobilizzazione completa nell'arco di pochi anni dall'esordio. L'età media di sopravvivenza è di circa 20 anni dall'esordio della sintomatologia clinica, che generalmente inizia intorno al terzo decennio di vita. L'età di comparsa dei primi sintomi è, tuttavia, molto variabile tra 5 anni e 73 anni.

La m. di M.-J. è stata descritta inizialmente nelle Azzorre Portoghesi nel 1972, nei discendenti di William Machado, un nativo delle isole stesse, e successivamente riscontrata anche in altri gruppi etnici che non presentavano nessuna discendenza portoghese. La m. di M.-J. è stata a lungo considerata una forma di atassia «spinocerebellare» o una forma allelica della corea di Huntington (HD), ma gli studi di *linkage* non ne hanno mai dimostrato la concatenazione con i *loci* responsabili delle forme di atassie spinocerebellari note e neppure con il *locus* HD. Soltanto nel 1993, la m. di M.-J. è stata mappata sul cromosoma 14 nella regione q24.3-q32 attraverso un'esteso studio di *linkage* in una famiglia di origine Giapponese.

La localizzazione del gene della malattia in questa regione è stata successivamente confermata anche nelle famiglie Portoghesi e in quelle di altri gruppi etnici, dimostrando l'assenza di eterogeneità genetica di questa patologia. In realtà, la localizzazione nella regione 14q24.3-q32 coincideva con la regione di mappa di una forma di atassia spinocerebellare (SCA3), suggerendo la possibilità che entrambe le patologie fossero dovute a mutazioni dello stesso gene. La mutazione

responsabile della m. di M.-J. si ritrova nelle forme più frequenti di atassia spinocerebellare (v.**). L'individuazione di una sequenza trascritta contenente una sequenza trinucleotidica [CAG], polimorfa nella popolazione normale con un numero variabile di ripetizioni compreso tra 13 e 36, ha permesso di isolare e caratterizzare il gene responsabile. Infatti, proprio la sequenza trinucleotidica CAG costituisce il sito di mutazione della m. di M.-J. Questa sequenza è ripetuta da 68 a circa 80 volte nei pazienti e il grado di espansione correla con l'età d'insorgenza della sintomatologia. Infatti i pazienti con un numero elevato di triplette CAG hanno un esordio più precoce e un quadro clinico più grave. La sequenza CAG è contenuta nella parte codificante di un gene (*MJD1*), espresso nel sistema nervoso centrale. Il prodotto di questo gene contiene una serie di glutamine, in analogia con altre proteine codificate da geni coinvolti in altre malattie ereditarie dovute ad amplificazioni di triplette CAG, come la corea di Huntington, l'atrofia dentato-rubro-pallido-luisiana, l'atassia spino-cerebellare di tipo I e la malattia di Kennedy. La variazione numerica dei residui di glutamina, oltre un numero fisiologicamente variabile, comporta l'acquisizione di nuove funzioni della proteina, con un effetto dominante negativo. Il numero delle triplette nel gene *MJD1* è instabile sia mitoticamente (producendo quindi mosaicismi tessutali), sia meioticamente (producendo quindi gameti con una discreta variabilità allelica).

Il mosaicismi potrebbe spiegare l'eterogeneità clinica dei pazienti, mentre l'instabilità meiotica è alla base del fenomeno dell'anticipazione, cioè della manifestazione più precoce della sintomatologia nelle generazioni più recenti. Diversamente dalle altre patologie dovute ad amplificazioni di triplette, non sembra esistere nella malattia un effetto sesso-dipendente nella trasmissione degli alleli mutati. La correlazione tra il numero delle ripetizioni CAG e l'esordio/gravità del fenotipo clinico è di grande importanza nel consultorio genetico di questa malattia, in termini diagnostici, prognostici e predittivi.

Bibliografia

Coutinho P., Calheiros J. M., Andrade C., *O Médico*, 1977, 82, 1-3.
Kawaguchi Y. et al., *Nature Genetics*, 1994, 8, 221-227.

Maciel P. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 57, 54-61.
Twist E. C. et al., *J. Med. Genet.*, 1995, 31, 823-829.
Cancel G. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 57, 809-816.

GIUSEPPE NOVELLI

MACROENZIMI

F. *macroenzymes*. - I. *macroenzymes*. - T. *Makroenzymen*. - S. *macroenzimas*.

Definizione e generalità

Gli enzimi possono a volte legarsi ad altre componenti plasmatiche o formare omopolimeri ad alto peso molecolare. Questi complessi macromolecolari prendono il nome di *macroenzimi* [m.]. L'identificazione dei m. nel siero ha interesse clinico in quanto possono essere degli indici di malattia (in particolare di disordini autoimmuni) o indurre errori nell'interpretazione dei dati analitici. La *macroamilasi* fu il primo m. ad essere identificato nel siero da Wilding et al. nel 1964. Successivamente si scoprì che gran parte degli enzimi può essere presente in questa forma e che tale evenienza deve essere presa in considerazione ogni volta che vi sia un persistente ed inspiegabile aumento di una attività enzimatica nel siero.

Dal punto di vista biochimico-clinico si distinguono i m. legati ad immunoglobuline e quelli aventi una diversa costituzione.

Macroenzimi legati ad immunoglobuline

I m. legati alle immunoglobuline (v.; VII, 1537; *3650) sono formati generalmente da immunocomplessi contenenti IgG, mentre solo raramente sono stati descritti m. in cui sono presenti le IgM. L'amilasi e la lattico deidrogenasi fanno eccezione a questa regola in quanto si legano di preferenza alle IgA. Le macrolattico deidrogenasi sono spesso caratterizzate dalla presenza di immunoglobuline con sole catene leggere κ . Sono stati descritti tuttavia numerosi casi di pazienti con m. contenenti entrambi i tipi di catene leggere o più tipi di catene pesanti.

La stechiometria dell'immunocomplesso è di due molecole di enzima per molecola di anticorpo. Il legame coinvolge il frammento F(ab) (*Fragment antigen binding*) in quanto l'immunoglobulina mantiene la capacità di legarsi all'enzima anche dopo digestione con papaina. La costante di dissociazione è simile a quella di altri complessi antigene-anticorpo ad alta affinità (10^{-9} - 10^{-11} M). Generalmente l'anticorpo è in eccesso rispetto all'enzima, ma questo non è sempre vero. Ad esempio, la *macroamilasemia* è stata distinta in tre tipi in base all'affinità e alla concentrazione relativa dell'anticorpo rispetto all'enzima: nei pazienti con *macroamilasemia* tipo 1 quasi tutto l'enzima è legato all'anticorpo, mentre i pazienti con *macroamilasemia* tipo 2 o 3 hanno quantità rilevanti di enzima libero.

La specificità del legame varia a seconda dell'enzima. Gli immunocomplessi con l'amilasi contengono spesso entrambi gli isoenzimi (salivare e pancreatico). Gli anticorpi verso la fosfatasi alcalina sono generalmente specifici per un singolo gruppo antigenico (il gruppo degli enzimi della placenta e dell'intestino o il gruppo degli enzimi del fegato e dell'osso), mentre non distinguono i membri all'interno di ciascun gruppo. Per quanto riguarda la lattico deidrogenasi (v. VIII, 1155), sono stati descritti tre tipi di anticorpi: (1) anticorpi che reagiscono sia con le subunità H che con le subunità M, (2) anticorpi specifici per la sola subunità M o, più raramente, per la sola subunità H, (3) anticorpi che si legano solo ad isoenzimi contenenti tutte e due le subunità in quanto il loro epitopo è formato da sequenze peptidiche di entrambe le catene.

Si ritiene che l'enzima, alterato dal punto di vista biochi-

mico, acquisti proprietà antigeniche in quanto accidentalmente va incontro a reazioni crociate con anticorpi contro proteine estranee all'organismo. A riprova di ciò, è stato visto che gli anticorpi presenti nelle macroamilasi hanno maggiore affinità per l'enzima di origine animale presente nella carne e nei latticini e che si suppone perciò abbia stimolato la produzione di IgA specifiche venendo a contatto con l'organismo a livello del tratto gastrointestinale. Un'altra possibilità è che l'enzima sia rilasciato da siti ove era sequestrato: ciò potrebbe spiegare la presenza di anticorpi anti-creatina chinasi e lattico deidrogenasi in pazienti con infarti cardiaci o di anticorpi anti-subunità B della creatina chinasi (v. ISOENZIMI, VIII, 529) in bambini con danni al sistema nervoso centrale. La presenza di m. nel siero può essere associata ad altri disordini del sistema immunitario come, ad esempio, l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso, la spondilite anchilosante, la crioglobulinemia e l'AIDS.

Macroenzimi di diversa costituzione

Gli enzimi del plasma possono formare complessi macromolecolari anche con sostanze diverse dalle immunoglobuline. Un esempio è dato dagli enzimi proteolitici che possono legarsi all' α_2 -macroglobulina. Altri enzimi (fosfatasi alcalina, γ -glutamyltransferasi, leucina aminopeptidasi, 5'-nucleotidasi) si legano a frazioni lipidiche plasmatiche quando, a seguito di una ostruzione intraepatica del flusso biliare, si ha una solubilizzazione degli enzimi di membrana ad opera della bile o una immissione in circolo di frammenti di membrane plasmatiche derivanti da cellule del sistema epatocellulare. Un'altra possibilità è che si formi un legame fra enzimi plasmatici e farmaci (ad es., l'amilasi può legarsi ai derivati dell'amido presenti in preparazioni iniettabili di succedanei del plasma).

È infine possibile che un enzima plasmatico formi degli omopolimeri. È questo il caso della *macrocreatina chinasi tipo 2* dovuta alla presenza di creatina chinasi mitocondriale capace di dar luogo a polimeri ad alto peso molecolare, ma strutturalmente diversa dalle subunità M e B (riscontrabili invece negli immunocomplessi caratterizzanti la *macrocreatina chinasi tipo 1*).

Significato clinico e metodi di dosaggio

Quando un enzima è presente nel plasma sotto forma di un complesso macromolecolare, esso può raggiungere concentrazioni superiori a quelle riscontrabili di norma (nel 12% delle volte nel caso della macroamilasi e nello 0,5% delle volte nel caso della macrocreatina chinasi) in quanto può diminuire la sua clearance renale o reticoloendoteliale. L'aumento dell'attività amilasica nel siero può portare a diagnosticare erroneamente una pancreatite, mentre la presenza di macrocreatina chinasi tipo 1 o 2 può rendere difficile la determinazione dell'isoenzima MB utile per la diagnosi di infarto cardiaco.

La macrocreatina chinasi tipo 2 può essere usata come *marker* di gravi malattie epatiche o di adenocarcinomi del tratto gastrointestinale (in quest'ultimo caso con una sensibilità del 56%). I m. del sistema epatobiliare possono essere usati per diagnosticare la presenza di metastasi epatiche o per distinguere fra ostruzioni intraepatiche ed extraepatiche. La determinazione di alcuni m. della γ -glutamyltransferasi a peso molecolare intermedio è particolarmente utile in quest'ultimo caso in quanto permette di studiare le ostruzioni biliari con una sensibilità dell'88% e una specificità del 96%.

I metodi di dosaggio dei m. prevedono la separazione del complesso macromolecolare mediante elettroforesi, precipitazione in polietilenglicol o misure di stabilità termica delle protome. La presenza di macroamilasi può essere va-

lutata anche determinando il rapporto fra la clearance renale dell'amilasi e quella della creatinina.

V. anche: ENZIMI, V, 2229; *2788; ISOENZIMI, VIII, 529; *4193.

Bibliografia

Kaplan L. A., Pesce A. J., *Clinical Chemistry*, 1996, Mosby, St. Louis.
Remaley A. T., Wilding P., *Clin. Chem.*, 1989, 35, 2261.
Wilding P., Cooke W. T., Nicholson G. I., *Ann. Intern. Med.*, 1964, 60, 1053.

COSTANTINO SALERNO

MACROLIDI [v. vol. IX, coll. 21-23]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3473). - **Meccanismo d'azione** (col. 3473). - **Attività antimicrobica** (col. 3473). - **Caratteristiche farmacocinetiche** (col. 3474). - **Indicazioni cliniche all'impiego dei macrolidi** (col. 3474). - **Eritromicina** (col. 3475). - **Spiramicina** (col. 3475). - **Roxitromicina** (col. 3475). - **Azitromicina** (col. 3476). - **Claritromicina** (col. 3476). - **Altri composti** (col. 3477). - **Prospettive di sviluppo** (col. 3477).

Introduzione

I macrolidi [m.] costituiscono un vasto gruppo di agenti antibatterici (circa 40) caratterizzati da una comune struttura chimica di base consistente in un anello macrociclico lattonico al quale sono uniti differenti zuccheri. I m. possono essere classificati in base alla struttura chimica (numero di atomi dell'anello lattonico) o in base alle caratteristiche farmacocinetiche (m. a lunga emivita plasmatica [*long-acting*], o m. a breve emivita plasmatica [*short-acting*]), come riportato nelle tabb. I e II. Di tutti i composti isolati od ottenuti per semisintesi ne sono disponibili, per impiego clinico, poco più di una decina, taluni dei quali ancora in fase di sperimentazione.

Meccanismo d'azione

I m. sono agenti batteriostatici che esplicano la loro azione legandosi alla sub-unità 50S dei ribosomi batterici, con conseguente inibizione della sintesi delle proteine RNA-dipendenti. Tali agenti possono essere battericidi ad alte concentrazioni o in presenza di bassi inoculi batterici.

Attività antimicrobica

I m. posseggono uno spettro d'azione *in vitro* relativamente ampio, in parte sovrapponibile a quello della penicillina G.

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DEI MACROLIDI SU BASE CHIMICA

(Da Bassetti D., 1994, modificata)

Macrolidi con anello lattonico a 14 atomi	Claritromicina
	Diritromicina
	Eritromicina
	Fluritromicina
	Oleandomicina
	Roxitromicina
Macrolidi con anello lattonico a 15 atomi	Azitromicina
Macrolidi con anello lattonico a 16 atomi	Josamicina
	Midecamicina
	Miocamicina
	Rokitamicina
	Rosaramicina
	Spiramicina

TAB. II. CLASSIFICAZIONE DEI MACROLIDI SU BASE FARMACOCINETICA

(Da Bassetti D., 1994, modificata)

Macrolidi short-acting	Eritromicina
	Josamicina
	Kitasamicina
	Midecamicina
	Oleandomicina
	Rokitamicina
	Rosaramicina
	Azitromicina
	Claritromicina
	Diritromicina
Macrolidi long-acting	Fluritromicina
	Miocamicina
	Roxitromicina
	Spiramicina

Tutti i m. sono attivi nei confronti di microrganismi gram-positivi e di qualche gram-negativo, nonché nei confronti di rickettsie, clamidie, micoplasmi e spirochete. I m. hanno una buona 'attività' nei confronti di pneumococchi e streptococchi di gruppo A, anche se sono già state riportate segnalazioni di resistenza in queste specie. Buona è anche l'attività nei confronti di *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes* ed *Actinomyces israelii*.

Tra i gram-negativi aerobi sono sensibili ai m. *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* ed *Helicobacter pylori*. Sono inoltre sensibili *Legionella* spp. ed alcuni anaerobi.

Caratteristiche farmacocinetiche

Tutti i m. presentano una buona distribuzione tissutale ed all'interno delle cellule, un discreto livello di metabolizzazione epatica (40-50%) ed una eliminazione prevalentemente biliare. Tutti i m. non penetrano la barriera emato-encefalica. I vari composti differiscono per quanto riguarda l'assorbimento dopo somministrazione orale e, soprattutto, per l'emivita plasmatica, che condiziona il ritmo di somministrazione giornaliera. Tutti i composti sono disponibili per via orale. eritromicina e claritromicina sono disponibili anche per somministrazione endovenosa.

Indicazioni cliniche all'impiego dei macrolidi.

I m. sono farmaci di largo impiego, soprattutto in ambiente comunitario. Tra le principali indicazioni cliniche ricorderemo le infezioni delle alte e basse vie respiratorie in ambiente comunitario, le infezioni da micoplasmi (compresa la polmonite), le infezioni da clamidie (in alternativa alle tetraciline nelle uretriti), le legionellosi, le infezioni da *Campylobacter* spp., la pertosse, la difterite. I m. sono inoltre impiegati, in alternativa ai farmaci betalattamici (cefalosporine, penicilline) nei soggetti allergici agli stessi, in corso di infezioni stafilococciche e streptococciche minori e nella profilassi dell'endocardite streptococcica e della malattia reumatica.

La tollerabilità dei m. è buona. Talora si riscontra epatotossicità, sotto forma di epatite colestatica, con alcuni derivati dell'eritromicina (eritromicina estolato) e con la triacetiloleandomicina, che pertanto non vengono più utilizzati.

MACROLIDI

nella pratica clinica. L'incidenza di effetti indesiderati gravi è comunque bassa. Tra gli effetti collaterali più frequenti sono da ricordare quelli a carico del tratto gastrointestinale (crampi addominali, nausea, vomito e diarrea), più frequenti dopo somministrazione orale di eritromicina rispetto ai composti più recenti. Sono inoltre descritte reazioni da ipersensibilità, soprattutto sotto forma di eruzioni cutanee, febbre ed eosinofilia. L'infusione endovenosa può determinare, sebbene raramente, tromboflebiti.

Eritromicina

L'eritromicina (v.) è il capostipite dei m., ed è tuttora un farmaco attuale e largamente prescritto. Tutti i nuovi m. devono essere confrontati, per spettro d'azione, caratteristiche farmacocinetiche ed efficacia clinica, con questo composto.

L'eritromicina è disponibile in varie formulazioni: topica, parenterale (eritromicina lattobionato, recentemente ritirata dal commercio in Italia), ed orale (eritromicina base, stearato, etilsuccinato [Eritrocina[®]] ed estolato [Ilosone[®]]). L'emivita plasmatica è di circa 1,5 ore, e il farmaco viene somministrato in 4 dosi giornaliere. Lo spettro d'azione, le principali caratteristiche farmacocinetiche, l'efficacia clinica e la tollerabilità sono quelle precedentemente descritte.

L'insufficienza renale non comporta sostanziali modificazioni posologiche del farmaco che, al contrario, non dovrebbe essere somministrato in corso di insufficienza epatica grave. L'eritromicina attraversa la placenta e viene escreta nel latte.

L'eritromicina interferisce con il metabolismo epatico di teofillina, ciclosporina, digossina e warfarin: la somministrazione contemporanea dell'eritromicina e di questi farmaci determina aumento dei livelli sierici di questi ultimi composti.

Spiramicina

La spiramicina (v.; Rovamicina[®]) è un m. non recente (è stato sintetizzato nel 1954), ma recentemente rivalutato alla luce di alcune caratteristiche farmacocinetiche. Lo spettro d'azione è simile a quello dell'eritromicina. La spiramicina è farmaco di scelta per la terapia della toxoplasmosi in gravidanza (v. TOXOPLASMOSE; GRAVIDANZA). Per la buona penetrazione nella saliva, viene spesso utilizzata da odontoiatri per la terapia di infezioni dentarie o paradentarie. Viene inoltre utilizzata in corso di criptosporidiosi (v.^{*)} intestinale, in pazienti con AIDS, con risultati modesti. L'emivita plasmatica della spiramicina è di oltre 6 ore, per cui viene somministrata in 1 o 2 dosi giornaliere.

La spiramicina penetra in maniera particolarmente elevata in molti tessuti e distretti (polmone, tessuto osseo, prostata, rene, fegato, milza), dove persiste a lungo. Per tali motivi la spiramicina è stata recentemente rivalutata, presentando caratteristiche simili a quelle di composti *long-acting* di più recente introduzione (ad es. azitromicina; v. sotto).

Roxitromicina

La roxitromicina (Assoral[®]; Overal[®]; Rulid[®]) differisce dall'eritromicina per alcune caratteristiche farmacocinetiche. L'emivita plasmatica di circa 10 ore ne consente la somministrazione in 1-2 dosi giornaliere. L'assorbimento dopo somministrazione orale è superiore rispetto all'eritromicina, ed in tal modo è possibile ottenere picchi ematici superiori. Nonostante l'elevato legame alle sieroproteine (circa il 90%), le concentrazioni tissutali e nei fluidi biologici sono elevate anche se, come avviene per farmaci molto legati alle proteine, il profilo farmacocinetico tissutale può essere ritardato rispetto a quello sierico.

La roxitromicina possiede inoltre una buona attività nei confronti di *Toxoplasma gondii* e di micobatteri, ma il significato clinico di queste osservazioni è ancora da definire.

Azitromicina

L'azitromicina (Aritrocina[®]; Trozocina[®]; Zitromax[®]): è il primo di una nuova categoria di m. a 15 atomi di carbonio, le *azalidi*, e presenta proprietà antibatteriche e farmacocinetiche particolari. Tra queste ricorderemo la spiccata attività nei confronti di alcuni gramnegativi, la stabilità in ambiente acido, l'elevata penetrazione intracellulare e l'emivita prolungata.

Gli azalidi sono composti a 15 atomi di carbonio, derivati dell'eritromicina per aggiunta di un gruppo nitrogено in posizione 9^a dell'anello lattionico. Questa sostituzione è alla base della resistenza in ambiente acido e dello spettro antimicrobico caratteristici dell'azitromicina. Di particolare interesse è l'attività dell'azitromicina nei confronti di *H. influenzae*, dal momento che tale farmaco è più attivo di eritromicina, roxitromicina e claritromicina nei confronti di questo importante patogeno respiratorio. Per contro il farmaco è meno attivo dell'eritromicina nei confronti di streptococchi (incluso lo pneumococco) e stafilococchi; inoltre i ceppi resistenti all'eritromicina lo sono anche all'azitromicina e ad altri m.

Le caratteristiche farmacocinetiche dell'azitromicina sono peculiari, e le conferiscono un profilo del tutto favorevole. L'emivita terminale è estremamente prolungata, superando le 60 ore. La caratteristica farmacocinetica più interessante per le possibili applicazioni terapeutiche è comunque la diffusibilità tissutale. L'azitromicina raggiunge infatti in alcuni tessuti e cellule (macrofagi, polimorfonucleati) concentrazioni da 10 a 100 volte superiori a quelle sieriche, ed in tali distretti l'emivita del farmaco raggiunge i 2-4 giorni. Il cibo interferisce con l'assorbimento dell'azitromicina. La cinetica dell'azitromicina non è sostanzialmente modificata dall'insufficienza epatica e renale.

Non vi sono dati sull'interferenza dell'azitromicina con la ciclosporina, mentre non si sono osservate interazioni tra l'antibiotico e teofillina, carbamazepina e warfarin.

In campo clinico l'azitromicina è stata valutata in vari tipi di infezioni, e tra queste le infezioni delle vie respiratorie, le infezioni a trasmissione sessuale (in particolare uretriti da *Chlamydia trachomatis* e da *Neisseria gonorrhoeae*), le infezioni cutanee stafilococciche e streptococciche).

Vista l'emivita estremamente prolungata, l'azitromicina viene somministrata in un'unica dose giornaliera, per periodi variabili da 3 giorni a 5 giorni. Quest'ultimo aspetto, relativo alla possibilità di un accorciamento del periodo terapeutico, è sicuramente di notevole interesse pratico, ma necessita di ulteriori conferme cliniche. Dall'esperienza sino ad ora accumulata risulta comunque che l'azitromicina è tollerata meglio dell'eritromicina, determinando in minor misura effetti collaterali a carico del tratto gastroenterico.

Claritromicina

La claritromicina (Klacid[®]; Macladin[®]; Veclam[®]) è un m. recentemente introdotto nella pratica clinica che mostra peculiari caratteristiche farmacocinetiche, ed è disponibile sia per somministrazione orale che parenterale (endovenosa). Lo spettro d'azione è sostanzialmente simile a quello degli altri m., anche se la claritromicina è più attiva della eritromicina e dell'azitromicina nei confronti di *Streptococcus pneumoniae*.

Il farmaco è rapidamente assorbito dopo somministrazione *per os*, indipendentemente dallo stato di riempimento gastrico. L'emivita plasmatica di circa 4 ore ne consente la somministrazione in due dosi giornaliere. Circa il 30% del

farmaco viene metabolizzato a livello epatico in 14-OH derivato, che mantiene una buona attività antimicrobica. La claritromicina penetra bene sia nei tessuti che nelle cellule, compresi i macrofagi ed i polimorfonucleati. In corso di insufficienza renale grave è necessario ridurre la posologia del farmaco.

L'esperienza clinica ha evidenziato che la claritromicina è un farmaco efficace e sicuro in molte di quelle patologie infettive (soprattutto infezioni respiratorie e della cute e dei tessuti molli) per le quali i m. sono da ritenersi farmaci di scelta. Un'ulteriore indicazione clinica è rappresentata dalle infezioni da *Mycobacterium avium-complex*, tipico patogeno opportunisto nei soggetti con AIDS.

Anche la claritromicina, così come l'azitromicina, mostra un profilo di tollerabilità superiore a quello dell'eritromicina.

Altri composti

Sono disponibili altri m., alcuni dei quali di comprovata efficacia clinica, che non offrono particolari vantaggi nei confronti dell'eritromicina. Tra questi ricorderemo la josamicina, la miocamicina e la rokitamicina. Tra i composti ancora in fase di sperimentazione la diritromicina e la fluritromicina.

Prospettive di sviluppo

I m. sono una vecchia classe di agenti antimicrobi tornati alla ribalta in corrispondenza del riemergere di patologie da lungo conosciute o della comparsa di nuovi (o prima non identificati) patogeni (ad es. legionelle, clamidie, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*).

L'industria farmaceutica ha sviluppato, negli ultimi anni, nuovi composti che hanno permesso di ampliare, e talora di migliorare, il nostro armamentario terapeutico. Rispetto all'eritromicina (v.), capostipite del gruppo dei m., alcuni dei nuovi composti offrono migliori caratteristiche farmacocinetiche (che consentono soprattutto di ridurre il numero di somministrazioni giornaliere) e di tollerabilità. I nuovi obiettivi che ci si potrebbe prefiggere per migliorare ulteriormente questa classe di composti sono rappresentati dal miglioramento dello spettro d'azione antibatterico, dal superamento delle resistenze da parte dei microrganismi patogeni e dalla riduzione degli effetti indesiderati.

Bibliografia

- Bassetti D., *Chemioterapici antinfettivi e loro impiego razionale*, 6 ed., 1994, Intramed Communications, Milano.
 Bassetti D., *Antibiotici dalla A alla Z*, 3 ed., 1994, Intramed Communications, Milano.
 Bassetti D., *Terapia ragionata delle malattie infettive*, 2 ed., 1990, Lombardo Editore, Roma.
 Kirst H. A., *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 1991, **28**, 787-790.
 Yao J. D. C., Moellering R. C., *Antibacterial Agents*, in: *Manual of Clinical Microbiology*, 5 ed., 1991, American Society for Microbiology, Washington, pp. 1065-1098.

DANTE BASSETTI E MARIO CRUCIANI

MALARIA [v. vol. IX, coll. 64-110; Agg. I, coll. *4758-4774]

SOMMARIO

Premessa (col. 3477). - Progressi nello studio dell'immunologia della malaria e nella messa a punto dei vaccini (col. 3478). - Diagnosi della malaria (col. 3482). - Terapia (col. 3489).

Premessa

La malaria [m.] rappresenta tuttora una delle più gravi emergenze della nostra epoca e il suo contenimento dovrebbe essere uno degli impegni prioritari e degli interventi

non più derogabili da porre in atto per modificare realtà che hanno del tragico in molte aree geografiche. I dati parlano chiaramente: si verificano, secondo l'O.M.S., più di 300 milioni di nuovi casi di m. all'anno, con 2,7 milioni di morti, interessanti soprattutto le prime fasce di età. Il fallimento della campagna con insetticidi residuali, l'insorgenza di resistenze sempre più diffuse, anche a farmaci di recente acquisizione, unitamente ai profondi sconvolgimenti ambientali, sociali, economici, bellici che cronicamente affliggono le aree tropicali, in particolare del continente africano, sono tra le principali cause del ritardo nel controllo della malattia.

Progressi nello studio dell'immunologia della malaria e nella messa a punto dei vaccini

La messa a punto di un vaccino potrebbe essere la soluzione di un problema rimasto insoluto per millenni. In effetti, in questi ultimi anni, un fervore di studi è in atto, teso ad identificare gli antigeni che potrebbero essere utilizzati a scopi vaccinali. Le difficoltà sono molte e non facilmente risolvibili. È bene ricordare che, perché un vaccino risulti efficace, è necessario che l'agente patogeno induca una risposta immunitaria protettiva e di lunga durata come nella poliomielite, nella difterite, nel tetano, etc., che sia possibile identificare l'antigene responsabile di tale risposta, che si possa poi procedere ad una vaccinazione di massa. Tali presupposti non vengono rispettati per quanto concerne la m., in cui l'immunità si instaura lentamente dopo ripetuti contatti antigenici, è fugace, ed è specie- e ceppo-specifica; vi sarebbero poi enormi difficoltà a procedere nelle aree endemiche a ripetute vaccinazioni di massa nei primi anni di età. Inoltre, la natura e la specificità della risposta immunitaria nella m. non sono ben conosciute e, a parte una risposta umorale che sembrerebbe utile per contrastare l'invasione dello sporozoita, sarebbe proprio la risposta cellulare un elemento determinante nel complesso meccanismo di difesa nei confronti del parassita. È noto che stimolazioni indotte sui linfociti T-helper possono causare risposte differenti: i Th-1, che secernono IFN γ e IL-2, sono associati ad una risposta cellulo-mediata, piuttosto che umorale, utile nella protezione nei confronti delle infezioni intracellulari, comprese quelle causate da parassiti; i Th-2 producono IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e inducono alti titoli anticorpali; la prevalenza dei Th-1 inibisce i Th-2, mentre una stimolazione dei Th-2 regola, inibendola, l'attività dei Th-1 e vengono quindi rispettivamente esaltati in un caso l'immunità cellulare e l'azione citolitica e nell'altro le risposte umorali (v. CITOCINE**; IMMUNITÀ**; INTERLEUCINE**).

In dipendenza quindi del tipo di sottopopolazione linfocitaria che si ritiene utile, è possibile manipolare la risposta immune ad una stimolazione antigenica usando differenti adiuvanti, coniugando le proteine o i peptidi con alcuni carriers (come lipopolisaccaridi di *Brucella abortus*), immunizzando in presenza di citochine o usando vie diverse di somministrazione del vaccino. È importante stabilire quale stadio del parassita colpire e quindi quale debba essere la risposta immunitaria più adeguata.

Per quanto concerne l'azione degli adiuvanti, sembra che l'idrossido di alluminio induca un aumento delle IgG $_1$, con conseguente coinvolgimento dei Th-2 ed una modesta risposta cellulare, mentre l'adiuvante completo di Freund è causa di una forte risposta cellulo-mediata con incremento delle IgG $_2$, anche se le IgG $_1$ si riscontrano ad alti titoli, a testimonianza che ambedue le sottopopolazioni vengono stimulate da tale adiuvante. Adiuvanti come i liposomi, i derivati peptidici del peptidoglicano incorporati nei liposomi, il monofosforil lipide A inducono risposte Th-1 e Th-2, mentre lipopolisaccaridi di *B. abortus*, che ha funzione di carrier e/o di adiuvante, può selettivamente indurre risposte Th-1. Anche

le citochine potrebbero essere usate come adiuvanti, se non avessero un'emivita molto breve e una non trascurabile tossicità ad alte dosi. Tuttavia ciò può essere evitato usando basse concentrazioni di citochine o incorporandole nei liposomi.

Sono di un certo interesse, in accordo con le più recenti teorie patogenetiche, le ricerche tese ad ottenere un effetto, piuttosto che contro il parassita, nei confronti delle manifestazioni cliniche della malattia. Nella m. complicata, nella cosiddetta perniziosa, in particolare nella forma cerebrale, la componente bioumorale, come il rilascio di citochine, in particolare il TNF (*Tumor Necrosis Factor*) da parte di Th-1 e monociti-macrofagi, ha una certa rilevanza in alcune espressioni cliniche della malattia. Anticorpi anti-TNF, però, secondo alcuni AA. sarebbero protettivi solo se somministrati prima dell'evento. Altre ricerche hanno dimostrato che il rilascio di TNF può essere inibito da IL-4, e che IL-10 prodotta da Th-2 può inibire i Th-1 e quindi la produzione di TNF. Secondo altri AA., infine, sarebbe possibile desensibilizzare l'organismo all'azione del TNF mediante la somministrazione di basse dosi di lipopolisaccaridi (LPS) che, stimolando i Th-1, determinerebbero bassi livelli di TNF così come avviene in aree endemiche con la cronica stimolazione antigenica causata dalle ripetute infezioni malariche con un basso ma costante incremento di TNF. Tutti i vaccini messi a punto con i diversi antigeni, sia dello stadio preeritrocitario che di quello ematico, sono stati provati su animali, usando spesso l'adiuvante completo di Freund che però sarebbe estremamente tossico se usato in formulazioni dirette all'uomo. La formulazione di vaccini con idrossido di alluminio come adiuvante è risultata scarsamente immunogena, stimolando tra l'altro in particolare l'immunità umorale, mentre i liposomi da soli o in associazione con altri adiuvanti scarsamente tossici come gli stessi sali di alluminio, i derivati di subunità peptidiche del peptidoglicano, il monofosforil lipide A, dato il loro effetto sinergico, si sono dimostrati efficaci nel potenziare sia la risposta umorale che cellulo-mediata e sembra che ne influenzino anche la specificità.

I derivati di subunità peptidiche del peptidoglicano, specie se incorporati nei liposomi, perdono le proprietà tossiche del composto originario, mantenendo l'azione adiuvante, come la capacità di stimolare i macrofagi, i T e i B linfociti, inducendo risposte T helper e T citotossiche e, se somministrati per via orale, anche risposte locali.

Il monofosforil lipide A ed alcuni suoi derivati sono in grado di stimolare risposte cellulo-mediate ed umorali con incremento di IgG_{2a/2b}, stimolazione dei macrofagi, produzione di α e β interferoni, TNF, IL-1, prostaglandina E₂, attivazione policlonale dei B linfociti e inattivazione dei T-suppressor.

I procedimenti attuati per la messa a punto di vaccini antibatterici ed antivirali, attenuati o inattivati, non possono essere applicati alla produzione di un vaccino antimalarico, sia perché i parassiti in coltura non crescono in quantità utili, sia perché lo sviluppo in presenza di sangue umano può comportare una contaminazione con virus patogeni. Anche la crescita del parassita in primati comporta lo stesso rischio di trasmissione di virus patogeni per l'uomo.

Solo recentemente, con la biologia molecolare, si è trovata una parziale soluzione a questi importanti problemi. Di fatto le ricerche in tal senso continuano a fervere ed in verità, in questi ultimi anni, sono stati fatti significativi progressi nell'identificazione di antigeni dello stadio preeritrocitario che possono essere utili candidati alla realizzazione di un vaccino. Inoltre si è tentato di mettere a punto vaccini che blocchino anche la trasmissione. In tal modo si potrebbe procedere, oltre che ad una protezione individuale, anche ad un vero controllo della malattia interrompendone la trasmissione. Tali vaccini sarebbero, però, in grado di proteggere meno del 100% dei soggetti, e quindi potrebbero essere meno efficaci sulla morbilità e mortalità per m. in soggetti vaccinati che comunque contraessero l'infezione. Si pensa quindi che vaccini diretti contro lo stadio ematico dell'infezione potrebbero raggiungere meglio lo scopo.

È anche fondamentale, una volta isolati ed identificati gli antigeni, scegliere la procedura migliore per ottenerne quan-

tità idonee, ad es. con la tecnica del DNA ricombinante in *Escherichia coli* o in miceti come *Saccharomyces cerevisiae* o in baculovirus (famiglia di virus a DNA che determina la poliedrosi del baco da seta) o mediante sintesi chimica. Secondo molti AA. le colture di miceti costituiscono un mezzo ottimo per l'espressione di proteine ricombinanti: in tal modo le proteine plasmodiali possono essere prodotte e purificate in grande quantità e a basso costo.

Vi sono più di 2000 diverse proteine sintetizzate dagli stadi asessuati del parassita. Un certo numero di geni di *Plasmodium falciparum* sono stati parzialmente o pienamente sequenziati, e circa la metà di essi ha molte sequenze costituite da aminoacidi ripetitivi. La maggior parte di questi geni sono stati clonati ma le proteine codificate non sono poi state saggiate in studi sugli animali. Inoltre, il numero di geni clonati è nettamente inferiore al numero dei possibili antigeni propri dello stadio asessuato del parassita. Alcuni di questi antigeni, comunque, sono pronti per essere provati in *trial* vaccinali umani.

Citiamo gli antigeni di superficie del merozoite (MSA-1 e MSA-2), l'antigene RESA (*Ring Infected Erythrocyte Surface Antigen*), proteina associata alla superficie citoplasmatica della membrana dell'eritrocito infetto, assieme ad un altro analogo antigene denominato EBA (*Erythrocyte Binding Antigen*), l'antigene SERA (*Serine Rich Antigen*), sintetizzato durante gli stadi maturatori del plasmodio, l'antigene HRP₂ (*Histidine Rich Protein 2*) rilasciato dall'eritrocito parassitato, il complesso RAP-1 e RAP-2 (*Rhoptry Associated Protein*), la proteina AMA-1 (*Apical Membrane Antigen*), localizzata nella parte apicale del merozoite.

I vaccini antimerozoitici sono certamente in grado di prevenire le forme gravi e, se fortemente immunogeni, addirittura l'espressione clinica della malattia, ma non l'infezione né la formazione dei gametociti, anzi sembrerebbe che la gametogenesi venga in qualche modo incrementata.

Attualmente è stato sperimentato nell'uomo il vaccino SPf66 (Alonso *et al.*, 1994a; 1994b), messo a punto da M. E. Patarroyo, che è costituito da un insieme di tre peptidi sintetici di 35, 55 e 83 kD, le cui sequenze derivano da proteine del merozoite, insieme con una sequenza peptidica comprendente parte della proteina circumsporozoitica ed adsorbito su idrossido di alluminio. Sembra che risultati promettenti, con indici di protezione che a seconda delle casistiche variano dal 30 al 60% circa, si siano ottenuti in *trial* sull'uomo condotti in Colombia ed Ecuador (Sempertegui *et al.*, 1994). Questo vaccino è stato anche sperimentato nel sud del Venezuela (Noya *et al.*, 1994) evidenziando sia contro *P. falciparum* che *P. vivax* una protezione in circa il 50% dei soggetti vaccinati. Si è comunque accertato che il vaccino è sicuro ed immunogeno. In Tanzania, regione olocendemica, in un ampio *trial*, il vaccino SPf66 ha dato un indice di protezione del 31% dopo tre dosi. Riteniamo che, al momento attuale, non si possa dare un giudizio definitivo su tale vaccino. È importante verificare, per la valutazione protettiva, le variazioni degli indici di mortalità per m., la durata dell'immunità indotta ed il ruolo di eventuali nuovi adiuvanti.

In volontari è stato anche sperimentato un vaccino costituito da alcuni peptidi della superficie del merozoite di *P. falciparum*, di 185-200 kD e di 45 kD, legati al tossoide difterico ed adsorbiti su idrossido di alluminio (Ramamany *et al.*, 1995). La comparsa di una ipersensibilità al tossoide difterico costituisce un limite all'uso di questo vaccino; d'altronde la risposta anticorpale si è dimostrata non solo fugace, ma anche non protettiva. Una sperimentazione condotta in Papua-Nuova Guinea ha portato a risultati ancor meno certi per ciò che concerne sia la risposta cellulare che quella umorale.

Per la messa a punto di un vaccino *antisporozoitico*, poiché è poco agevole avvalersi di sporozoiti irradiati, è stata identificata una proteina di superficie dello sporozoite (de Oliveira *et al.*, 1994), la proteina circumsporozoitica (CS), che avrebbe una regione dominante fortemente immunogena e comune a diversi ceppi di una stessa specie, indipendentemente dalla regione geografica di provenienza, e che sarebbe implicata nella capacità di penetrazione del plasmodio nell'epatocita. L'infettività infatti viene annullata dall'azione di anticorpi monoclonali diretti contro tale proteina. Purtroppo, gli anticorpi antisporozoiti che si formano dopo ripetuti contatti antigenici, oltre alla proprietà di stimolare ed attivare la fagocitosi, avrebbero un effetto lesivo diretto. Sulla superficie dello sporozoite si verrebbe a formare uno strato fibrillare che andrebbe incontro a sfaldamento con conseguente liberazione di antigeni circolanti che, stornando gli anticorpi, creerebbero un effetto di immunoevasione. La membrana dello sporozoite si ricostituirebbe rapidamente. La proteina CS ottenuta mediante tecnica del DNA ricombinante o mediante sintesi chimica formulata con adeguati adiuvanti, in alcune esperienze ha indotto la formazione di anticorpi specifici a titoli elevati solo in circa il 30% dei soggetti vaccinati e si è potuto anche dimostrare una stimolazione dell'immunità cellulare non dose- né anticorpo-dipendente.

È stato sperimentalmente dimostrato nel topo che frazioni peptidiche contenenti epitopi B e T della proteina circumsporozoitica di *P. falciparum* adsorbite con idrossido di alluminio come adiuvante, sono in grado di suscitare una forte risposta anticorpale anamnestic. Un tale vaccino potrebbe essere utilizzato sull'uomo per incrementare i bassi livelli anticorpali antisporozoiti dei soggetti viventi in aree ad endemia malarica. Un vaccino antisporozoitico, anche inducendo un'alta risposta anticorpale, non sarebbe però completamente efficace, sia perché il soggetto rimarrebbe comunque sensibile all'infezione causata dagli altri stadi del parassita (iniettati ad esempio mediante siringa, come nella m. trasmessa tra tossicodipendenti, o mediante trasfusione), sia perché gli sporozoiti, come missili balistici, sono in grado di raggiungere rapidamente la cellula epatica, anche perché il tempo in cui restano esposti all'azione degli anticorpi è molto breve. Perché la malattia si manifesti è sufficiente quindi che pochi elementi raggiungano l'epatocita dove, in un certo qual modo, al riparo dal sistema immune, sono in grado di proseguire il ciclo biologico, anche se in tale stadio il parassita potrebbe essere sensibile all'azione dei linfociti T citotossici. Un nuovo antigene, espresso anche dagli stadi epatici ed eritrocitari del plasmodio denominato STARP (*Sporozoite Threonine and Asparagine-Rich Protein*) è stato identificato sulla superficie dello sporozoite e potrebbe essere utile costituente di un vaccino efficace nei confronti dei vari stadi biologici del parassita (Fidock *et al.*, 1994).

La messa a punto di un vaccino *antigametocitico*, ammesso che i geni che codificano le proteine proprie dei gameti non vadano incontro a mutazioni, potrebbe portare ad un controllo totale della malattia specie se associato ad un vaccino *antisporozoitico ed antimerozoitico*.

Sulla superficie dei gameti e degli zigoti di *P. falciparum* sono state identificate una proteina (p230) e due glicoproteine (p45, p48) sintetizzate durante lo sviluppo dei gametociti. Nelle successive trasformazioni dello zigote in oocinete vengono espressi nuovi antigeni tra cui una proteina (p25). In via sperimentale è stata dimostrata l'inibizione della maturazione dell'oocinete in zanzare infettantesi su topi portatori di gametociti e vaccinati con oocinete di *P. berghei*. Anche anticorpi monoclonali diretti contro un co-

stituente dell'oocinete hanno la capacità di bloccare la trasmissione.

Nell'insetto vettore parassiti in fase sessuata esprimono un enzima, una chitinasi, che rende così possibile il superamento di quella membrana chitinososa che avvolge il sangue assunto durante il pasto ematico e, conseguentemente, la penetrazione dello zigote nella parete intestinale dell'anofele. Un vaccino che induca la formazione di anticorpi diretti contro tale enzima potrebbe essere utile nell'interrompere l'evoluzione dell'oocinete. Nello stomaco della zanzara quindi i vari stadi sessuati del parassita sarebbero esposti all'azione di anticorpi, prodotti nell'uomo da vaccini adeguati, ingeriti durante il pasto ematico.

Un'alternativa a quest'approccio potrebbe essere rappresentata dall'induzione di risposte immuni dirette contro molecole di citoadesione o contro fattori bioumorali che intervengano nel determinismo della m. grave.

Per quanto concerne la genetica, si ricorda che la variante allelica HLA-B53 aumenta significativamente tra gli individui resistenti alla m.: v. la voce HLA** (col. **2618).

Attualmente alla luce delle numerose ricerche sovradesse sulle meccanismi immunitari della m. nell'uomo e dell'applicazione sul campo degli ultimi vaccini antimalarici in America Latina, Sud-Est Asiatico e Africa e delle recenti valutazioni su questa materia (Miller e Hoffman, 1998), è nostra opinione che non esista, adesso ed in un prossimo futuro, la possibilità dello sviluppo di un vaccino che produca una immunità completa e permanente per la m. nell'uomo, immunità che peraltro non esiste in natura. I test dei vaccini antimalarici, sperimentati in paesi ad alta endemia malarica, hanno messo in evidenza una immunità parziale e temporanea con percentuali di protezione variabile e quasi nulle nei paesi con m. iper-olo-endemica. Sono prospettabili, in tempi medi, sviluppi di vaccini antimalarici, singoli o misti, come risposta ad antigeni dei vari stadi parassitari che controllino l'infezione (sporozoiti, stadi pre-eritrocitari), la malattia (stadi asessuati ematici) o la trasmissione (stadi sessuati ematici o sviluppo nel vettore) con effetto protettivo parziale e temporaneo più efficaci di quelli attualmente in sperimentazione ma che, quasi certamente, richiederanno ripetute inoculazioni in tempi più o meno brevi. In assenza di una protezione totale e prolungata nel tempo, tali vaccini potrebbero essere impiegati soltanto in alcune categorie di persone che abbiano un contatto limitato nel tempo con le zone di endemia malarica (turisti, personale militare, sanitario o lavorativo). Per quel che riguarda le popolazioni native e residenti nelle zone ad alta endemia malarica (soprattutto nell'Africa sub-sahariana) tali vaccini, oltre che essere di impiego estremamente difficoltoso per gli enormi problemi organizzativo-logistici ed i costi insostenibili per i paesi in via di sviluppo, interferirebbero negativamente per la mancanza di una efficace e sostenibile risposta immunitaria a livello di popolazione sull'equilibrio malaria-immunità, trasformando le zone di m. stabile in zone di m. instabile con il conseguente succedersi di massicci episodi epidemici ed il notevole aumento di mortalità esteso a tutte le fasce di età.

Diagnosi della malaria

La diagnosi della m. è tutt'ora basata sull'esame microscopico di preparati di sangue periferico (striscio e goccia spessa) colorati con Giemsa (fig. 1) o con altri derivati del metodo di colorazione del Romanowski (Leishman; Field; etc.); v. MALARIA, IX, 101.

Tale metodica è accurata, conveniente e di basso costo se effettuata da microscopisti competenti ed esperti. Le soluzioni coloranti debbono essere preparate di recente e ben conservate, il pH del-



Fig. 1. A sinistra: striscio di sangue periferico con alta parassitemia da *P. falciparum*. A destra: goccia spessa in un caso con minore parassitemia da *P. falciparum*. (Osservazione degli AA.).

l'acqua accuratamente controllato, i vetrini debbono essere ben puliti e tenuti al riparo della polvere e dagli insetti. Le condizioni di alta temperatura ed umidità e gli ambienti poco protetti, proprie di molte regioni tropicali, possono alterare la qualità dei preparati microscopici. La pratica diagnostica nei vari paesi dell'area tropicale ci ha spesso confermato tali difficoltà. Per quel che concerne i paesi industrializzati, dopo le campagne di eradicazione della malaria dell'ultimo dopoguerra, è notevolmente diminuito il numero degli esperti e tecnici malariologi, al di fuori dei principali centri specializzati. Anche nel nostro paese vi sono stati casi di errata o mancata diagnosi di m., con conseguenze mortali.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) ha messo a punto, nel 1992, una strategia globale del controllo della m. elaborata specificamente per i paesi in via di sviluppo, nella quale un punto chiave è rappresentato da una rapida diagnosi della m., in special modo per le strutture sanitarie a livello di villaggio o distretto, onde permettere un tempestivo intervento terapeutico che riduca i tassi di morbidità ed, in caso di infezione da *Plasmodium falciparum*, i tassi di mortalità. In molte di tali strutture sanitarie di primo livello (*Primary Health Care*), in Asia, America Tropicale e, soprattutto Africa sub-sahariana, la carenza di energia elettrica, di microscopi, di materiale e reattivi di laboratorio, di personale tecnico adeguatamente preparato, non consentono l'organizzazione dei servizi di diagnostica microscopica. In tali circostanze è consuetudine procedere alla somministrazione di medicinali antimalarici in tutti quei casi in cui si sospetti, in base ad una diagnosi presuntiva basata sui sintomi osservati, una probabile infezione malarica. Tali criteri diagnostici, data la mancanza di specificità della sintomatologia malarica, espongono gli addetti sanitari (*Primary Health Workers*) ad errori diagnostici e a sopravvalutazione dell'infezione malarica rispetto alle altre malattie acute febbrili. In uno studio originale (Sowunmi e Akindele, 1993), effettuato in Nigeria, sulla diagnosi presuntiva di malaria basata su determinati segni e sintomi (splenomegalia e febbre) la percentuale di errori diagnostici variava dal 50 al 66%, mentre ulteriori studi (Gentor

1994) sulla attendibilità dei criteri clinici nella diagnosi di m. in aree endemiche davano valori positivi nel 73% dei bambini e nel 51% degli adulti. È evidente che le valutazioni predittive risultano più o meno corrette a seconda della capacità e qualificazione del personale sanitario che le effettua.

Con l'insorgere e la rapida diffusione della resistenza di vari ceppi di *P. falciparum* alla cloroquina, si sta in parte attuando una politica di somministrazione ai pazienti in cui si sospetti una infezione malarica di farmaci antimalarici di seconda linea. In tal modo aumentano i problemi di tossicità, in confronto alla più sicura maneggevolezza della cloroquina e di valutazione posologica di tali farmaci rispetto alle varie situazioni individuali (età, gravidanza, reattività). Ciò ha reso ancora più pressante la necessità di reperire metodologie diagnostiche di semplice e rapida attuazione, alla portata di personale sanitario non specializzato, in un contesto ambientale carente delle comuni attrezzature di diagnosi microscopica.

Da tempo sono in uso, quasi esclusivamente per indagini epidemiologiche (prevalenza malarica) le prove sierologiche (ELISA, IFA) atte a dimostrare la presenza di anticorpi antimalarici. Tali indagini, estensibili anche allo *screening* dei donatori di sangue nelle regioni endemiche ed alla diagnosi di infezioni pregresse nelle zone non malariche, anche se effettuabili nelle regioni tropicali, richiedono attrezzature e personale specializzato e non sono applicabili per la diagnosi di m. acuta.

Verso la fine degli anni '80 vi fu un grande entusiasmo per la applicabilità delle sonde molecolari (v.*; v.***) alla diagnosi di m., come di altre malattie parassitarie, e per il possibile sviluppo di sistemi diagnostici semplificati che consentissero una semplice e rapida diagnosi di m. «sul campo». Una valutazione recente (Wilson, 1993) ci consente di affermare che, nel campo della diagnostica malarica, tali tecnologie comportano un nuovo livello di complessità senza un corrispondente miglioramento della sensibilità o specificità. Wilson (1993) conferma che «malgrado

tutto questo lavoro sulle sonde a DNA, la microscopia rimane il metodo di scelta per la diagnosi di m. sul campo».

Nell'ultimo decennio sono stati effettuati numerosi studi tendenti ad utilizzare gli anticorpi monoclonali per l'identificazione di antigeni specifici dei parassiti umani. Come conseguenza di tali studi vi è stata una migliore comprensione della struttura antigenica di tali parassiti. Anticorpi monoclonali di antigeni individuali hanno permesso una efficace identificazione degli sporozoi negli insetti vettori della m. (proteina circumsporozoitica) e delle forme ematiche di *P. falciparum* nell'uomo.

Taylor e Voller (1993) hanno recentemente descritto una reazione, modificata dall'ELISA, sul sangue intero, che permette di identificare un antigene specifico di *P. falciparum* (proteina PfHRP-2), usando anticorpi monoclonali. Con tale tecnica si possono effettuare contemporaneamente 50-100 esami in due ore. In un successivo editoriale, Voller (1994) ha valutato positivamente l'utilizzazione di tale test nello «screening» per la donazione di sangue, ma ne ha messo in evidenza i limiti, soprattutto nei costi, tempi e complessità di esecuzione ed affidabilità, per quel che riguarda la diagnosi individuale di m. acuta, nei confronti degli esami tradizionali su strisci e gocce spesse di sangue colorato.

Altri metodi diagnostici, alternativi alla diagnosi microscopica classica, includono la colorazione fluorescente e l'identificazione di enzimi parassitari specifici.

Hunt Coke *et al.* (1992) hanno descritto un metodo di colorazione fluorescente con «benzotiocarbosipurina» per una rapida e facile identificazione delle forme ematiche di *P. falciparum*, utilizzando gocce spesse già seccate (la colorazione diretta dei preparati a fresco non dà risultati soddisfacenti). Per la lettura si utilizza un microscopio a fluorescenza a 400 ingrandimenti. A parte il vantaggio di osservare campi microscopici più vasti, tale metodo non presenta particolari vantaggi, in termini di sensibilità, specificità, tempi e costi nei confronti dei classici metodi di colorazione.

L'utilizzazione nella diagnosi di m., dell'arancio di acridina, per la sua capacità di fissarsi nelle cellule contenenti acido nucleico, usando un microscopio a fluorescenza, fu messa in evidenza da Spielman *et al.* nel 1988. È stato quindi messo a punto il metodo QBC® (*Quantitative Buffy Coat*; fig. 2) che si basa sulla stratificazione per centrifugazione dei plasmodi in una provetta da ematocrito modificata, rivestita internamente da colorante arancio di acridina e ossalato di potassio, nella quale vengono introdotti 55-65 µl di sangue che viene centrifugato a 12.000 giri per 5 min. La stratificazione degli elementi ematici permette di localizzare i globuli rossi parassitati nella parte superiore dello strato eritrocitario, al di sotto dello strato granulocitico, usando un microscopio a fluorescenza con obiettivo ad immersione a 50 ingrandimenti. Il sistema QBC® è attualmente l'unico sistema sviluppato commercialmente per l'uso «sul campo» con caratteristiche soddisfacenti e ben documentate (*Becton Dickinson Tropical Diseases Diagnostic®*). Spielman ed altri (1988) sostengono che il sistema QBC® è otto volte più sensibile della goccia spessa per la diagnosi di m., molto più rapido nell'esecuzione e di facile apprendimento per i tecnici delle strutture sanitarie di primo livello.

Nell'applicazione di tale metodo nei paesi in via di sviluppo, Baird *et al.* (1992) non hanno riscontrato risultati soddisfacenti, ma ciò, secondo Perrone (1992), è imputabile all'uso non corretto del metodo: tubi ematocriti non specifici per il QBC®, velocità di centrifugazione inferiore a quella dovuta, uso di obiettivo non adatto. Alcuni AA. (Poggensee *et al.*, 1992) hanno trovato difficoltà nella diagnosi di *P. falciparum* in assenza di gametociti. Petersen e

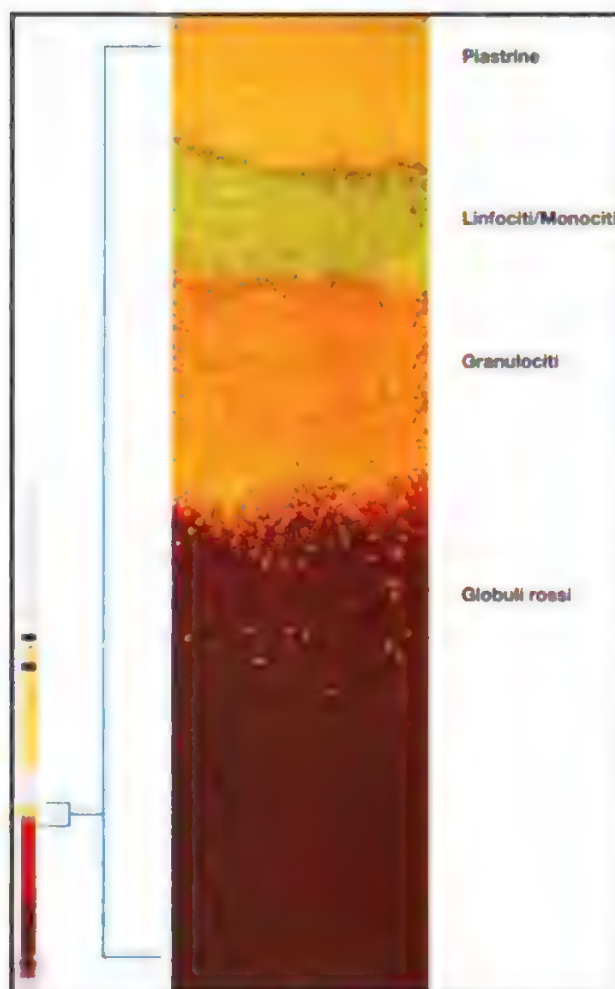


Fig. 2. Test per la malaria con la tecnica QBC® (*Quantitative Buffy Coat*). La provetta QBC® Malaria Test consiste in un capillare per ematocrito in vetro ad alta precisione rivestito internamente con arancio di acridina, che ha funzione di colorante del DNA nucleare, e ossalato di potassio che funge da anticoagulante. Viene riempita con 55-65 µl di sangue capillare prelevato dal paziente. Al suo interno è inserita una sonda flottante cilindrica di alta precisione che rimarrà sospesa nel sangue e permetterà la separazione delle componenti cellulari ematiche in bande. Il capillare è centrifugato a 12.000 giri per 5 min. Le componenti ematiche si separano secondo la loro densità, formando bande distinte. Poiché la sonda occupa il 90% del lume interno della provetta capillare, la banda dei leucociti e trombociti si espande e la parte superiore all'area contenente i globuli rossi è aumentata di 10 volte.

Dopo la centrifugazione il capillare QBC® è collocato su un particolare supporto (*Para Viewer® Microscope Tube Holder*) onde poter essere collocato sul tavolino di un normale microscopio ottico equipaggiato con un obiettivo microscopico epi-illuminato con luce ultravioletta (*Para Lens® U.V. Microscope Adapter*). I parassiti malarici, il cui nucleo è reso fluorescente dall'arancio di acridina vengono quindi evidenziati all'interfaccia tra globuli rossi e globuli bianchi. La sonda flottante occupa l'area fra globuli rossi e plasma. Lo strato ambrato che circonda la sonda è il *buffy coat*. Visti a ingrandimento, tre strati separati del *buffy coat* comprendono: una parte superiore di colore giallo-arancione con piastrine fluorescenti, una parte intermedia verde con linfociti-monociti e una base di colore giallo con i granulociti. Al di sotto dei granulociti vi è lo strato con i globuli rossi (può verificarsi tuttavia un accavallamento di globuli rossi e granulociti). I globuli rossi contenenti i plasmodi sono concentrati alla sommità di questo strato e appaiono come corpi fluorescenti multipli puntiformi, contrastanti rispetto allo sfondo scuro costituito da globuli rossi non parassitati. Un campione negativo non mostra alcun punto fluorescente in quest'area. (Per gentile concessione della Becton-Dickinson).

Marbiah (1994), in uno studio condotto in Sierra Leone con personale locale hanno riscontrato una perdita del 3,7% dei campioni prelevati, per ragioni tecniche, ed una caduta del valore predittivo del QBC® al 18% quando i campioni esaminati avevano una densità parassitologica < 100 parassiti/µl. Certamente, le condizioni di temperatura ed umidità proprie dei climi tropicali, che si riscontrano negli ambienti dove si effettua l'esame, possono influire negativamente. Tecnici di laboratorio delle forze armate U.S.A., senza previa esperienza specifica, sono stati in grado di apprendere rapidamente ed efficacemente la tecnica QBC® (Bawden *et al.*, 1994; Clendeman *et al.*, 1995). I livelli di sensibilità e specificità riscontrati dai vari ricercatori nella applicazione del QBC® variano rispettivamente dal 70 al 79%, dal 92 al 97%.

Un altro metodo di diagnosi della m., applicabile agli ambienti sanitari di primo livello è il *Para Sight® test* (Becton Dickinson Advanced Diagnostic). Il test è un ELISA rapido su striscia (10 minuti), basato su un doppio anticorpo monoclonale che mette in evidenza nel sangue esaminato un antigene malarico: la proteina II ricca di istidina (HRP₂), derivata dai trofozoiti di *P. falciparum*. Shiff *et al.* (1993) hanno utilizzato tale metodo su 272 pazienti in Tanzania. Comparato con il metodo QBC® e con i preparati in goccia spessa tale metodo dà un indice di sensibilità dell'88,9% e di specificità dell'87,5%. Dopo adeguata terapia e scomparsa della parassitemia all'esame microscopico, l'antigenemia, rilevata con il *Para Sight®*, declina e non è più rilevabile oltre il 10° giorno e, in casi molto rari, oltre il 14°. Prenij *et al.* (1994) hanno confermato la validità del *Para Sight® F test* (modificazione del metodo originale) in uno studio su 988 bambini in Tanzania e la facilità dell'apprendimento della relativa tecnica da parte dei «Village Health Workers». Questo metodo consentirebbe una diagnosi di malaria da *P. falciparum* (specie di quasi totale prevalenza nell'Africa sub-sahariana e praticamente unica responsabile della mortalità malarica) in assenza di servizi diagnostici adeguati e la conseguente somministrazione mirata di farmaci antimalarici di secondo livello in caso di clorochino-resistenza. È interessante notare che il *Para Sight® F test* ha consentito l'identificazione di infezione malarica, dopo 1450-5200 anni, in alcune mummie studiate in Egitto e Nubia (Miller *et al.*, 1994).

La tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (v. PCR [v.*; v.**]), con un primer di base derivato da una sequenza DNA ripetitiva specifica per *P. falciparum*, è stata usata per rilevare il DNA parassitario nell'insetto vettore e, con sequenze geniche di piccole sub-unità ribosomiali (s.s.r.RNA) espresse dalle forme ematiche asessuate di *P. falciparum* e *P. vivax*, per rilevare le infezioni umane. Tale metodica presenta indici di sensibilità e specificità vicini al 100% ma, a causa della complessità della procedura e dei tempi e costi, non è praticamente utilizzabile nella diagnosi clinica della m. La PCR può essere effettuata da strutture e laboratori attrezzati per una valutazione dei meccanismi di resistenza dei plasmodi agli antimalarici, per il rilevamento di infezioni miste occulte (Snounou *et al.*, 1993) e, soprattutto, nello screening dei donatori di sangue, seguendo le modificazioni e semplificazioni tecniche utilizzate in Vietnam ed in Giappone (Nuthi, Ty Hang *et al.*, 1995; Hakim *et al.*, 1995).

Nella valutazione delle metodologie diagnostiche della m. in uso o utilizzabili al momento attuale dobbiamo tener conto che la loro efficienza ed attendibilità è correlata a molti fattori come la reperibilità e la qualità delle attrezzature e del materiale diagnostico, le condizioni degli ambienti di laboratorio e delle fonti di energia elettrica e la disponibilità di personale tecnico competente. Tutti questi

fattori sono collegati alle condizioni socioeconomiche del contesto in cui si svolge il lavoro di diagnosi. Alcuni metodi, efficienti nell'ambito dei paesi industrializzati, non sono attuabili nei paesi in via di sviluppo. È unanime opinione dei malariologi che anche nelle più varie situazioni in cui sia attuabile, il metodo più efficiente e sicuro per la diagnosi di m. resti quello dell'osservazione diretta dei parassiti nei preparati ematici. Tra i metodi di colorazione di tali preparati in striscio e goccia spessa, il Giemsa dà i risultati migliori per l'identificazione della specie e dello stadio del parassita. I tempi di preparazione sono in media di 25 minuti nelle condizioni normali di laboratorio, ma in ambienti in cui calore e umidità siano elevati, specie nei climi tropicali, si possono avere tempi più lunghi, specie per la goccia spessa, che deve essere accuratamente asciugata prima della colorazione.

Il metodo di colorazione di Field, e sue modificazioni, è utile quando si debbono osservare numerosi preparati in tempi brevi, ma richiede esaminatori che abbiano una buona esperienza microscopica specifica.

L'esame microscopico diretto, oltre ad identificare la specie e la fase parassitaria permette inoltre di procedere ad una valutazione quantitativa della parassitemia.

Nei paesi industrializzati l'identificazione del parassita malarico nel sangue coincide praticamente con la diagnosi di malattia malarica. Nelle aree ad alta endemia, dove una parte notevole della popolazione è semi-immune ed una parassitemia in soggetti oligo-asintomatici è presente in varia percentuale, il reperto del parassita malarico nel sangue può non rappresentare la prova che sia l'agente etiologico della sindrome morbosa in osservazione. Le forme virali, le meningiti, le salmonellosi e l'onnipresente tubercolosi, a volte legata e condizionata dall'infezione da HIV (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA [v.*; v.**]), possono essere confuse con la m. e viceversa. In certe regioni africane si considera di valore predittivo per la malattia malarica un tasso parassitemico di ≥ 4000 plasmodi per µl di sangue.

Il metodo QBC® ha sicuramente applicabilità ed efficacia quando venga effettuato in laboratori attrezzati, con adatte condizioni di temperatura ed umidità ed effettuato da personale ben addestrato. La Ditta produttrice sostiene che personale senza previa esperienza può essere addestrato in tempi brevi, ma su questo argomento alcuni AA. manifestano pareri discordanti. I tempi di esecuzione sono certamente più brevi e l'esame può essere effettuato contemporaneamente su molti esemplari. Si sostiene inoltre che il QBC® è in grado di mettere in evidenza una ipoparassitemia non rilevabile con metodi tradizionali, ma, a prescindere dalla non unanimità del riconoscimento di tale capacità di rilevamento, è a nostro parere da osservare che il limite di 10-20 parassiti per µl di sangue rilevabile con il metodo di Giemsa (Bruce Chwatt, 1985) è sufficiente per una diagnosi di m. in soggetti non immuni. Per i soggetti semi-immuni, come detto in precedenza, la diagnosi comporta una parassitemia molto maggiore. Il metodo QBC® rimane un utile completamento, ma non un sostituto, dei metodi tradizionali di diagnosi della m., utilizzabile nei paesi industrializzati e nei centri più attrezzati dei paesi in via di sviluppo, ma in questi paesi i costi e la complessità della procedura non lo rendono applicabile per i programmi sanitari di base.

In questo contesto, caratterizzato da scarsità delle risorse economiche, mancanza di attrezzature e personale, il *Para Sight® test*, di facile attuazione, accessibile a personale con scarsa preparazione, può rappresentare una soluzione idonea per una diagnosi delle forme potenzialmente letali di m. e per una terapia antimalarica mirata. È auspicabile che

un perfezionamento del test, che attualmente presenta un basso tasso di specificità per *P. vivax*, consenta di estendere la diagnosi alle altre specie di parassiti malarici.

Per quel che riguarda il controllo parassitologico del sangue dei donatori provenienti da zone di endemia malarica è da considerare il fatto che in genere si tratta di persone clinicamente sane con tassi parassitemici molto bassi, difficilmente riscontrabili con gli esami microscopici correnti ma sufficienti, considerando il volume di sangue trasfuso e le condizioni dei riceventi, a produrre gravi casi di infezione malarica. Nell'eventualità in cui si dovessero controllare numerosi gruppi di donatori il riscontro microscopico richiederebbe tempi lunghi e ripetitività dei reperti negativi con conseguente possibile deconcentrazione dell'osservatore.

Come detto in precedenza in queste circostanze si può utilizzare uno screening preliminare con la ricerca degli anticorpi antimalarici (IFA; ELISA) o, meglio ancora con OBC*. Più precisi, ma utilizzabili solo in laboratori più attrezzati, il test di Taylor o la PCR.

Terapia

La terapia della m. è stata oggetto di alcune modifiche negli ultimi anni, legate soprattutto alle resistenze che si sono andate sempre più diffondendo, sia in Africa che in Amazonia ed in gran parte del Sud-Est asiatico, sia alla cloroquina che alle associazioni sulfamidici-pirimetamina.

Ferma restando la validità del trattamento con cloroquina nelle forme di malaria da *P. vivax* (con rare eccezioni), *P. ovale*, *P. malariae* e nelle forme da *P. falciparum* sensibile e della primachina nel trattamento radicale della terzana benigna; ferma restando anche l'importanza di medicinali come la meflochina, l'alofantrina e del chinino (che è ancora da considerare il farmaco principe nella terapia delle forme complicate), sono attualmente di uso comune medicinali come l'artemisinina ed i suoi derivati come l'artemetere e l'artesunate.

Artemetere è un derivato metiletere della diidroartemisinina a rapida ed intensa azione schizonticida. È reperibile, ma non in Italia, in fiale per via i.m. da 100 mg o in compresse da 50 mg, e si somministra alla dose di 300 mg il primo giorno, seguiti da 100 mg al dì per i successivi quattro giorni. Nei bambini i dosaggi sono di 3,2 mg/kg il primo giorno, seguiti da 1,6 mg/kg per altri quattro giorni. Nei casi di m. severa, il trattamento deve essere prolungato per sette giorni.

Artesunate (emisuccinato di artemisinina) in fiale da 60 mg per via e.v. o in compresse da 50 mg, si è dimostrato efficace alla dose di 5 mg/kg il primo giorno, seguito da 2,5 mg/kg il secondo e il terzo giorno in associazione con una dose terapeutica di meflochina (v. ARTEMISININA E DERIVATI**).

Un nuovo chinolonico, la pefloxacin, ha dimostrato *in vitro*, secondo una nostra esperienza, una azione schizonticida, anche se lenta. È un farmaco utile, in sostituzione delle tetracicline, che non sono più reperibili nella formulazione per via venosa, in associazione al chinino nella terapia della m. complicata.

Bibliografia

- Alonso P. L. et al., *Lancet*, 1994a, 344, 1175.
Alonso P. L. et al., *Vaccine*, 1994b, 12, 181.
Baird J. K. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 86, 3.
Ballou W. R., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 59.
Bathurst I. C., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 20.
Bawden U. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 302.
Beck H. P. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51 (3), 356.
Bruce Chwatt L. J., *Essential malariology*, 2 ed., 1985, Wiley, New York.
Chulay J. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 66.

- Clendennen T. E. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 89, 183.
Clyde D. F. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 24, 397.
Collins F. H., Paskewitz S. M., *Ann. Rev. Entomol.*, 1995, 40, 195.
de Oliveira G. A. et al., *Vaccine*, 1994, 12 (11), 1012.
Diggs C. L., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 1.
Fidock D. A. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1994, 64 (2), 219.
Genton B. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 537.
Golding B. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 33.
Gupta S. et al., *Science*, 1994, 263, 961.
Hakim S. L. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 89, 269.
Hoffman S. L. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51 (5), 603.
Hoffman S. L., Franke E. D., *Immunol. Lett.*, 1994, 41 (2-3), 89.
Hui G. S. N., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 41.
Hunt Cooke A. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 86, 378.
Hunter R. L., Lal A. A., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 52.
Jones T. R., Hoffman S. L., *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7 (3), 303.
Kawamoto F., *Lancet*, 1991, 337, 200.
Levine R. A. et al., *Par. Today*, 1989, 5 (4), 132.
Long C. A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 27.
McGregor I. A., *Br. J. Biomed. Sci.*, 1993, 50 (1), 35.
Miller L. H., Hoffman S. L., *Nature Medicine (Vaccine supplement)*, 1998, 4 (5), 520-524.
Miller R. L. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 31.
Namsiripongpun V. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 32.
Noya G. O. et al., *J. Inf. Dis.*, 1994, 170 (2), 396.
Nussenzweig R. S., Long C. A., *Science*, 1994, 265, 1381.
Pasloske B. L., Howard R. J., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 50 (4), 3.
Perrone J. B., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 86, 224.
Petersen E., Marbath N. T., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 416.
Poggensee U. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 86, 6.
Prenyi Z. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 418.
Ramasamy R. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, 99 (2), 168.
Ranawaka G. R. et al., *Parasitol.*, 1994, 109, 403.
Sempertegui F. et al., *Vaccine*, 1994, 12, 337.
Shiff C. I. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 646.
Snounou G. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, 58, 283.
Snounou G. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 649.
Sowunmi A., Akindele J. A., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 422.
Spielman A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1988, 39, 337.
Tassanakajou A. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 273.
Taylor D. W., Voller A., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 29.
Teuscher T. et al., *Vaccine*, 1994, 12 (4), 328.
Valero M. V. et al., *Lancet*, 1993, 341, 706.
Voller A., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 497.
Voller A. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 188.
Vuthi Ty Hang et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 89, 44.
White N. J., *Lancet*, 1994, 344, 1172.
Wilson S. M., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 87, 609.

CORRADO BIANCHINI, SERGIO SANGUIGNI E MASSIMO MARANGI

MALATO TERMINALE

1. terminally ill patient.

L'assistenza al malato terminale fatta con criteri umani e scientifici corretti può essere la risposta più giusta alla tentazione dell'eutanasia (v.; v.**; v. anche BIOETICA**) intesa come soppressione attiva del malato sofferente, soppressione che è attualmente respinta sia dall'etica medica che dal diritto.

Per la verità, viene oggi da alcuni avvertita, ed è stata anche recentemente segnalata da un articolo del *New England Journal of Medicine* (Miller et al., 1994), l'opportunità di legalizzare e di regolamentare con apposite norme la possibilità di una morte assistita dal medico (*physician-assisted death*).

Tale possibilità, secondo gli A.A. suddetti, riguarderebbe naturalmente solo malati terminali, o comunque incurabili, nel pieno possesso delle loro facoltà cognitive e volitive e nei quali si fossero rivelate sicuramente inefficaci le moderne misure di medicina palliativa. In altri termini, la morte assistita rappresenterebbe una misura estrema, volta «ai fini morali di alleviare la sofferenza dei pazienti e di rispettarne il diritto all'autodeterminazione». Le indispensabili garanzie nei confronti di possibili abusi sarebbero fornite, secondo tale proposta: a) dalla figura di un consulente me-

MALATO TERMINALE

dico terzo (diverso cioè dal medico curante del paziente in questione), esperto in medicina palliativa e dotato di «potere di veto» e b) da appositi comitati di medicina palliativa con funzioni di controllo, caso per caso, sulle decisioni sia del medico curante che del medico consulente.

Va, in ogni caso, ricordato che, attualmente, ampie sono le possibilità di assistenza farmacologica e strumentale che la medicina ha a sua disposizione e che consentono di prolungare la sopravvivenza di un soggetto per periodi anche lunghi in condizioni generali accettabili o, comunque, di evitare al malato sofferenze inutili.

L'applicazione dei trattamenti in questione può esigere una preparazione tecnica ed emozionale non sempre presente nel medico di normale formazione. Perciò è nata una branca della medicina che è stata indicata con la denominazione di *medicina palliativa*.

Le cure in questione si propongono di affrontare l'imminenza della morte, o meglio il processo che porta alla morte, dando una risposta adeguata ai problemi che si pongono all'uomo che sa di dover affrontare a scadenza prossima una morte annunciata e non più evitabile; l'adeguatezza delle risposte deve riguardare sia gli aspetti più strettamente medici che quelli psicologici.

Kubler-Ross ha postulato l'esistenza di cinque diversi stadi emotivi nel paziente che si avvicina alla morte; secondo molti autori tali stadi emotivi sono presenti nella gran parte dei soggetti mentre può essere diverso il modo di viverli a seconda delle caratteristiche personali ma ancora di più a seconda delle risposte che la società riesce a dare a tali pazienti.

Il primo stadio è il rifiuto della diagnosi, spesso sostenuto da coloro, medici e non, che assistono il malato e che, distorcendo totalmente la realtà, possono rendere la situazione molto difficile al momento dell'aggravarsi della malattia.

Il secondo stadio, ove il paziente giunga alla consapevolezza, è l'angoscia; momento durissimo per il malato per il quale la necessità di un sostegno è assoluta.

Può seguire a questo il terzo stadio, il cosiddetto patteggiamento: il malato vorrebbe patteggiare con Dio o con la vita per strappare un prolungamento di sopravvivenza per raggiungere scopi da lui indicati come molto importanti e fino a quel momento trascurati.

Il periodo che segue, quarto stadio, è caratterizzato dalla depressione, che è facilitata da avvenimenti quali il ricovero in ospedale per il peggioramento della sintomatologia con conseguente isolamento rispetto all'ambiente familiare del malato.

L'accettazione della morte, come quinto e ultimo stadio del processo psicologico indicato non si verifica in ogni caso, perché anche in condizioni di malattia all'ultimo stadio, con deterioramento fisico imponente alcuni soggetti mantengono una speranza di vita che può svolgere un ruolo importante nel partecipare attivamente alle terapie.

Lo schema indicato può servire come guida a chi si trovi ad assistere un soggetto affetto da un male inguaribile e/o allo stato terminale, ricordando però che tale processo non è sempre presente in tutte le sue fasi o può esserlo con intensità diverse.

È evidente quindi che l'assistenza non può e non deve limitarsi alle cure fisiche, medicamentose o strumentali, ma deve tenere conto della situazione psicologica del soggetto.

La medicina palliativa che persegue il «bene» del paziente deve non solo cercare di lenire le sofferenze, ma anche tendere a limitare le complicanze causate da altre sofferenze: vanno pertanto curati i decubiti, le malattie intercorrenti; i fastidi dovuti a posture obbligate, etc. Il tutto,

come si è detto, accompagnato da un'assistenza psicologica ed emozionale che sia espressione di fattiva solidarietà e che come tale sia vissuta dal malato.

Tale tipo di assistenza può esser dato in ospedale ma anche a domicilio, purché si disponga di *équipes* addestrate e di un minimo di attrezzatura che consenta una assistenza continuativa erogata con criteri di scientificità. In tali gruppi di lavoro, nei quali è importantissimo l'affiatamento, possono avere posto le diverse competenze (medici, infermieri, psicologi), ma con buonissimi risultati specie sul piano umano, possono esser addestrati familiari del malato o volontari. La medicina palliativa è diretta anche ai malati cronici, ma nel caso dei malati terminali deve essere particolare l'addestramento e l'impegno degli operatori che si trovano in una situazione spesso difficile per il coinvolgimento emotivo al quale difficilmente riescono a sottrarsi.

Bibliografia

- Maier D. M., Newman M. J., *Behavioral Sciences and the Law*, 1995, 13, 3.
Miller F. G., Quill T. E., Brody H. et al., *N. Eng. J. Med.*, 1994, 331, 119.
Puccini C., *Istituzioni di Medicina legale*, 1993, CEA, Milano.
Saunders E., *Hospice and palliative care*, 1990, Arnold London.

MATILDE ANGELINI ROTA

MALATTIE AUTOIMMUNI [v. vol. IX, coll. 151-184; v. anche ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI, X, 1878-1892; Agg. I, coll. *5558-5573]

SOMMARIO GENERALE

RECENTI PROGRESSI NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI col. 3492

MALATTIE AUTOIMMUNI IN OTORINOLARINGOIATRIA col. 3520

RECENTI PROGRESSI NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

SOMMARIO

Premessa (col. 3492). - «Nuove» malattie autoimmuni (col. 3493). - Autoantigeni. Classificazione delle malattie autoimmuni (col. 3496). - Genetica delle malattie autoimmuni (col. 3499). - Modalità di autoimmunizzazione (col. 3501): Teorie degli antigeni segregati. - Teoria della selezione clonale. - Citochine e malattie autoimmuni (col. 3506). - Infezioni e malattie autoimmuni (col. 3509). - Terapia delle malattie autoimmuni (col. 3511): Ablazione di cellule staminali emopoietiche. - Tolleranza immunitaria nei confronti dell'autoantigene in causa. - Immunosoppressione aspecifica con agenti biologici. - Terapia citochino-mirata.

Premessa

Se vi è un capitolo dell'immunologia nel quale anche i cultori della materia faticano a mantenersi aggiornati, questo è rappresentato dall'autoimmunità e dalle malattie autoimmuni [m. a.].

Nella consapevolezza del fatto che molte delle «novità» e delle «teorie rivoluzionarie» in questo settore assai spesso rappresentano soltanto una «moda», destinata, come tale, ad essere soppiantata in tempi relativamente brevi, nella presente rassegna, rifuggendo la tentazione di dare la «last minute information», tenteremo: a) di limitare l'aggiornamento a quei dati che, per quanto recenti e da sottoporre ancora al vaglio di ulteriori verifiche, sono a nostro avviso meno esposti al rischio di successive smentite e, per contro, b) di rivedere in luce critica alcune «novità», soprattutto nel settore della terapia.

«Nuove» malattie autoimmuni

Rispetto agli elenchi riportati nelle voci precedenti (v. MALATTIE AUTOIMMUNI [IX, 151]; ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI [v.; v.*; Agg. I, col. *5558]) la lista delle m. a. si è estesa: per alcune condizioni morbose la patogenesi autoimmune viene oggi comunemente accettata, per altre fondatamente sospettata (tab. I).

Per molti anni la *vitiligine* è stata considerata come un marcatore clinico di m. a. organo-specifiche, in particolare delle endocrinopatie autoimmuni. A decorrere dagli anni '70 è stata dimostrata l'elevata frequenza, nei soggetti vitiligoidei e nei loro familiari di primo grado, di autoanticorpi rivolti verso autoantigeni della tiroide e dello stomaco.

Negli anni '80 è stata svelata l'esistenza di autoanticorpi capaci di reagire con autoantigeni dei melanociti, e nel 1994 è stata per la prima volta fornita la dimostrazione che il principale autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti-melanociti è rappresentato dalla tirosinasi, enzima coinvolto nella formazione della melanina a partire dalla tirosina.

Gli anticorpi anti-tirosinasi sono documentabili in oltre il 60% dei soggetti con vitiligine, ed i titoli di positività sono significativamente più elevati nei pazienti con vitiligine diffusa rispetto a quelli con vitiligine localizzata. Titoli elevati di anticorpi anti-tirosinasi sono stati rilevati anche in pazienti con melanoma — in particolare in quelli con malattia metastatica — ma il significato di questo dato è ancora incerto. Gli anticorpi anti-tirosinasi sono apparsi in grado di indurre riduzione del numero dei melanociti e ipopigmentazione in un sistema *in vivo* in cui frammenti di cute umana sono stati innestati in topi atimici *nu/nu*, ai quali sono state quindi trasfuse dosi elevate di IgG umane derivate da soggetti con vitiligo o da donatori sani di controllo. Inoltre, precursori di linfociti T citolitici (CTL) tirosinasi-specifici (dimostrabili anche in soggetti sani, a livello di sangue periferico), allorché attivati da un nonapeptide sintetico della tirosinasi diventano atti a indurre la lisi di cellule bersaglio (cellule di melanoma e altre) che esprimano sulla loro superficie la tirosina. La vitiligine pertanto, da marcatore clinico di malattie autoimmuni conclamate o subcliniche, è diventata essa stessa un prototipo di m. a.

TAB. I. «NUOVE» CONDIZIONI MORBOSE PER LE QUALI È STATA ACCERTATA O PROSPETTATA UNA PATOGENESI AUTOIMMUNE

Patogenesi autoimmune accertata	Autoantigeni
Vitiligine	Tirosinasi
Orticaria cronica idiopatica	Recettore ad alta affinità per le IgE (FcεR1) IgE Altri autoantigeni associati ai mastociti e ai basofili?
Uveite autoimmune	Antigene retinico S <i>Inter-photo-receptor-binding-protein</i> (IRBP)
Ipparatiroidismo idiopatico acquisito	Recettore extra-cellulare del calcio (<i>Calcium sensing receptor</i>)
Patogenesi autoimmune possibile	Autoantigeni
Sindromi paraneoplastiche del S.N.C. — encefalomielite — degenerazione cerebellare — «stiff-man syndrome» (sindrome dell'uomo rigido) — sindrome opsoclonomiocloni (forma dell'adulto)	Proteine neuronali «Hu», RNA liganti Proteina Y ₉ del citoplasma delle cellule cerebellari di Purkinje Amifisina, proteina associata alle vescicole sinaptiche Proteina Ri, espressa nei nuclei neuronali
Sindromi paraneoplastiche del S.N.P. — sindrome di Eaton-Lambert — neuromiotonia acquisita (sindrome di Isaacs) — retinopatia	Canali del calcio Canali del potassio Recoverina, proteina intracellulare legante il calcio Subunità del recettore del glutammato (GluR3)
Encefalite di Rasmussen	Cellule cerebrali, colinergiche, pituitariche, microgliali; astrociti; proteine dei filamenti neuro-associati; placche neuritiche; proteina basica della mielina; proteina β-amiloide
Morbo di Alzheimer	MAG (glicoproteina associata alla mielina) SGPG (sulfoglucuronil paragloboside)
Polineuropatie demielinizzanti	Gangliosidi (G _{M1} , GD1a e b, GT1b, sialosil paragloboside, sialosil lactosaminil paragloboside)
Sindrome di Guillain-Barré	Recettori β1-adrenergici Recettori muscarinici Miosina Proteine mitocondriali Actina Tubulina HSPs (proteine da stress) ATP-asi del reticolo sarcoplasmatico
Cardiomiopatia dilatativa	Calmodulina Peptidi cerebrali
Schizofrenia e altri disordini psichiatrici	Proteina mielinica Po, delle cellule di Schwann dei nervi periferici HSP70 Collagene tipo II
Malattie dell'orecchio interno (ipoacusia neurosensoriale idiopatica, otosclerosi, malattia di Meniere)	

Anche per un'altra affezione cutanea, la *orticaria cronica idiopatica*, è stata di recente documentata una patogenesi autoimmune. Nel 50% dei pazienti con tale disordine, infatti, sono dimostrabili autoanticorpi rivolti verso la subunità α dei recettori ad alta affinità per le IgE (Fc ϵ RI α), espressi sui mastociti e sui basofili (nonché su altri tipi cellulari) e in oltre il 15% dei casi sono dimostrabili autoanticorpi IgG rivolti verso le IgE. In sistemi *in vitro* e *in vivo* tali autoanticorpi sono apparsi in grado di indurre, direttamente o con la mediazione delle IgE, l'accoppiamento degli Fc ϵ RI e di innescare, quindi, la sequenza di eventi che porta alla liberazione dei mediatori dell'anafilassi (fig. 1).

Altri fattori tuttora non identificati ma ugualmente capaci di attivare mastociti e/o basofili sembrano essere presenti nel siero dei pazienti con orticaria cronica idiopatica, e ciò rappresenta un campo di studio in pieno svolgimento, anche per le più vaste implicazioni che i risultati in questo settore potrebbero avere nella patogenesi dei disordini immunoallergici e para-allergici.

Da alcuni decenni si sospettava che l'*ipoparatiroidismo idiopatico acquisito* potesse riconoscere un meccanismo autoimmune. Tuttavia, soltanto nel 1996 tale ipotesi è stata confortata dalla clonazione e caratterizzazione di un recettore extracellulare per il calcio (*Calcium-Sensing Receptor*, proteina di 120 kD appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G) e dalla dimostrazione

della presenza di autoanticorpi rivolti verso tale recettore in oltre il 50% dei pazienti con ipoparatiroidismo acquisito (nessun caso di positività tra i soggetti di controllo).

Analoghe considerazioni valgono per i casi di *uveite* di sospetta origine autoimmune, per i quali sono ora ben documentate risposte immunitarie rivolte verso l'antigene retinico S e verso una miscela di antigeni retinici solubili, ivi compresa la proteina legante i fotorecettori.

La lista delle condizioni morbose per le quali viene prospettata una patogenesi autoimmune diventa progressivamente più estesa ed è giunta ad includere anche *disordini mentali* e numerose *sindromi paraneoplastiche*.

Particolarmente studiate, al riguardo, sono le *sindromi neurologiche paraneoplastiche* che insorgono nel 2-3% dei pazienti con carcinoma polmonare a piccole cellule e, con frequenza forse lievemente inferiore, in pazienti con neuroblastomi, tumori maligni ginecologici e timoma maligno. I dati attualmente disponibili indicano chiaramente che queste sindromi paraneoplastiche sono spesso correlate a risposte immunitarie rivolte verso antigeni tumore-associati *cross-reattivi* con antigeni proteici neuronali, in particolare con i canali ionici.

Autoantigeni. Classificazione delle malattie autoimmuni

Gli studi in questo settore hanno condotto: a) all'ulteriore conferma che la maggior parte degli autoantigeni d'organo

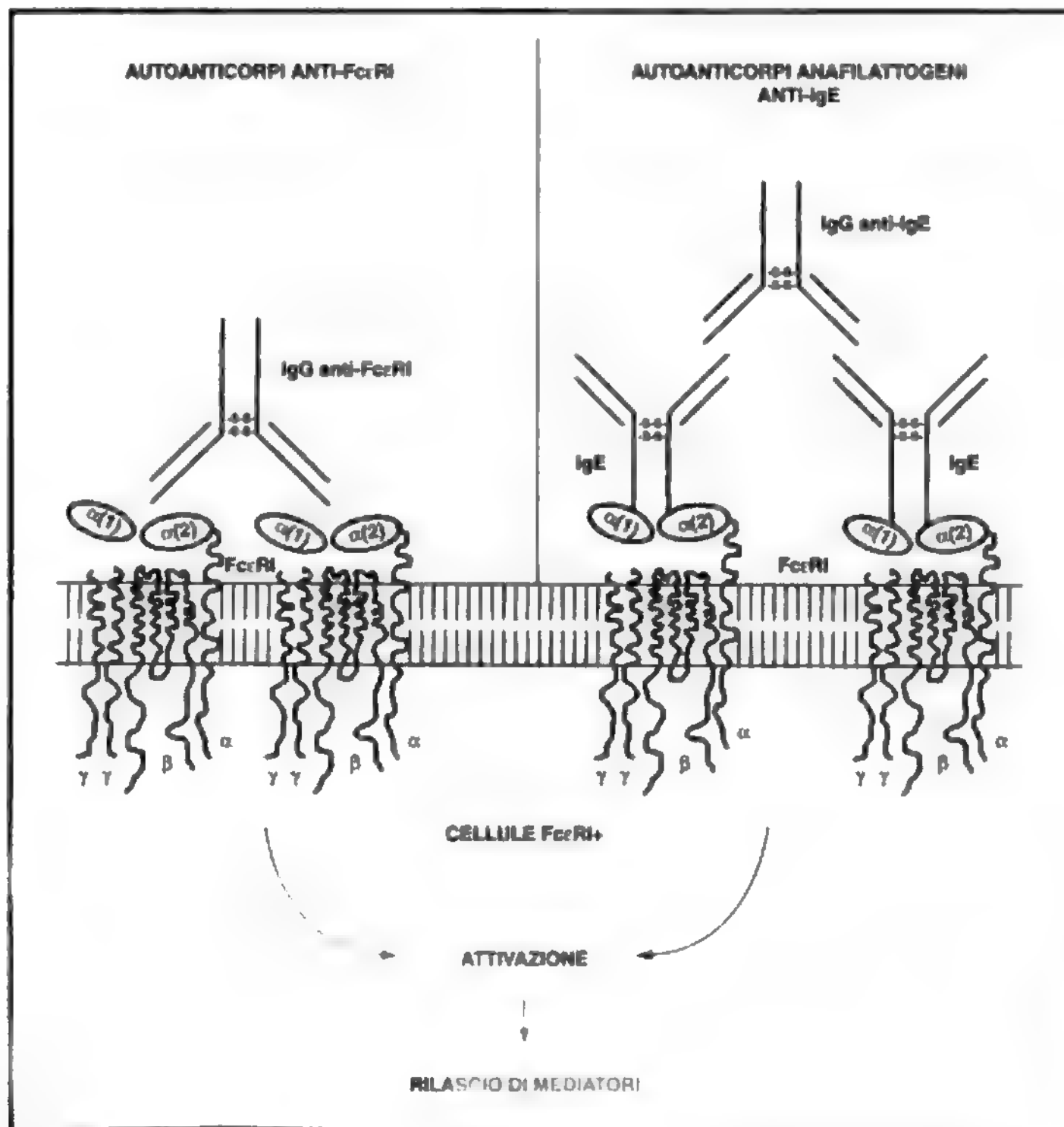


Fig. 1. Rappresentazione schematica dei meccanismi autoimmunitari che intervengono nell'orticaria cronica idiopatica e in altre malattie allergiche (IgE-mediate) o pseudoallergiche. Fc ϵ RI = Recettore ad alta affinità per le IgE.

e parte degli autoantigeni diffusamente distribuiti (ad es. la proteinasi 3 e la mieloperoxidasi, bersaglio, rispettivamente, degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili di tipo «c» e di tipo «p» riscontrabili in pazienti con granulomatosi di Wegener o con altre vasculiti necrotizzanti) sono di natura enzimatica (tab. II); b) alla clonazione, alla sequenziazione e, talvolta, alla cristallizzazione di molti di tali autoantige-

ni (ad es., della perossidasi tiroidea, della proteinasi 3, dell' H^+/K^+ -ATPasi gastrica, etc.) ed al riconoscimento che gli autoepitopi immunodominanti risiedono in siti molecolari necessari alla funzione enzimatica; c) alla dimostrazione del fatto che, in genere, l'immunogenicità degli autoepitopi riconosciuti dalle cellule T (autoepitopi T) risiede in brevi sequenze lineari dell'antigene, mentre quella degli autoepitopi B è legata alla struttura conformazionale; d) all'identificazione di un numero rilevante ed in continuo aumento di «nuovi» autoantigeni capaci di suscitare risposte autoimmunitarie umorali e/o cellulari rilevanti dal punto di vista patogenetico.

Ricordiamo a tal proposito, ad es.: la α -fodrina, proteina del citoscheletro di 120 kD estratta dalle ghiandole salivari nella sindrome di Sjögren; l'autoantigene Spl, attivatore della trascrizione RNA-polimerasica II, in grado di indurre risposte autoimmunitarie specifiche nei pazienti con connettiviti indifferenziate; la subunità C9 del proteasoma 20S (complesso proteasico multicatalitico implicato nella degradazione proteica non lisosomale) che sembra rappresentare il principale bersaglio degli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da miositi infiammatorie, etc.

I progressi nelle conoscenze nel settore degli autoantigeni e dei meccanismi effettori dei processi autoimmunitari giustificano ulteriormente la distinzione, da noi già proposta nella voce ORGANOSPECIFICI E NON-ORGANOSPECIFICI AUTOANTICORPI*, delle m. a. dell'uomo in 3 gruppi principali (tab. III). Tale classificazione pone in risalto: a) la differente natura degli autoantigeni in causa; b) i differenti meccanismi di lesione; c) la differente partecipazione delle cellule Th1 o Th2 al determinismo del disordine autoimmunitario (v. successivamente *citochine e malattie autoimmuni* a col. **3506, e cfr. fig. 5, a col. **3507-3508).

La denominazione Th1 e Th2 è qui mantenuta per semplicità espositiva, anche se più appropriata sarebbe la distinzione in «citochine di tipo 1» e «citochine di tipo 2». È infatti oggi acquisito che un determinato profilo citochinico può derivare dall'attività secretoria di differenti tipi cellulari (macrofagi, eosinofili, neutrofili, mastociti, cellule epiteliali e altre) anche se, probabilmente, il contributo principale viene fornito dalle cellule Th (Th1, Th2 e, forse, Th3 capaci di secernere, contrariamente ai primi due tipi, quantità apprezzabili di TGF- β o *Transforming Growth Factor- β*).

TAB. II. ESEMPI DI «BERSAGLI» DI NATURA ENZIMATICA NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI DELL'UOMO

Malattia	Enzima bersaglio
Tireopatie autoimmuni	Perossidasi tiroidea
Gastrite autoimmune/anemia perniciosa	H^+/K^+ -adenosintrifosfatasi
Diabete autoimmune	GAD65 e GAD67, carbossipeptidasi H, tirosin fosfatasi (ICA-512, IA-2 e IA-2 β)
Morbo di Addison, poliendocrinopatie autoimmuni, menopausa precoce, ipogonadismo	21-OH, 3 β -OLO-deidrogenasi, 17 α -OH, P450c27-sec, P450c21, P450c17
Vitiligine	Tirosinasi
Epatite cronica attiva	P450IID6, PDC
Cirrosi biliare primitiva, colangiopatia autoimmune	2-OADC (PDC, BCOADC, OGDC), anidrase carbonica II
Pancreatite cronica idiopatica	Anidrase carbonica I e II
Granulomatosi di Wegener	Proteinasi 3 neutrofila
Poliarterite microscopica e altre vasculiti	Mieloperoxidasi, elastasi, altri enzimi leucocitari
Sclerosi sistemica progressiva	DNA-topoisomerasi I (Scl70)
Dermatomiosite/polimiosite	RNA-polimerasi I, II e III Istidil-tRNA sintetasi (Jo1) Treonil-tRNA sintetasi (PL-7) Alanil-tRNA sintetasi (PL-12) Glicil-tRNA sintetasi (Ej)

GAD = decarbossilasi dell'ac. glutammico; 21-OH, 17-OH = rispettivamente 21 e 17 α -idrossilasi; P450 = citocromi P450; PDC = complesso piruvato deidrogenasi; 2-OADC = 2-oxo acid dehydrogenase complex, BCOADC = branched chain 2-OADC; OGDC = 2-oxo-glutammile dehydrogenase complex.

TAB. III. CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI (M. A.)

Caratteristiche	Gruppo I M. A. con lesioni anatomiche d'organo	Gruppo II M. A. con alterazioni funzionali	Gruppo III M. A. con lesioni sistemiche
Esempi clinici	Tiroidite di Hashimoto Altre endocrinopatie Gastrite di tipo «A» Vitiligine	Morbo di Basedow Ipotiroidismo congenito? Gozzo (alcuni casi) Miastenia Orticaria cronica	LES e altre connettiviti
Natura degli autoantigeni	Prevalentemente enzimi cellulari	Recettori di membrana	Prevalentemente associati ai nuclei e al collagene
Meccanismo prevalente di lesione	Citotossicità T con il concorso degli autoanticorpi (mecc. di ADCC e/o di tipo II)	Effetto «stimolatorio» o «inibitorio» di autoanticorpi	Prevalentemente complessi immuni autoantigene-autoanticorpo
Istologia	Infiltrato flogistico localizzato agli organi bersaglio	Non infiltrato flogistico	Infiltrato flogistico diffuso ai vari organi o apparati coinvolti
Sottotipo prevalente di cellule T CD4 ⁺	Th1 (IFN- γ , TNF- α)	Th2 (IL-3, -4, -5, -10, -13)	Th2?

Genetica delle malattie autoimmuni

Tutti i dati sperimentali e clinici concordemente indicano che la suscettibilità alle m. a. è in larga misura geneticamente programmata.

Questa acquisizione, cui si era già pervenuti sulla base dei risultati degli studi di genetica formale (studi popolazionistici, familiari, gemellologici) è stata ulteriormente convalidata dai risultati delle indagini immunogenetiche. L'associazione genetica meglio definita con le m. a. è, infatti, allo stato attuale delle conoscenze, quella correlata al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, HLA nell'uomo). Tale associazione non è certo inaspettata, dal momento che molte (se non tutte) delle m. a. dell'uomo sono T-dipendenti e che tutte le risposte T-cellulari sono MHC-ristrette.

La configurazione tridimensionale delle molecole HLA di classe I e II è stata determinata, rispettivamente, nel 1987 e nel 1993. Le indagini successive a quelle tuttora in corso sono volte a precisare la struttura degli alleli delle molecole HLA di classe II correlati alle m. a. ed i complessi meccanismi che stanno alla base del legame di un definito peptide «self» con un definito allele e della sua «presentazione» alla cellula Th, via TCR (recettore della cellula T). Alcune importanti informazioni al riguardo sono già disponibili. Ad es., l'analisi del polimorfismo aminoacidico che contrassegna il solco (o nicchia) del peptide delle molecole HLA-II ha permesso di stabilire come il legame di un peptide «self» dipenda, tra l'altro, dalla carica elettrica del peptide da un lato e dei residui aminoacidici della nicchia per il peptide, dall'altro. V. anche HLA (v.; v.*; v.**).

Questo modello «carica-carica» è stato dimostrato nell'artrite reumatoide (AR) e nel pemfigo volgare (PV). Entrambe le malattie sono significativamente correlate all'antigene HLA-DR4. Esistono, tuttavia, 22 sottotipi conosciuti di HLA-DR4. Le varianti alleliche associate all'AR, DRB1*0401, DRB1*0404, differiscono da quella associata al PV, DRB1*0402, soltanto per i residui polimorfici in posizione 67-71 sulla catena DRβ: di questi, il DRβ71 ha un ruolo critico nel definire se e quale peptide «self» si legherà alla molecola DR4 associata all'AR ovvero a quella associata al PV. Nell'AR, infatti, l'aminoacido in posizione β71 (generalmente l'arginina) ha un residuo caricato positivamente, ed è quindi in grado di accogliere soltanto peptidi associati all'AR aventi nella posizione di legame un residuo carico negativamente; viceversa, nel PV l'aminoacido in posizione β71 (di solito ac. glutammico) ha carica negativa, pertanto in grado di accogliere soltanto peptidi con carica positiva in posizione critica. Uno di tali peptidi è stato identificato nella molecola del principale autoantigene del PV, la desmogleina 3, molecola di adesione importante per l'aderenza dell'epidermide al derma sottostante.

Queste osservazioni per la prima volta pongono in rilievo come un singolo aminoacido in posizione critica possa condizionare il legame di un peptide alla tasca e come dalla sua unica sostituzione — ad es., per mutazioni puntate — possa dipendere la suscettibilità o la resistenza ad una definita m. a. La stretta associazione tra suscettibilità allo sviluppo del diabete di tipo I e allele DQB1*0302, legata alla sostituzione, nella posizione 57 della catena DQβ, dell'ac. aspartico con un aminoacido neutro (alanina, valina, serina) sembra confermare tale possibilità. Gli studi di Hugh McDermott, della Stanford University, sembrano indicare che gli alleli MHC di classe II associati a suscettibilità al diabete condizionano una prevalente risposta Th1, mentre quelli associati a protezione suscitano una prevalente risposta Th2 (cfr. fig. 5).

Nonostante l'innegabile importanza di queste acquisizioni, tutti gli studi più recenti, ed in particolare quelli de-

sunti da indagini relative a modelli di m. a. in animali transgenici o, al contrario, «knockout» (nei quali, rispettivamente, viene inserito o viene soppresso — messo KO — il gene che codifica per una definita proteina e funzione) concordemente indicano che le m. a. rappresentano un tratto genetico complesso al quale contribuiscono non soltanto geni MHC-associati ma anche, e forse in misura maggiore, geni non MHC-associati: geni per le immunoglobuline; geni per il TCR (in alcune m. a., come nella sclerosi multipla, sembra esservi un utilizzo preferenziale di particolari aplo-tipi del TCR); geni per il complemento; geni per le citochine; geni favorenti od inibenti i processi apoptotici; geni *Yaa* (associati al cromosoma Y in grado di accelerare l'autoimmunità); geni della tirosin-chinasi e della tirosin-fosfatasi (associati alla funzione delle cellule B) e altri.

Nel LES «spontaneo» murino, in particolare nei topi NZB o negli ibridi F1 (NZBxNZW), ad es., oltre al locus MHC (H2, localizzato sul cromosoma 17) almeno altri 12 loci non MHC-legati sono correlati al tratto lupo. Tra questi, un locus localizzato sulla parte distale del cromosoma 1 e designato come *Nba2* (per New Zeland Black autoimmunity-2) appare significativamente correlato alla formazione e ai livelli di molteplici autoanticorpi (anti-cromatina, anti-istone, anti-DNA a doppia o a singola elica) ed allo sviluppo della nefropatia (tab. IV).

Analoghe osservazioni valgono per le altre m. a., incluse quelle organo-specifiche: ad es., nei topi NOD (che rappresentano la controparte animale del diabete autoimmune dell'uomo) almeno 12 differenti geni influenzano lo sviluppo e l'evoluzione della malattia, ma soltanto uno o due di questi sono localizzati nel locus MHC.

TAB. IV. LOCALIZZAZIONI CROMOSOMICHE DI GENI NON-MHC^(*) ASSOCIATI ALLO SVILUPPO DEL LES MURINO

Cromosoma	Gene	Tratto prevalente
1	<i>Sle1</i>	glomerulonefrite
	<i>Nba2</i>	glomerulonefrite e produzione di autoanticorpi
	<i>Lbw7</i>	produzione di autoanticorpi
	<i>FAS-1</i>	deficit di apoptosi, produzione di autoanticorpi
4	<i>Fcgr2</i>	deficit di recettori per IgG, glomerulonefrite
	<i>Lbw2</i>	glomerulonefrite
	<i>Nba1</i>	glomerulonefrite
	<i>Sle2</i>	glomerulonefrite
5	<i>Ata1</i>	anemia emolitica autoimmune
	<i>Lbw3</i>	glomerulonefrite e produzione di autoanticorpi
7	<i>Lbw5</i>	glomerulonefrite
	<i>D7Mit7</i>	glomerulonefrite
	<i>Nba3</i>	produzione di autoanticorpi
	<i>Baal</i>	produzione di autoanticorpi (IgM)
11	<i>Lbw8</i>	produzione di autoanticorpi
16	<i>Nwa1</i>	produzione di autoanticorpi
18	<i>Lbw6</i>	glomerulonefrite e produzione di autoanticorpi
	<i>Nwa2</i>	produzione di autoanticorpi
19	<i>FAS</i>	deficit di apoptosi, produzione di autoanticorpi

(*) Locus MHC (H2) è localizzato sul cromosoma 17.

L'insieme di questi dati indica chiaramente che le conoscenze sugli aspetti genetici delle m. a. dell'uomo sono ancora in fase embrionaria.

Modalità di autoimmunizzazione

Nel corso degli anni varie teorie sull'autoimmunità, tra loro non mutualmente esclusive, sono state prospettate (tab. V). L'essenza di tali teorie è stata da noi già esposta nelle precedenti edizioni di questa Enciclopedia e in altre trattazioni (Masala, 1989). Ci limiteremo pertanto a illustrare in questa sede come alcune delle teorie più recenti, indicate in tabella, altro non rappresentino, in realtà, se non una «rivisitazione» aggiornata ed una integrazione di «vecchie» ipotesi.

Nel 1959 Sir Macfarlane Burnet formulò le sue due «classiche» teorie sull'autoimmunità: quella degli antigeni «segregati» o «inaccessibili» e quella della selezione clonale e dei «cloni proibiti» (autoreattivi).

Teoria degli antigeni segregati

Per quanto concerne la *teoria degli antigeni segregati*, è ovvio che la concezione originale secondo cui alcuni autoantigeni, come la tireoglobulina, risiedono in compartimenti completamente inaccessibili alle cellule del sistema immunitario, e nei loro confronti non si viene pertanto ad instaurare uno stato di tolleranza immunologica, non è ulteriormente accettabile. Alla luce delle più recenti acquisizioni, tuttavia, la teoria degli antigeni «segregati» può essere riproposta nelle seguenti versioni.

a) *Mancata esposizione di autoantigeni periferici nel timo.* — Molti autoantigeni implicati nelle m. a. organo-specifiche (perossidasi tiroidea nelle tiroiditi; H^+/K^+ -ATPasi gastrica e fattore intrinseco nella gastrite di tipo «A» e nell'anemia perniciose; decarbossilasi dell'ac. glutammico nel diabete giovanile insulino-dipendente; proteina basica della mielina nell'encefalite sperimentale, e altri) possono non essere — e di fatto sembra che non vengano — esposti a livello timico durante lo sviluppo embrionario; essi pertanto non giungono a contatto col repertorio T-cellulare in fase di sviluppo e non inducono uno stato di tolleranza centrale.

TAB. V. PRINCIPALI TEORIE SULL'AUTOIMMUNITÀ

Anni '60

- Liberazione di autoantigeni anatomicamente «segregati» o inaccessibili
- Emergenza di «cloni proibiti» autoreattivi

Anni '70

- Tolleranza «parziale» o «incompleta», limitata alle cellule T
- Deficit di attività T-soppressoria

Anni '80

- Mimetismo molecolare (cross-reattività immunologiche tra autoepitopi ed eteroepitopi)
- Mutazioni somatiche, anche di un singolo aminoacido, a livello di autoepitopi, di MHC di classe II, di TCR e/o di autoanticorpi
- Anomalie del «network» idiotipico
- Iperattivazione primaria o secondaria (ad es., per effetto di superantigeni) di cellule T e/o B autoreattive
- «Aberrante» espressione di molecole HLA di classe II

Anni '90

- Induzione di risposte autoimmuni rivolte verso antigeni «criptici» o «subdominanti»
- Difetti dell'apoptosi
- Difetti nei circuiti co-stimolatori
- Squilibri Th1-Th2

A conferma di questo assunto depone il fatto che l'iniezione intratimica degli autoantigeni sopra ricordati o la loro espressione transgenica a livello timico previene lo sviluppo della relativa m. a. «spontanea» (in animali geneticamente predisposti, ad es., il diabete nei topi NOD) o sperimentalmente provocata (ad es., la tiroidite o la gastrite autoimmune).

La mancata risposta immunitaria nei confronti di autoantigeni d'organo non espressi a livello timico («tolleranza periferica») può essere dovuta o ad una mancata «presentazione» alle cellule del sistema immunitario, ovvero, più probabilmente, ad una «presentazione» inadeguata. Una delle modalità meglio note di presentazione inadeguata è rappresentata dall'assenza degli appropriati segnali co-stimolatori da parte di cellule presentanti l'antigene (APC: *Antigen Presenting Cell*) non «professioniste» (fig. 2). In questo caso la cellula T $CD4^+$ può: a) non rispondere affatto alla stimolazione autoantigenica («self-ignorance»); b) diventare insensibile a stimolazioni successive, anche se correttamente apportate, con lo stesso autoantigene («anergia clonale», transitoria o duratura); c) andare incontro a morte per un processo apoptotico («delezione clonale»).

b) *Dismissione di autoantigeni anatomicamente «sequestrati».* — Processi infiammatori comunque indotti (cause fisiche, chimiche o biologiche) possono favorire una massiva liberazione di autoantigeni da parte delle cellule lese. Questi autoantigeni possono essere internalizzati da cellule dendritiche («vere» APC professioniste, che costituiscono l'1-5% delle cellule tessutali attivate da citochine pro-infiammatorie) e peptidi autoantigenici possono essere riespressi sulla membrana plasmatica nel contesto di molecole HLA di classe II (o anche di classe I) e presentate, a livello

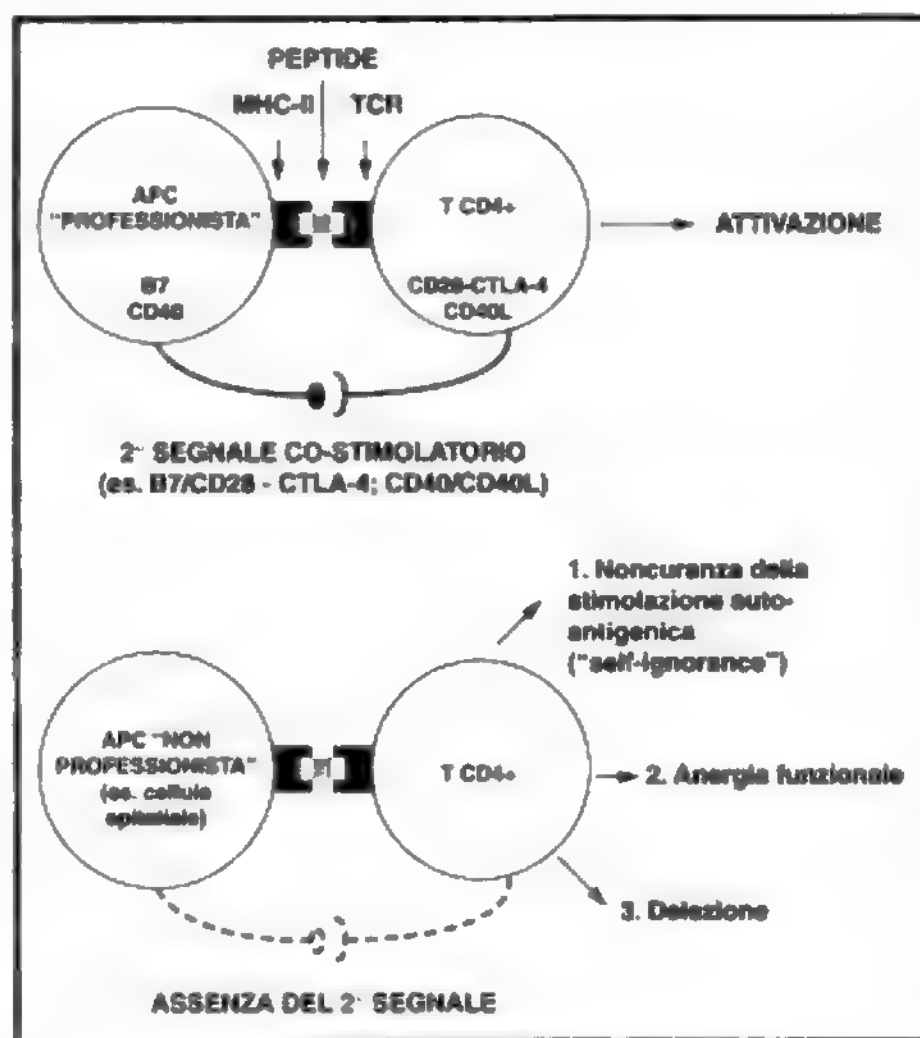


Fig. 2. Importanza dell'appropriata presentazione dell'antigene per l'attivazione T linfocitaria. APC = Cellula presentatrice dell'antigene; TCD4⁺ = linfociti T helper CD4⁺; MHC-II = Molecole di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità; TCR = recettore per l'antigene delle cellule T.

di linfonodo drenante, ai linfociti T «naïve». Tali linfociti, una volta attivati, possono migrare verso il tessuto infiammato dove incontrano l'autoantigene, dando così l'avvio ad una vera reazione autoimmune.

c) *Dislocazione sulla membrana cellulare di autoantigeni «sequestrati» in compartimenti intracellulari.* - Molti degli autoantigeni noti sono associati ai nuclei o al citoplasma. Tale compartimentalizzazione, tuttavia, non è assoluta, e per vari fattori (aumentata sintesi e processazione di proteine endocellulari, effetti di virus, radiazioni U.V., shock termico e altri stress, etc.) peptidi autoantigenici intracellulari potrebbero traslocare sulla membrana plasmatica. Ad es., l'infezione *in vitro* di cellule Hep-2 con l'Adenovirus di tipo 2 induce una redistribuzione dell'autoantigene nucleare SSB/La, con espressione di questo, prima nel citoplasma e poi sulla membrana plasmatica. In effetti, l'espressione in superficie di proteine cellulari «profonde» (dimostrata per nucleolina, snRNP, SSA/Ro, SSB/La, Po, Ku, proteine da stress e altre) sembra costituire un evento non del tutto raro; queste proteine potrebbero rappresentare isoforme di quelle native e assumere rilevanza immunologica in rapporto alla loro concentrazione e appropriata presentazione in un terreno geneticamente favorevole.

d) *Espressione di epitopi «sequestrati» a livello molecolare.* - Durante la processazione di antigeni complessi vengono di norma generati diversi peptidi, ciascuno dotato di affinità più o meno elevata per le molecole MHC deputate alla loro «presentazione» alle cellule immunocompetenti. Un'esigua minoranza dei peptidi generati sono «immunodominanti» e la loro presentazione ai timociti induce una efficace tolleranza centrale (cfr. fig. 3). Altri — ed in particolare quelli costituiti da sequenze aminoacidiche che confinano con le sequenze immunodominanti — non vengono efficacemente «presentati» e vanno a costituire, in-

sieme a regioni particolarmente idrofobiche della molecola, i cosiddetti epitopi «criptici» o «subdominanti». Nei confronti di questi epitopi non si instaura una tolleranza centrale, e pertanto cloni T-cellulari potenzialmente autoreattivi nei loro confronti giungono alla periferia. Per cause varie (aumentata esposizione, modificazione conformazionale, cross-reattività con epitopi esogeni, etc.), uno o più di tali autoepitopi «criptici» potrebbero suscitare una risposta immunitaria la quale potrebbe coinvolgere, nell'ambito intra- e inter-molecolare, altri epitopi che fino a quel momento erano rimasti «criptici», con amplificazione e perpetuazione della reazione autoimmune (fenomeno noto come *epitope spreading*). Un simile meccanismo sembra essere operante nell'encefalite allergica sperimentale e nel diabete dei topi NOD, nonché nel LES umano.

Teoria della selezione clonale

Con riferimento al secondo postulato di Burnet, la «teoria della selezione clonale», è oggi noto che a livello timico, nel corso dell'ontogenesi, più del 90% delle cellule linfoide che stabiliscono legami ad alta affinità con peptidi «self» vengono o inattivate (*anergia clonale*) o fisicamente eliminate («selezione negativa» o «delezione clonale») (fig. 3). Tale eliminazione avviene per un processo noto come «apoptosi (v.**)» o «morte cellulare programmata», finalisticamente rivolto all'omeostasi numerica cellulare. Lo studio di nematodi con specifiche mutazioni geniche ha consentito di stabilire definitivamente che il processo apoptotico è strettamente controllato da una serie di geni regolatori, alcuni ad effetto stimolante, altri ad effetto inibente (nonché da un vasto numero di altri fattori esogeni od endogeni).

Tra i prodotti genici in grado di mediare segnali apoptotici un ruolo rilevante rivestono le molecole *Fas* e *FasL* (ligando). È oggi comunemente ammesso che l'attivazione

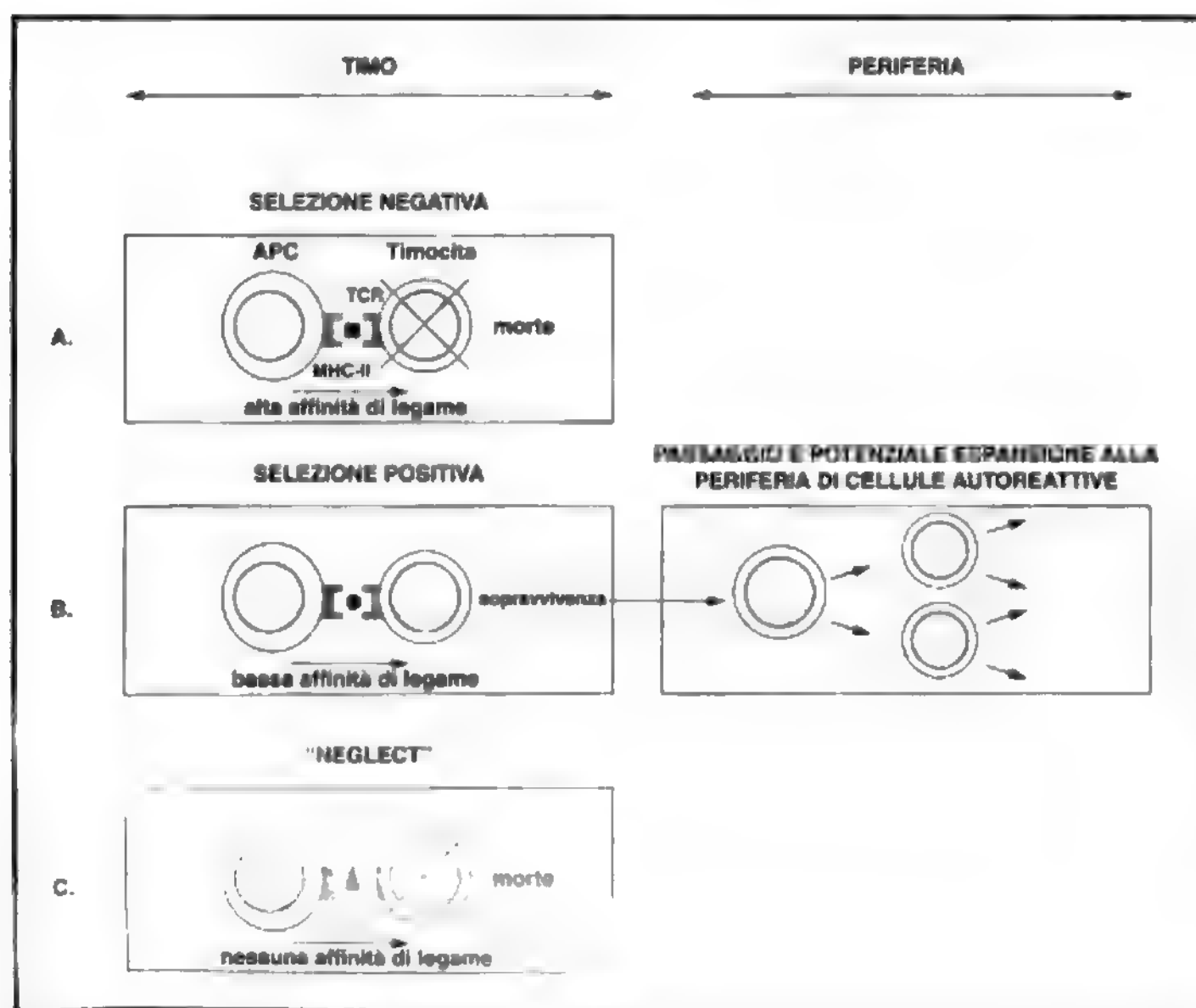


Fig. 3. Rappresentazione schematica dei meccanismi della «tolleranza centrale». A) Timociti specifici per peptidi «self» con elevata affinità per i loro elementi di restrizione (MHC) vengono clonalmente deleti. B) Per contro, timociti specifici per peptidi «self» con bassa affinità per il complesso peptide-MHC possono sfuggire alla tolleranza centrale e popolare la periferia, dove teoricamente possono essere riattivati in conseguenza di vari eventi. C) Le cellule T con nessuna affinità per il peptide «self» legato al MHC vengono «ignorate» («neglected») e vanno incontro a morte per apoptosi.

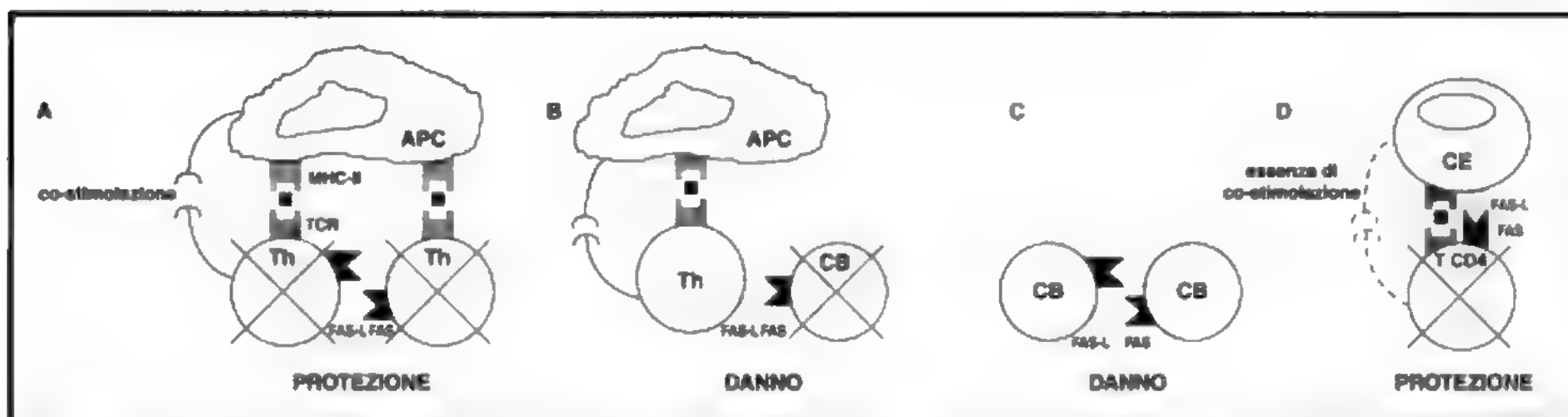


Fig. 4. Possibili ruoli del sistema *Fas-FasL* nell'autoimmunità. A. Apoptosi Th-Th (suicidio o fratricidio di linfociti Th autoreattivi: protezione dall'autoimmunità). B. Apoptosi Th-cellula bersaglio non linfoide (CB) esprimente il *Fas*, danneggiamento. C. Apoptosi CB-CB (suicidio o fratricidio: danneggiamento). D. Apoptosi cellula epiteliale (CE)-Th (morte della cellula Th autoreattiva: protezione).

T-cellulare, quale quella conseguente a stimolazione antigenica, provoca, soprattutto a livello di cellule Th1, una sovraregolazione dei geni che codificano per *Fas* e per *FasL*: l'interazione tra cellule che esprimono *Fas* e quelle che esprimono *FasL* porta a morte cellulare reciproca *Fas*-mediata e, quindi, alla delezione clonale (fig. 4, A).

L'importanza di un efficiente sistema *Fas-FasL* nel controllo dell'autoimmunità è apparsa per la prima volta evidente allorché è stato dimostrato, in topi di ceppo MRL-*lpr/lpr* e MRL-*gld/gld*, che mutazioni puntate (sostituzioni di un singolo aminoacido) dei geni *Fas* e *FasL*, rispettivamente, abolivano il «segnale di morte» cellulare, dando così luogo all'insorgenza di una grave sindrome linfoproliferativa associata alla produzione di autoanticorpi (anticorpi antinucleo, fattori reumatoidi e altri) ed allo sviluppo di una glomerulonefrite.

Il corrispettivo nell'uomo è rappresentato dalla *sindrome di Canale-Smith* (dal nome dei due Autori che per primi l'hanno descritta nel 1967), contrassegnata dall'insorgenza, in bambini, di linfadenopatia, manifestazioni autoimmuni (anemia emolitica, trombocitopenia), aumentato rischio per lo sviluppo di neoplasie maligne. L'essenza di questa sindrome, infatti, è stata identificata in mutazioni del gene *Fas*, con conseguente deficit di morte apoptotica a livello di popolazioni linfocitarie. Una sindrome simile può insorgere, come sottolineato anche da ricercatori italiani (Dianzani *et al.*), non soltanto per mutazioni del *Fas* o del suo ligando, ma anche per alterazioni a livello della sfingomielinasi neutra, enzima che, attivato dal *Fas*, favorisce la produzione di ceramide a partire dalla sfingomielina e la successiva attivazione ceramido-mediata della protein-chinasi che, attraverso differenti tappe biochimiche, conduce alla morte cellulare per apoptosi.

L'apoptosi *Fas*-mediata di cellule T autoreattive rappresenta un importante meccanismo di tolleranza immunitaria non soltanto a livello timico, ma anche a livello extratimico (*tolleranza periferica*). A questo livello le interazioni *Fas-FasL* probabilmente controllano anche la produzione di autoanticorpi dal momento che le cellule B autoreattive attivate dal segnale co-stimolatorio CD40L (fornito dalle cellule T attivate) esprimono larghe quantità di *Fas* e vengono efficacemente eliminate da cellule T esprimenti il *FasL*.

Di recente è stato prospettato un nuovo meccanismo attraverso cui il sistema *Fas-FasL* potrebbe proteggere dallo sviluppo dell'autoimmunità. Tale ipotesi è derivata dalla dimostrazione che le cellule epiteliali tiroidee di pazienti con tiroidite di Hashimoto, oltre alla «aberrante» espressione di molecole HLA di classe II, esprimono anche il *FasL*. Questa

acquisizione, infatti, potrebbe consentire di rivedere sotto nuova luce la teoria sull'autoimmunità originariamente prospettata da Bottazzo *et al.* nel 1983. Secondo tale teoria, come è noto, la «aberrante» espressione di MHC-II sulle cellule epiteliali tiroidee renderebbe le cellule stesse atte a «presentare» antigeni propri e ad attivare cellule T autoreattive, innescando o perpetuando, quindi, il processo flogistico che sta alla base della tireopatia autoimmune.

Il punto cruciale, ancora controverso, è se una cellula epiteliale HLA-DR⁺ sia in grado di apportare contestualmente alla cellula T CD4⁺ anche gli appropriati co-stimoli, correlati a molecole di membrana e a citochine. Infatti, se la presentazione di peptidi autoantigenici avvenisse in assenza di tali segnali co-stimolatori, la cellula T CD4⁺ non soltanto non verrebbe stimolata a proliferare, ma potrebbe anzi diventare «anergica» nei confronti di stimoli successivi apportati in maniera corretta da APC «professionali» (cfr. fig. 2). Se, poi, le cellule epiteliali tiroidee dei soggetti con tiroidite autoimmune esprimessero anche il *FasL*, allora l'interazione di questa molecola col *Fas* esposto dalle cellule Th stimulate dal peptide antigenico in assenza del segnale co-stimolatorio potrebbe indurre la morte per apoptosi dei cloni di cellule T autoreattive (come schematicamente rappresentato nella fig. 4, D). L'ectopica espressione di molecole MHC-II e la sovraespressione di *FasL* su cellule epiteliali (o, comunque, su qualsiasi tipo di cellula che presenti l'antigene in modo non professionistico), lungi dal costituire un evento dannoso, potrebbe quindi rappresentare un fenomeno protettivo nei confronti dell'autoimmunità. È ovvio che, oltre alle tireopatie, la teoria suddetta potrebbe essere estesa ad altre m. a. d'organo. Il continuo controllo esercitato dal sistema *Fas-FasL* potrebbe anche render conto dei motivi per cui un processo autoimmune può decorrere per anni o per decenni in modo subclinico. Infine, occorre ricordare che l'attivazione dei geni *Fas* e *FasL* può, con i meccanismi indicati nella fig. 4, B, C, contribuire al danneggiamento: di qui l'incertezza che tuttora sussiste, se cioè nelle m. a. l'apoptosi *Fas*-mediata sia in eccesso o in difetto. Ad esempio, nel LES la formazione di autoanticorpi verso autoantigeni non immunogeni o dotati di debole potere immunogeno, come il DNA, potrebbe essere correlata all'eccessiva liberazione di nucleosomi (unità fondamentali ripetitive della cromatina) che vengono generati durante l'apoptosi per un fenomeno di clivaggio internucleosomale della cromatina.

Citochine e malattie autoimmuni

Comunque indotta, l'espansione continuativa di cellule T autoreattive rappresenta l'evento cruciale che trasforma

una risposta autoimmune transitoria e spesso fisiologica in una m. a. con i ben noti caratteri di progressione e di automantenimento.

L'analisi fenotipica e funzionale dei linfociti autoreattivi — ed in particolare la determinazione delle citochine da essi prodotte — ha consentito di dimostrare che nelle m. a. organo-specifiche le cellule T CD4⁺ infiltranti gli organi bersaglio sono in larghissima prevalenza polarizzate in senso Th1 (v. la voce ALLERGIA**). Ciò verosimilmente dipende da una serie di circostanze che portano le APC e le cellule B a secernere IL-12, citochina che ha un ruolo cruciale nel promuovere l'iniziale differenziazione di cellule Th0 verso cellule Th1. Una volta avviata, l'espansione di tali cloni prosegue, anche in assenza di altri segnali, per un processo di stimolazione autocrina. I dati clinici e sperimentali (desunti, questi ultimi, anche da studi sia di animali transgenici che di animali «knockout») pressoché concordemente indicano che le citochine di tipo 1 (IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-2) rivestono un ruolo importante nella patogenesi di malattie autoimmuni organo-specifiche, in particolare del diabete giovanile insulino-dipendente, della tiroidite di Hashimoto, dell'oftalmopatia associata al morbo di Basedow e della sclerosi multipla (fig. 5). Le vie attraverso cui le citochine di tipo 1 condizionano lo sviluppo di lesioni d'organo sono molteplici, ed includono: effetto pro-infiammatorio; aberrante espressione di molecole MHC di classe II e

iperespressione di molecole MHC di classe I; attivazione macrofagica (ipersensibilità ritardata); concorso nell'attivazione di cellule T CD8⁺ citolitiche autoreattive; cooperazione per la attivazione e differenziazione verso le plasmacellule di cellule B autoreattive; produzione di IL-6 e/o di IL-1 da parte della cellula bersaglio, con amplificazione delle risposte autoimmuni ed effetti tossici sulla cellula bersaglio stessa, etc.

Nelle m. a. sistemiche l'assetto citochinico è meno polarizzato in un senso o nell'altro. Nell'artrite reumatoide, tuttavia, un importante ruolo patogenetico sicuramente rivestono le citochine prodotte da macrofagi attivati: IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8. Queste citochine esplicano potenti effetti pro-infiammatori (soprattutto il TNF- α , implicato anche nel morbo di Crohn), e sono responsabili — o almeno corresponsabili — dell'attivazione dei sinoviociti, della chemiotassi e dell'attivazione dei neutrofili, della neoangiogenesi e di altri fondamentali processi dai quali, in ultima analisi, dipendono le alterazioni anatomo-istologiche caratteristiche della malattia.

Nel lupus eritematoso sistemico ed in altre connettiviti (ad es., sindrome di Sjögren o vasculiti sistemiche) sembrerebbero prevalere citochine di tipo 2, ma i dati al riguardo sono contrastanti: in un modello sperimentale di LES murino, ad es., le citochine Th1 svolgono un ruolo predomi-

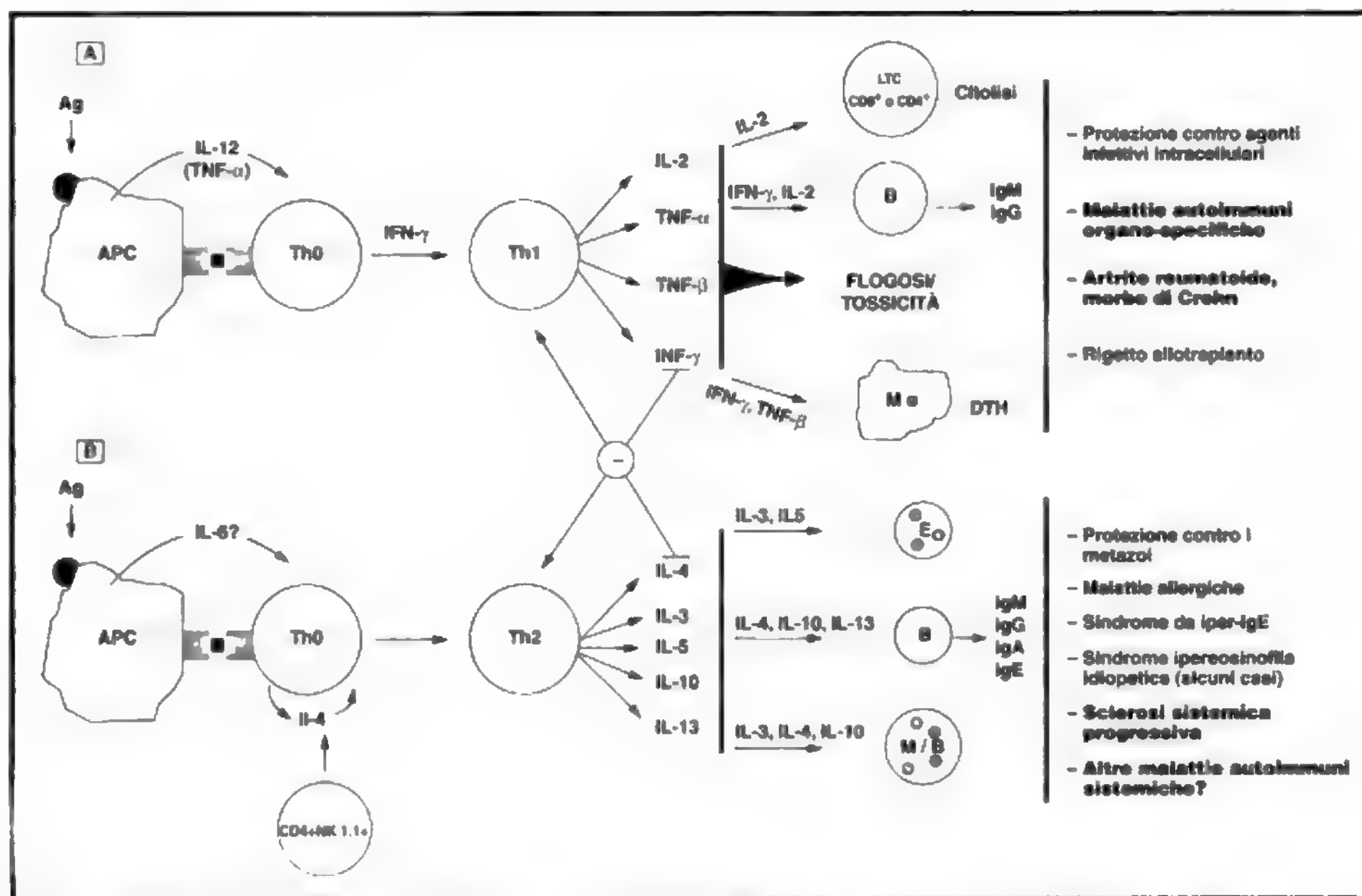


Fig. 5 Rappresentazione schematica della differenziazione delle cellule Th in due sottotipi principali. In presenza di IL-12 (e probabilmente di TNF- α) la cellula Th0 viene indotta a differenziarsi verso una cellula Th1 e questo processo viene amplificato dall'IFN- γ (A). Per contro in presenza di IL-6? si ha la differenziazione di un sottotipo di cellule Th0 «programmate» per questa citochina e probabilmente da cellule T CD4⁺ NK1.1⁺ si ha una differenziazione verso una cellula Th2 (B). Le citochine di tipo 1 stimolano l'espansione, anche in maniera autocrina, delle cellule Th1 ma contribuiscono l'estinzione delle cellule Th2, e viceversa. LTC = Linfociti T citolitici; B = Linfociti B; Mφ = Macrofagi; Eo = Eosinofili; M/B = Mastociti/Basofili.

nante nelle fasi iniziali della malattia, mentre nelle fasi più tardive sembra prevalere l'effetto delle citochine Th2.

Nella *sclerosi sistemica progressiva* (v. SCLERODERMIA) il dato più rilevante, riferito all'immunodisregolazione, sembra essere rappresentato dalla insufficiente concentrazione, nel microambiente, di IFN- γ , potente inibitore della neosintesi di collagene. Le citochine di tipo 2 sembrerebbero quindi assumere un ruolo patogenetico preminente attraverso complessi meccanismi che comprendono l'attivazione a cascata di vari tipi cellulari (cellule epiteliali, piastrine, fibroblasti perivascolari, macrofagi, linfociti) con liberazione massiva delle loro citochine. L'azione combinata di queste molteplici citochine porta, in ultima analisi, ad intensa proliferazione dei fibroblasti ed alla conseguente neosintesi di diversi tipi di collagene, di fibronectina e di proteoglicani responsabili della progressiva fibrosi a livello sia cutaneo che degli interstizi polmonari.

L'esatto ruolo delle citochine (v.**) — nonché delle chemochine — nella patogenesi delle m. a. dell'uomo deve essere ancora ulteriormente precisato. Tuttavia, le acquisizioni cui abbiamo fatto riferimento hanno già aperto la strada ad un settore del tutto nuovo nella terapia delle m. a., cioè a quello della terapia citochino-mirata e della «immunodeviiazione», come verrà di seguito illustrato.

Infezioni e malattie autoimmuni

L'ipotesi di una etiologia infettiva delle m. a. ricorre ciclicamente da oltre 30 anni. A rinnovare l'interesse sull'argomento sono stati stavolta soprattutto i risultati delle ricerche sperimentali pubblicati a partire dal 1991, condotte da due gruppi di ricercatori: a Zurigo dal gruppo di Rolf M. Zinkernagel (premio Nobel 1996 per la Medicina) e a La Jolla (California) dal gruppo di Michael B. A. Oldstone.

In questi esperimenti, cellule β -insulari pancreatiche di topo sono state indotte ad esprimere sulla loro superficie la glicoproteina del virus della coriomeningite linfocitaria (VCML) mediante inserzione di un gene estraneo che codifica per tale glicoproteina. Questi animali transgenici rimangono assolutamente esenti da diabete a meno che non vengano infettati col VCML: in tal caso, praticamente tutte le cellule β -insulari vengono distrutte nell'arco di due settimane e gli animali diventano diabetici. L'ipotesi scaturita da questi risultati è che la tolleranza (meglio, la «insensibilità») periferica nei confronti di autoantigeni d'organo che non vengono espressi a livello timico (v. col. **3501) venga rotta o perché la concentrazione e il tempo d'azione dell'autoantigene superano una soglia critica ovvero, più probabilmente, perché cloni T-linfocitari autoreattivi vengono attivati da un antigene esogeno cross-reattivo con quello endogeno.

In effetti, sempre più numerose diventano le segnalazioni relative a omologie strutturali e a cross-reattività immunologiche tra proteine virali e proteine dell'ospite: p24gag dell'HIV e proteina Sm, principale bersaglio autoantigenico nel LES; proteina basica maggiore della mielina (MBP) e DNA-polimerasi del virus dell'epatite B (HBV); recettore umano per il TSH (hTSH-R) e proteina Nef di HIV; proteine da shock calorico o da stress (HSP, proteine fisiologicamente conservate sin dai procarioti, che vengono sintetizzate da cellule sottoposte ad eventi stressanti) e proteine batteriche (in particolare, micobatteriche); proteine virali o batteriche e sequenze HLA di classe I o II, a loro volta cross-reattive con autoantigeni d'organo (ad es., cross-reattività tra HLA-DR e piruvato deidrogenasi, recettore dell'insulina, GAD, etc.) e altre.

Molti agenti infettanti riconoscono come porta di ingresso cellulare un costituente «self» di tipo recettoriale: EBV sfrutta il C3d-R, i rhinovirus la molecola ICAM-1, HIV, tramite la gp120, la molecola CD4, etc. Durante la fase

di internalizzazione del virus può verificarsi anche una inusuale internalizzazione del suo recettore, il quale può così diventare esso stesso oggetto di processazione. In effetti, nei soggetti sieropositivi per HIV sono dimostrabili linfociti T CD4⁺ autoreattivi, che specificamente riconoscono due peptidi del CD4 e che proliferano in presenza di CD4. È quindi probabile che il legame della gp120 virale al CD4, specialmente in presenza di anticorpi anti-gp120, induca una massiva internalizzazione del recettore, con svelamento di autoepitopi criptici e induzione di risposte autoimmunitarie anti-CD4, risposte che, unitamente all'effetto citopatico del virus, concorrerebbero alla deplezione delle cellule T CD4-positive. È stato anche dimostrato (Barnaba, 1996) che l'infezione da HIV è capace di indurre un aumento della sintesi di alcune proteine cellulari, come la vinculina, proteina del citoscheletro: la concentrazione endocellulare di questa proteina potrebbe così superare la dose soglia al di sopra della quale viene attivato il meccanismo di processazione proteica, con conseguente formazione ed espressione alla superficie di peptidi potenzialmente in grado di mediare una risposta autoimmune.

Altre probabili modalità di autoimmunizzazione microrganismo-indotta sono state da noi discusse in altra sede (Masala *et al.*, 1991) e sono elencate nella tab. VI.

La tab. VII riporta una lista (incompleta) di m. a. dell'uomo per le quali esistono elementi diretti (identificazione nelle sedi di lesione di virus o di genomi virali) o indiretti («tracce» del pregresso passaggio del virus) che inducono a sospettare una probabile etiologia virale. I dubbi al riguardo derivano dal fatto che particelle «virali» assai spesso sono risultate essere soltanto «simil-virali»; dalle insidie insite nelle metodiche impiegate per svelare genomi «virali» (ibridizzazione *in situ*, PCR, etc.); infine dalla ignoranza che tuttora sussiste sulla reale sequenza di eventi, se cioè l'eventuale infezione virale rappresenti la causa o la conseguenza dell'immunodisregolazione primaria o secondaria (iatrogena) delle m. a.

TAB. VI. PRINCIPALI MECCANISMI DI AUTOIMMUNIZZAZIONE INDOTTA DA VIRUS O DA ALTRI AGENTI PATOGENI

1. Effetto citopatico diretto
2. Modificazioni di autoantigeni dell'ospite
 - Modificazioni qualitative o quantitative di autoantigeni di membrana
 - Dislocazione sulla membrana di autoantigeni «sequestrati» in compartimenti intracellulari
 - Esposizione di autoantigeni anatomicamente sequestrati
 - Esposizione di epitopi «criptici» a livello molecolare
3. Mimetismo molecolare
4. Alterazione del network idiotipico
5. Inibizione dell'apoptosi
 - Mutazione del gene *Fas*
 - Attivazione del gene *bcl-2*
6. Transattivazione di geni cellulari
 - Oncogeni
 - Geni delle citochine
7. Attivazione policlonale
 - delle cellule B
 - delle cellule T (effetto di superantigeni)
8. Differenziazione di cellule Th verso cloni patogeni Th1 (prodotti batterici o virali attivanti la produzione di IL-12 da parte di cellule monocitarie-macrofagiche)

MALATTIE AUTOIMMUNI

TAB. VII. PRINCIPALI MALATTIE AUTOIMMUNI DELL'UOMO NELLA CUI ETIOPATOGENESI SI SOSPETTA L'INTERVENTO DI VIRUS

Malattia	Virus
Morbo di Basedow	Retrovirus
Diabete di tipo I	Coxsackie virus, varicella, CMV, HSV, rosolia congenita, parotite
Miocardite, cardiomiopatia dilatativa	Coxsackie virus B
Crioglobulinemia	HCV
Epatite autoimmune	Virus epatitici
Sindrome di Sjögren	EBV, HSV, HHV-6, HCV, retrovirus
Artrite reumatoide	Retrovirus, EBV
Lupus eritematoso sistemico	Retrovirus, EBV
Sclerosi multipla	Retrovirus, HSV
Sindrome di Guillain-Barré	CMV, EBV, HSV
Trombocitopenia, anemia emolitica autoimmune, anemia aplastica	EBV, virus della coriomeningite linfocitaria

Terapia delle malattie autoimmuni

La terapia delle m. a., soprattutto di quelle sistemiche, è ancora oggi largamente basata sull'impiego di farmaci capaci: a) di indurre una immunodepressione non selettiva (citostatici/immunosoppressori quali, soprattutto, ciclofosfamide, azatioprina, metotressato, ciclosporina A, FK-506 o Tacrolimus) e, b), di antagonizzare gli effetti della immuno-

flogosi (corticosteroidi, FANS, sali d'oro, D-penicillamina, antimalarici, salazopirina, dapsone e altri).

La miglior conoscenza delle basi cellulari e molecolari della risposta autoimmune, tuttavia, ha aperto vie terapeutiche del tutto nuove. Alcune delle nuove procedure hanno superato il vaglio sperimentale e sono giunte all'applicazione in patologia umana.

Nell'ambito delle molteplici strategie riassunte nella tab. VIII e nella fig. 6, alcune meritano qualche cenno di commento.

Ablazione di cellule staminali emopoietiche

Recenti ricerche condotte su modelli animali «spontanei» o sperimentalmente indotti hanno fornito convincente dimostrazione che alcune m. a., e soprattutto quelle sistemiche, traggono origine da difetti a livello delle cellule staminali emopoietiche (CSE). Di qui l'idea di correggere tali difetti mediante trapianto di midollo osseo (TMO). Dopo alcuni risultati «incoraggianti» o del tutto favorevoli ottenuti in patologia animale, il TMO è stato impiegato anche nell'uomo, soprattutto in quei pazienti affetti da malattie autoimmuni associate a processi morbosi (anemia aplastica [v.**], sindromi leucemiche e pre-leucemiche, immunodeficienze combinate severe [v. MIDOLLO OSSEO**, trapianto]) in cui il TMO trova una ben precisa indicazione. Ad oggi, la lista delle m. a. associate ai disordini suddetti, per le quali è stato effettuato il TMO, è relativamente estesa e comprende: artrite reumatoide, LES, sclerodermia, vasculiti, miastenia grave, tireopatie autoimmuni (tiroiditi e morbo di Basedow), diabete autoimmune, sclerosi multipla, retocolite ulcerosa, psoriasi. Ovviamente il numero globale di casi trattati è piuttosto esiguo, e molte delle segnalazioni in letteratura si riferiscono a singoli pazienti.

Le casistiche maggiori riguardano quei pazienti (in totale, 20-30) con artrite reumatoide che, per una associata

TAB. VIII. «NUOVE» STRATEGIE TERAPEUTICHE NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

1. Ablazione di cellule staminali emopoietiche «patogene»

- Auto- o allotrapianto di midollo osseo o di cellule staminali emopoietiche

2. Induzione di una tolleranza immunitaria specifica

- Peptidi modificati, antagonisti degli epitopi immunodominanti
- «Vaccinazione» con linee attenuate di cellule T autoreattive
- «Vaccinazione» con peptidi del TCR specifico espresso dai cloni di cellule T autoreattive o con DNA derivato dal gene che codifica per una regione immunologicamente importante del TCR
- Somministrazione per via orale di autoantigeni («tolleranza orale»)

3. Immunosoppressione aspecifica con agenti biologici

A. Indirizzata alle APC (in particolare alle molecole MHC)

- Anticorpi anti-HLA-DR di derivazione placentare
- Anticorpi monoclonali (MAbs)* rivolti verso antigeni HLA-DR (ad es., anti-DR4)
- «Vaccinazione» con cellule mononucleate allogeniche
- «Vaccinazione» con peptidi di molecole HLA (es., con peptidi dell'HLA-DR1 e/o DR4)

B. Indirizzata alle cellule T

- MAbs rivolti verso marcatori di superficie: anti-CD3, CD4, CD5, CD7, CD52
- MAbs rivolti verso marcatori di attivazione: anti-IL2R, anti-DR*
- MAbs rivolti verso molecole co-stimolatorie: anti-CD40L, anti-CTLA-4

C. Indirizzata alle cellule B

- MAbs rivolti verso recettori immunoglobulinici
- Soppressione idiopica

4. Terapia citochinomodulata

- Blocco della produzione e degli effetti di citochine (CK) pro-infiammatorie (es., IL-1, TNF, IFN- γ , etc.): MAbs anti-CK o anti-CKR (recettori); recettori solubili di CK, altri agenti biologici o chimici
- Immunodeviiazione con Th₁ $\rightarrow$ Th₂ mediante somministrazione di citochine di tipo 2 per bloccare l'espansione di cellule Th1 e viceversa

* Gli anticorpi monoclonali possono essere impiegati in forma anti-idiotipica o associati con tossine (immunotossine).

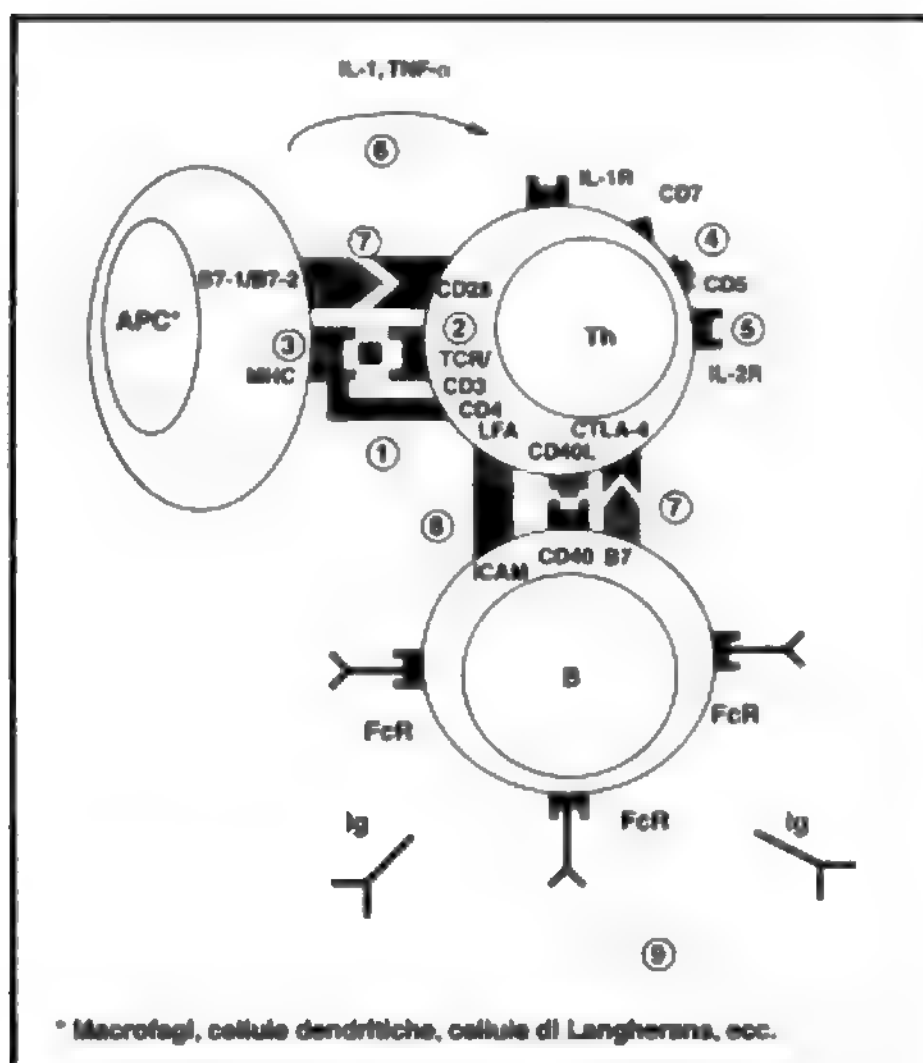


Fig. 6. Principali punti di attacco degli agenti biologici impiegati a scopo terapeutico.

1. Anticorpi anti-CD4
 - anticorpi monoclonali murini
 - anticorpi monoclonali chimerici
 - anticorpi monoclonali umanizzati
2. Inibizione del TCR/CD3
 - peptidi ricombinanti
 - cellule T autologhe attenuate
 - anticorpi anti-CD3
3. Blocco del MHC
 - anticorpi placentari anti-HLA DR
 - anticorpi monoclonali murini anti-idiotipo
 - cellule mononucleate allogeniche
 - peptidi DR4/DR1
4. Anticorpi anti-CD5 e CD7
5. Inibizione del recettore dell'IL-2 (CD25)
 - anticorpi anti-IL-2R
 - IL-2 coniugata con tossina difterica o di *Pseudomonas*
 - IL-2 coniugata con Bi²¹²
6. Inibizione delle citochine infiammatorie
 - antagonista dell'IL-1R
 - recettore solubile dell'IL-1
 - recettore solubile del TNF-α
 - anticorpi monoclonali anti-TNF-α
 - recettore solubile del TNF fuso alla porzione Fc di una IgG1
 - IL-4
 - IL-10
7. Inibizione delle molecole co-stimolatorie
 - anticorpi anti-CTLA-4 coniugati con Ig (MuCTLA-4Ig)
 - anticorpi anti-CD40L
8. Inibizione delle molecole di adesione
 - anticorpi monoclonali murini anti-ICAM-1
 - anticorpi monoclonali anti-VLA4
 - anticorpi anti-LFA-1
9. Inibizione idiopatica
 - Ig vena ad alti dosaggi
 - anticorpi specifici per idiotipi patogeneticamente rilevanti.

anemia aplastica severa o una mielodisplasia, sono stati sottoposti a TMO allogenico. Globalmente considerati i risultati possono essere ritenuti soddisfacenti se intesi nel senso di remissione della m. a. Tuttavia, in oltre un terzo dei casi si è verificato il decesso per motivi correlati al trapianto e in alcuni soggetti si è verificata la recidiva della malattia.

TAB. IX. POSSIBILI INDICAZIONI AL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO O DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

1. Malattie autoimmuni organo- e non-organo-specifiche, purché associate ad altre affezioni che, di per sé, giustifichino il trapianto.
2. Forme severe di vasculiti e/o di connettiviti sistemiche resistenti ad altri presidi terapeutici.
3. Citopenie autoimmuni gravi, resistenti al trattamento e insensibili alla splenectomia.
4. Casi selezionati di sclerosi multipla.

Nei restanti casi la remissione sembra essere duratura, ma il periodo di *follow-up* (in genere inferiore ai 7 anni) è ancora troppo breve per poter consentire di pervenire a conclusioni definitive.

Data la forte componente genetica delle m. a., è ovvio che la strategia terapeutica più razionale è quella che prevede il TMO allogenico. I rischi ad esso correlati, tuttavia, hanno indotto anche a tentativi di trapianto di midollo autologo o di cellule staminali autologhe. Cinque pazienti con malattie autoimmuni (associate in 3 casi a linfoma non-Hodgkin e in 1 caso a carcinoma ovarico) hanno ricevuto tale trattamento con risultati assolutamente deludenti: in tutti i pazienti, infatti, i segni clinici e sierologici delle malattie autoimmuni o sono rimasti invariati o sono ricomparsi a breve distanza dal trapianto.

Queste osservazioni dovrebbero indurre a considerare con cautela la via del trapianto allogenico (per i rischi ad esso correlati) e del trapianto singenico (per l'apparente inefficacia e per i rischi connessi al trattamento preparatorio al trapianto), procedure che, in ogni caso, dovrebbero essere prospettate soltanto per pazienti rigorosamente selezionati (tab. IX).

Tolleranza immunitaria nei confronti dell'autoantigene in causa

Vari approcci sperimentali sono stati utilizzati nell'intento di rendere tolleranti le cellule T e/o B autoreattive, comprendenti: impiego di analoghi «tollerogenici» (denominati anche *Altered Peptide Ligands* o APL) di peptidi «self» immunogenici, capaci di competere con questi ultimi nell'occupare la tasca del MHC, ma incapaci di attivare le cellule Th (o, alternativamente, di indurre la differenziazione di queste verso sottotipi non patogeneticamente rilevanti) in virtù della loro scarsa affinità per il TCR; «vaccinazioni» contro le cellule T autoreattive o contro il loro recettore per l'antigene; tollerizzazione di cloni T autoreattivi mediante esposizione a cellule presentanti l'antigene non in grado di apportare gli adeguati segnali co-stimolatori (cfr. fig. 2). Nessuna di queste procedure sembra di prossima attuazione in patologia umana, ove si eccettuino i tentativi di bloccare, nei pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente, il legame dell'autoantigene al MHC mediante l'impiego di un copolimero della proteina basica della mielina, denominato COP1.

Grande enfasi è stata per contro rivolta negli ultimi anni alla cosiddetta «tolleranza orale», cioè alla possibilità di indurre una tolleranza immunologica mediante somministrazione per via orale dell'autoantigene in causa. Tale procedura si basa sul presupposto che il sistema immunitario associato all'apparato gastrointestinale (GALT) risponda alla stimolazione antigenica locale secondo le modalità indicate nella fig. 7, entrambe atte ad indurre uno stato di tolleranza.

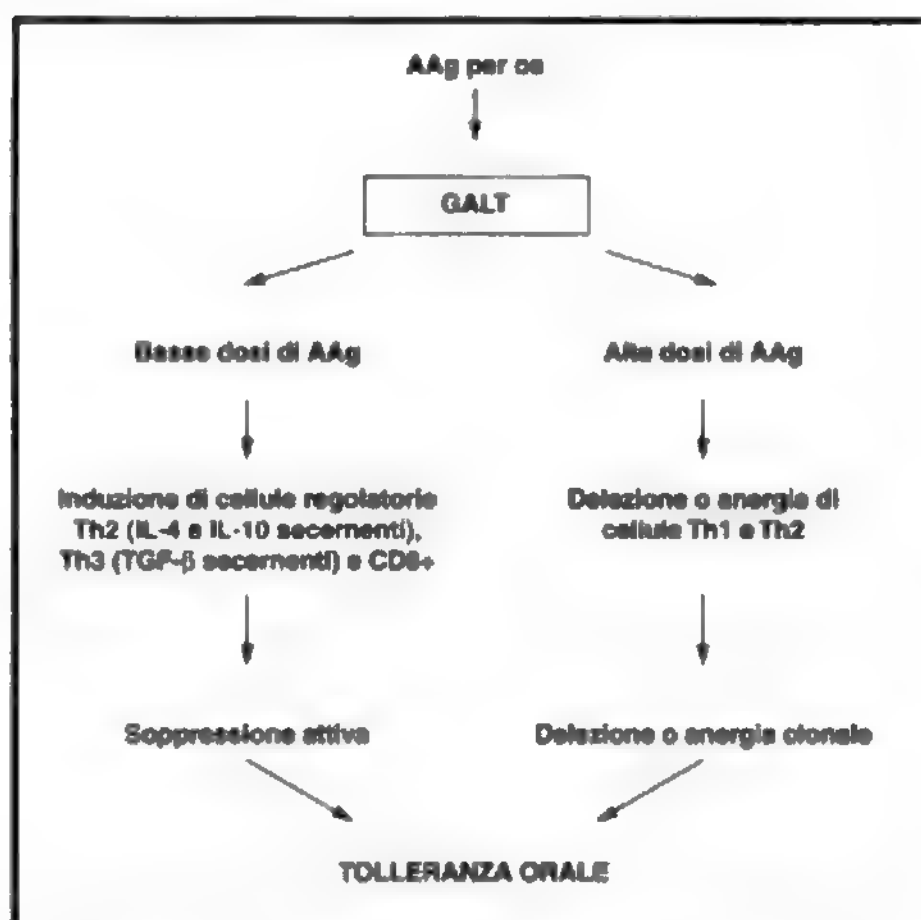


Fig. 7. Possibili meccanismi attraverso cui la assunzione per via orale di autoantigeni (AAg) indurrebbe tolleranza. GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissue. (Da Weiner H. L., *Immunology Today*, 1997, 18, 335, modificata).

Poiché vari studi sembravano attestare l'efficacia della somministrazione orale di antigene in modelli animali di m. a., tale procedura è stata trasferita all'uomo. In patologia umana la terapia orale è stata sin qui attuata: a) nell'*artrite reumatoide* (somministrazione per os di collagene tipo II bovino, aviario o di altra specie); b) in pazienti con *uveite* (somministrazione per os di antigene S bovino o di una miscela di antigeni retinici); c) in soggetti con *sclerosi multipla* (somministrazione per os di mielina bovina); d) nel *diabete giovanile insulino-dipendente* di recente insorgenza (somministrazione per os di insulina umana ricombinante). I risultati dei trial in doppio cieco (la maggior parte dei quali ancora in fase I/II) sembrano, nel complesso, deludenti non essendo state rilevate significative differenze cliniche tra i soggetti che hanno assunto l'autoantigene per os e quelli che hanno ricevuto il placebo.

A nostro avviso pertanto, la possibile utilità della «tolleranza orale» per il trattamento delle m. a. non va sopravvalutata. La recente osservazione che in modelli animali l'ingestione orale di un autoantigene può provocare l'attivazione di cellule T-citolitiche autoaggressive con conseguente insorgenza o riacutizzazione della corrispondente m. a., deve, al contrario, indurre ad una certa prudenza nell'applicazione di questa procedura alle malattie dell'uomo, anche se i dati sin qui disponibili depongono per l'assenza di effetti collaterali rilevanti.

Immunosoppressione aspecifica con agenti biologici

I trattamenti biologici delle m. a. si avvalgono dell'impiego di molecole (includenti anche derivati e forme ricombinanti) prodotte da cellule del sistema immunitario o da cellule che comunque partecipano al processo immunoflogistico. Ad oggi, la lista degli agenti biologici è piuttosto lunga (cfr. tab. VIII e fig. 6). Molti degli agenti biologici indicati nella figura sono stati impiegati in patologia umana. Il maggior numero di trials è stato condotto in pazienti con

artrite reumatoide «intrattabile» (resistente ai trattamenti convenzionali), meno frequentemente in pazienti con altre connettiviti o con vasculiti sistemiche. Quali agenti biologici sono stati impiegati anticorpi monoclonali (murini, chimerici o umanizzati, da soli o coniugati con tossine, come la ricina) rivolti verso marcatori di membrana delle cellule T totali (CD3) o del subset cellulare T CD4-positivo (molecole CD4, CD5, CD7, CD52); verso molecole co-stimolatorie (CD40L); verso marcatori di attivazione delle cellule Th (IL-2R, HLA-II). Altri approcci di terapia biologica sono quelli effettuati mediante vaccinazione con cellule T autologhe autoreattive «attenuate» o con peptidi associati al TCR.

Allo stato attuale, ciò che si può affermare è che: a) i risultati sono ancora incompleti; b) i benefici clinici non appaiono, nel complesso, significativi e, allorché presenti, hanno carattere di transitorietà; c) ad una deplezione linfocitaria, anche marcata, spesso non fa riscontro alcun miglioramento clinico; d) gli effetti indesiderati (invero registrati in un numero limitato di casi e includenti infezioni opportunistiche, insorgenza di linfomi e sviluppo di anticorpi rivolti verso l'agente biologico impiegato) non mancano; e) i potenziali effetti collaterali tardivi correlati a trattamenti protratti sono ancora sconosciuti. Ovviamente, la ricerca in questo settore è ancora agli inizi e già nuove formule sono allo studio, ad es. con l'utilizzo di «cocktails» di agenti biologici o con il razionale uso sequenziale di più agenti biologici. Rimane pur sempre da dimostrare, tuttavia, che questi agenti biologici siano più efficaci e meno tossici degli agenti farmacologici correntemente impiegati.

Terapia citochino-mirata

Rappresenta, sicuramente il settore di ricerca più studiato ed in fase di rapida espansione. Gli scopi fondamentali che un trattamento citochino-mirato si propone sono due: a) bloccare la sintesi e gli effetti di citochine pro-infiammatorie; b) indurre, mediante modificazione di determinati equilibri citochinici, un viraggio (*shift*) di cloni T cellulari patogeneticamente rilevanti verso cloni T cellulari «indifferenti» o addirittura protettivi («immunodeviante»).

Il primo scopo può essere conseguito mediante l'impiego di: a) anticorpi monoclonali rivolti verso le citochine in causa; b) antagonisti del recettore di una definita interleuchina — ad es., IL-1 — che inibiscono il legame della stessa al suo recettore; c) recettori solubili per definite citochine (es., IL-1, TNF) che legano le citochine stesse prima che queste giungano a combinarsi col loro recettore cellulare; d) citochine che controbilanciano la produzione delle citochine patogene (fig. 8).

Nuovamente l'*artrite reumatoide* rappresenta la condizione morbosa nella quale la terapia anti-citochinica è stata meglio studiata, in relazione al fatto che in questa malattia le citochine pro-infiammatorie rivestono un ruolo rilevante nel determinismo della flogosi articolare.

Particolare importanza, al riguardo, riveste il TNF- α (membro della famiglia del TNF, composta anche da TNF- β e LT- β). La fonte principale, anche se non esclusiva, del TNF è rappresentata dalle cellule monocitarie-macrofagiche attivate. Una volta secreto il TNF si lega a recettori cellulari specifici (TNFR-I e TNFR-II) presenti su differenti tipi cellulari (cellule T e B; cellule endoteliali, cerebrali, epatiche; miociti, fibroblasti, osteoclasti, etc.) ed esplica così le sue molteplici attività biologiche: a livello di linfociti B e T, stimolo alla produzione, rispettivamente, di anticorpi e di citochine; a livello di cellule endoteliali, produzione di citochine, espressione di molecole di adesione, rilascio di fattori pro-coagulanti, induzione di iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*); a livello epatocitario, rilascio di proteine

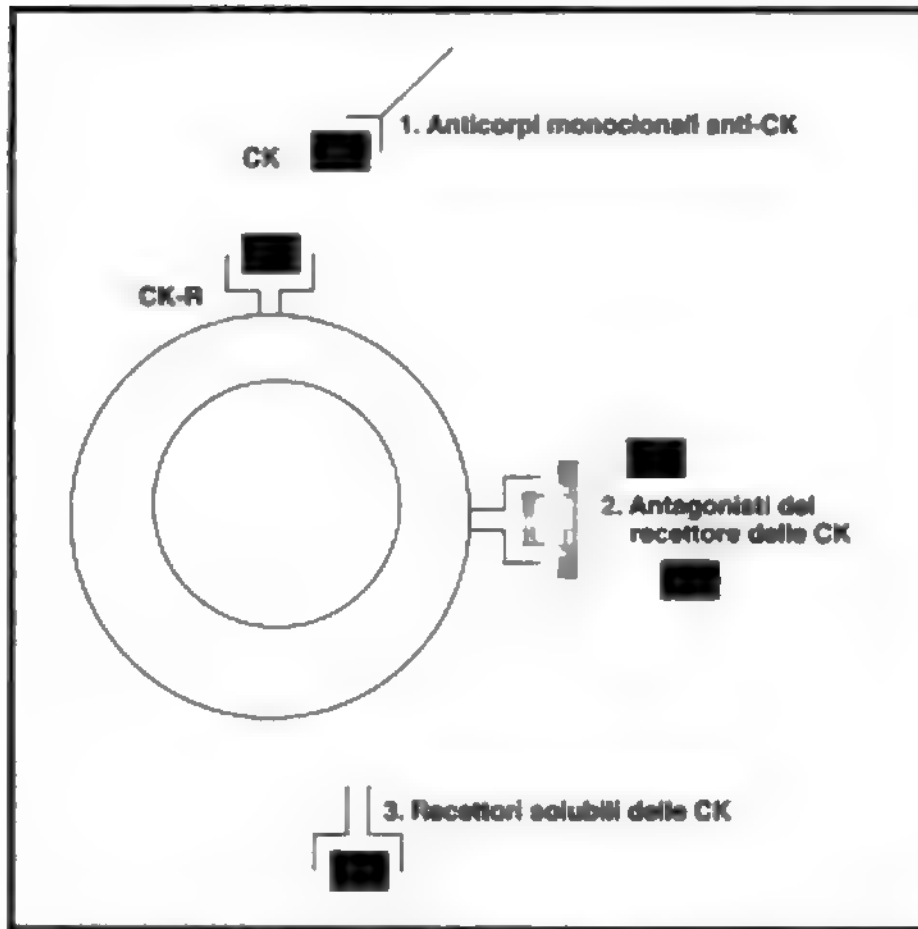


Fig. 8. Possibili modalità di neutralizzazione di citochine mediante l'uso di agenti biologici. CK = Citochine; CK-R = Recettori per le citochine.

(V. testo per ulteriore spiegazione).

della fase acuta; a livello cerebrale, febbre, sonno; a livello di adipociti, soppressione della lipoprotein-lipasi (concorso alla cachessia); a livello di fibroblasti, produzione di IFN- β e di collagenasi; a livello di osteoclasti, stimolazione dell'attività specifica, con conseguente riassorbimento osseo; a livello di miociti, proteolisi, etc.

In virtù di queste molteplici attività il TNF sicuramente partecipa, talvolta da protagonista principale, alla patogenesi non soltanto dell'artrite reumatoide, ma anche di altri disordini immunologici (morbo di Crohn, sclerosi multipla, sindrome di Kawasaki, *Graft-versus-Host-Disease*, rigetto dei trapianti), nonché di patologie infettive (sindrome settica, meningite batterica, malaria cerebrale, AIDS) e di altre affezioni (ARDS, forse infarto del miocardio e insufficienza cardiaca congestizia, etc.).

Vari agenti farmacologici (comprendenti corticosteroidi, ciclosporina A, pentossifillina, clorpromazina, talidomide e altri) sono in grado di neutralizzare, almeno in parte, la sintesi di TNF. I risultati più significativi, tuttavia, vengono attualmente registrati con l'impiego di agenti biologici, in particolare con anticorpi monoclonali anti-TNF e con recettori solubili del TNF.

In uno studio in doppio cieco condotto in Gran Bretagna (Elliot *et al.*, 1994), pazienti con artrite reumatoide «intrattabile» sono stati trattati con una singola infusione endovenosa di anticorpi monoclonali chimerici (uomo-topo) anti-TNF in basse dosi (1 mg Kg⁻¹) o in alte dosi (10 mg Kg⁻¹). Undici dei 25 pazienti del primo gruppo e 19 dei 24 pazienti del secondo gruppo hanno tratto significativi benefici clinici, che, per contro sono stati registrati soltanto in 2 dei 24 pazienti trattati con placebo.

Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti con l'impiego di un antagonista del TNF, rappresentato dal recettore umano solubile ricombinante del TNF (hTNFR), legato al frammento Fc delle IgG₁ umane (proteina di fusione hTNFR-Fc), nonché con agenti biologici volti a neutralizzare la

IL-1 (antagonisti del recettore per IL-1, recettori solubili di tipo I o di tipo II della IL-1, inibitori dell'enzima convertitore dell'IL-1).

Nonostante questi dati appaiano clamorosi (ancor più se si tiene conto che i pazienti trattati erano stati selezionati sulla base della loro resistenza ai corticosteroidi e agli altri trattamenti convenzionali), l'entusiasmo da essi suscitato è, a nostro avviso, mitigato dalle seguenti osservazioni:

1) I benefici indotti dal trattamento anti-citochinico sono del tutto transitori, le manifestazioni cliniche ripresentandosi a distanza di poche settimane o, al più, di pochi mesi dalla sospensione del trattamento.

2) Poiché il TNF- α — e, in generale, tutte le citochine — vengono secrete per rispondere a definite funzioni biologiche, il blocco persistente di una definita citochina potrebbe portare a gravi conseguenze. Ad es., animali «knockout» per il recettore del TNF diventano resistenti all'induzione dello shock settico ma decedono per infezioni da *Listeria monocytogenes*, ad indicare che il sistema TNF/TNF-R svolge un ruolo importante nella difesa contro agenti infettanti.

3) In effetti è oggi ampiamente documentato che ciascuna citochina può esplicare sia effetti benefici che effetti nocivi, l'indirizzo preminente dipendendo da molteplici fattori tra cui: a) il sistema nel quale la citochina agisce; b) il momento («timing») nel quale interviene; c) la concentrazione relativa nell'ambiente in cui il processo si sviluppa; d) il tempo in cui esplica i suoi effetti; e) il sinergismo o antagonismo con altre citochine. Ad es., nell'encefalite allergica sperimentale l'IFN- β esplica o palesi effetti protettivi o drammatici effetti dannosi, ciò dipendendo strettamente dal momento, nell'evoluzione della malattia, in cui viene somministrato, dalla dose e dalla durata del trattamento.

Queste considerazioni, se da un lato invitano alla prudenza nell'impiego della terapia anti-citochinica con agenti biologici, dall'altro non devono assolutamente indurre ad abbandonare tali procedure, la cui applicazione ha tra l'altro condotto ad una migliore comprensione dei complessi meccanismi patogenetici operanti non soltanto nelle m. a., ma anche in altri settori della patologia, quale quella allergica e infettiva.

Tutte queste osservazioni valgono anche per la cosiddetta «immunodeviiazione», cioè per tutti quei tentativi — comprendenti la somministrazione orale dell'autoantigene, la somministrazione parenterale dell'autoantigene in forma solubile senza adiuvanti, la somministrazione parenterale di autoantigeni modificati, e, soprattutto, l'impiego di citochine di tipo 2 per antagonizzare la sintesi di quelle di tipo 1 e viceversa — intesi a indurre il viraggio di cloni T cellulari «patogeni» verso cloni T cellulari non patogenicamente rilevanti (cfr. fig. 5). Tentativi in tal senso sono stati effettuati sia in modelli animali (encefalite allergica, tiroidite, diabete, artrite e altri) che nell'uomo (soprattutto sclerosi multipla). Gli studi in questo settore, tuttavia, appaiono complicati dal fatto che la suddivisione delle cellule T CD4-positive in cellule Th1 patogene (nelle forme organo-specifiche) e cellule Th2 protettive (nelle stesse forme) è eccessivamente semplicistica, nella maggior parte dei casi non essendo agevole effettuare una netta distinzione tra citochine di tipo 1 e citochine di tipo 2 e precisare la responsabilità relativa di ciascun tipo citochinico nel determinismo di una data m. a. Nuovamente, quindi, occorre sottolineare la necessità di esercitare la massima prudenza nella «manipolazione» del sistema immunitario, tenendo anche conto che in primati l'immunodeviiazione intesa a prevenire l'insorgenza della sclerosi multipla ha portato alla comparsa in circolo di autoanticorpi patogeni e all'esacerba-

zione, in alcuni casi, della malattia autoimmune, probabilmente quale conseguenza di un eccesso di attività Th2 e, conseguentemente, di produzione di autoanticorpi. Anche in patologia umana è stata registrata la comparsa di autoanticorpi anti-DNA e anti-cardiolipina dopo trattamento con anticorpi monoclonali anti-TNF.

In prospettiva futura, la possibilità di modulare le risposte immunitarie mediante inserzione nel genoma di geni regolatori o inibitori per la sintesi di definite molecole (citochine, molecole co-stimolatorie, etc.) appare realistica, alla luce di quanto è già stato realizzato in altri settori della patologia sperimentale ed umana. In modelli animali di artrite, ad es., buoni risultati sono stati ottenuti con l'inserzione del gene che codifica per l'antagonista del recettore della IL-1 (IL-1Ra, inibitore naturale specifico dell'IL-1) ed in patologia umana disordini immunologici altrimenti letali, come l'immunodeficienza combinata grave da deficit genetico di adenosin-deaminasi, sono stati completamente e stabilmente corretti con la terapia genica (v.*; v.**).

Bibliografia

- Aichele P., Bachmann M., Hergatner H., Zinkernagel R., *Immunological Reviews*, 1966, **152**, 21.
 Alderuccio F., Toh B.-H., Tan S.-S. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, **178**, 419.
 Allen J. E., Maizels R. M., *Immunology Today*, 1997, **18**, 387.
 Amital H., Swissa M., Bar-Dayyan Y. et al., *Res. Immunol.*, 1996, **147**, 361.
 Barnaba V., *Immunological Reviews*, 1996, **152**, 46.
 Borish L., Roschwasser L., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, **99**, 161.
 Bottazzo G. F., Pujiol-Borrell R., Harafusa T., Feldman M., *Lancet*, 1983, **ii**, 1115.
 Brennan F. M., Feldman M., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 872.
 Canale W. C., Smith C. H., *J. Pediatr.*, 1967, **70**, 891-899.
 Dianzani U., Bragardo M., Di Franco D. et al., *Blood*, 1997, **89**, 2871.
 Drappa J., Vaishnav K., Sullivan K. E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**, 1643.
 Elliot M. J., Maini R. N., Feldman M. et al., *Lancet*, 1994, **344**, 1105.
 Euler H. H., Marmont A. M., Bacigalupo A. et al., *Blood*, 1996, **88**, 3621.
 Fairchild P. J., *Europ. J. Immunogenetics*, 1997, **24**, 159.
 Firestein G. S., Zvaifler N. J., *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 195.
 Fox D. A., *Am. J. Med.*, 1995, **99**, 82.
 Good R. A., Ikehara S., *J. Rheumatol.*, 1997 (suppl. 48), **24**, 5.
 Haneji N., Nakamura T., Takio K. et al., *Science*, 1997, **276**, 604.
 Ikehara S., *Renal Failure*, 1996, **18**, 1.
 Klinman N. R., *Immunity*, 1996, **5**, 189.
 Lang B., Vincent A., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 865.
 Libau R. S., Singer S. M., Mcdevitt H. O., *Immunology Today*, 1995, **16**, 34.
 Mackay I. R., Gershwin M. E., *Sem. Liver Dis.*, 1997, **17**, 3.
 Marmont A. M., *J. Rheumatol.*, 1997 (suppl. 48), **24**, 5.
 Masala C., *Autoimmunità e malattie autoimmuni*, in Dammacco F., *Immunologia in Medicina*, 1989, Fdi-Erme Ed., p. 621.
 Masala C., Amendolea M. A., D'Aviera L. et al., *Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin.*, 1997, **7** (suppl. 2), 10.
 Masala C., Amendolea M. A., Di Prima M. et al., *Atti XXXVI Settim. Med. Esp., Stampa Med.*, 1991, p. 167.
 McFarland H. F., *Science*, 1996, **274**, 2037.
 Miller J. F. A. P., Basten A., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 815.
 Moreland L. W., Heck L. W. Jr., Koopman W. J., *Arthritis Rheum.*, 1997, **40**, 397.
 Mountz J. D., Cheng J., Su X. et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995, **374**, 183.
 Nagata S., Suda T., *Immunology Today*, 1995, **16**, 39.
 Nicholson L. B., Kurchroo U. K., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 837.
 Reiser H., Stadelker M. J., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**, 1369.
 Roman M., Racke M., Shevach E., *Immunology Today*, 1996, **17**, 1.
 Romagnani S., *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, **12**, 227.
 Song Y.-H., Li Y., McLaren N. K., *Immunology Today*, 1996, **17**, 232.
 Strominger J. L., *JAMA Ed. B.*, 1996, **8**, 93.
 Theofilopoulos A. N., *Immunology Today*, 1995, **16**, 90.
 Theofilopoulos A. N., *Immunology Today*, 1995, **16**, 150.
 Tong L. J., Balakrishnam G., Kochan J. P. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, **99**, 461.
 von Herrath M. G., Oldstone M. B. A., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 855.

Weiner H. L., *Immunology Today*, 1997, **18**, 335.
 Wyse T. J., Kotzin B. L., *Curr. Op. Immunol.*, 1996, **8**, 843.
 Zhang J., Stinissen P., Medaer R. et al., *J. Mol. Med.*, 1996, **74**, 653.

CESARE MASALA, PAOLA ZANGARI
 E MARIA ANTONIETTA AMENDOLEA

MALATTIE AUTOIMMUNI IN OTORINOLARINGOIATRIA

SOMMARIO

Premessa (col. 3520). - **Sindrome di Sjögren** (col. 3520). - **Lupus eritematoso sistemico** (col. 3521). - **Sclerodermia** (col. 3521). - **Altri quadri di patologia autoimmune** (col. 3522). - **Labirintopatia di origine autoimmune** (col. 3525).

Premessa

La patologia a genesi immunitaria nel distretto otorinolaringoiatrico non è molto frequente anche se in epoca recente si comprendono in essa anche forme ritenute classicamente degenerative. Più che di manifestazioni autoimmuni puramente otorinolaringoiatriche, si tratta di aspetti a carico di questo distretto in malattie a carattere sistemico, nelle quali spesso la patologia in ambito testa-collo è preminente, come avviene nella sindrome di Sjögren e nella granulomatosi di Wegener. Ciò è dovuto probabilmente all'abbondanza e alla particolare struttura del sistema linfatico in questo distretto oltre che alla intensa stimolazione antigenica.

Il tessuto linfatico associato alle mucose è costituito da una parte organizzata in follicoli, al quale afferiscono antigeni, e da una parte diffusa, intraepiteliale e della lamina propria, costituita da cellule differenziate capaci di reagire con antigeni e di secernere anticorpi. Caratteristiche sono la presenza delle cellule epiteliali «M», in grado di assumere antigeni particolati e di trasmetterli a cellule presentanti antigeni e a linfociti, la ricchezza di linfociti B con IgA di superficie, di linfociti T CD8 e di linfociti B CD5 (fino al 30% nelle tonsille). Variazioni del numero e funzione delle cellule CD8 (e quindi della funzione soppressiva) e dei linfociti B CD5 (presenti in quantità aumentata nella patologia autoimmune) potrebbero avere un ruolo nella patogenesi delle m. a. di questo distretto.

Sindrome di Sjögren

Le manifestazioni consistono in cheratoconjuntivite secca e xerostomia legata a flogosi cronica autoimmune delle ghiandole esocrine, associate o meno a sintomi di lupus, artrite reumatoide o sclerodermia. Sul piano istopatologico predomina l'infiltrazione linfocitaria con caratteri destruenti, costituita prevalentemente da elementi CD4; su quello umorale si riscontra frequentemente presenza di fattore reumatoide, di anticorpi anti-nucleo (anti-SS-A, anti-SS-B, anti-SS-C o anti-RANA, quest'ultimo presente soprattutto nei casi associati ad artrite reumatoide e nell'artrite reumatoide stessa) e di anticorpi diretti contro epiteli duttali di ghiandole esocrine. Per quanto riguarda l'etiologia, non del tutto conosciuta, si attribuisce importanza al virus EBV per il fatto che si è notata reattività tra anticorpi anti-SS-B ed una ribonucleoproteina associata a RNA codificato da EBV; più recentemente è stato prospettato un ruolo del HTLV-I sulla base di dati epidemiologici e sierologici. Nella sindrome di Sjögren la mucosa orofaringea appare secca per assenza di saliva, di aspetto subatrofico, a volte iperemica, più raramente lichenificata. È frequente la comparsa di carie dentaria, di glossiti e stomatiti. I pazienti lamentano secchezza delle fauci, disfagia per cibi solidi e la presenza di disgeusia. Più elevata è la concentrazione salivare di immunoglobuline, particolarmente di IgA. Nel 25%

dei casi il quadro della distrofia mucosa è preceduto da ricorrenti episodi flogistici delle ghiandole parotidi con tumefazioni dolenti delle regioni laterali della faccia. Si tratta di aspetto classico assai importante: in questi casi è premonitore di un successivo diffuso interessamento del sistema ghiandolare esocrino. Non rara è l'evoluzione dell'infiltrato linfocitario in linfoma maligno. V. SÖGREN, SINDROME DI (v.; v.*).

Lupus eritematoso sistemico

Meno comuni, ma importanti e polimorfe, sono le manifestazioni otorinolaringoiatriche del *lupus eritematoso sistemico* (v.; v.*), malattia con stretti rapporti con il Sjögren in quanto il 4-13% dei pazienti con faringite secca sono anche luposi. Nel lupus sono comuni le lesioni labiali discoidi con eritema, atrofia e depigmentazione, che non raramente rappresentano la prima espressione della malattia. Le lesioni sono aggravate dall'esposizione ai raggi U.V.; va ricordato al riguardo il peggioramento del quadro lupico dopo terapia fotodinamica di papillomi laringo-tracheali. In sede di cicatrice di lesione lupica labiale è stata descritta maggiore incidenza di carcinomi epidermoidi. Comuni sono anche le ulcerazioni della mucosa nasale, più spesso bilaterali, raramente evolventi verso la perforazione del setto.

Un quadro singolare è rappresentato dalla *panniculite liposa profonda*, consistente in lesione nodulare dura sottostante a lesione cutanea dovuta a infiltrazione perivascolare da parte di mononucleati. La localizzazione più comune è nella regione testa-collo, talvolta alle ghiandole salivari maggiori, rendendo ardua la diagnosi differenziale con tumori epiteliali. Tende alla guarigione spontanea.

Nel lupus sono possibili coinvolgimenti laringei che si manifestano con sintomi miti, quali la disfonia, o più gravi quali l'ostruzione respiratoria. Il substrato patologico può consistere in flogosi delle articolazioni crico-aritenoidee con edema che possono risultare mortali.

È stata descritta anche paralisi del ricorrente sinistro secondaria a ipertensione polmonare vasculitica luposa.

Ugualmente raro è il coinvolgimento otologico consistente in otite media sierosa, associate a vestibolopatia, a perdita più o meno grave dell'udito e tinnito. Va ricordato al riguardo che la valutazione dei potenziali uditivi in pazienti luposi ha dimostrato latenze più lunghe, con o senza disfunzioni cognitive. Il lupus può accompagnarsi a presenza sierica di anticorpi anti-fosfolipidi (v. SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI [v.; v.*]) e alla nota sindrome trombofilica ad essi correlata. Nel suo ambito sono da ricordare la possibilità della comparsa di una sordità improvvisa.

La varietà discoide del lupus può essere causa di fastidiose ulcerazioni orali e palatine che limitano l'alimentazione. Esse regrediscono con applicazione di glicocorticoidi.

Da ricordare infine la comparsa nel lupus di emiatrofie facciali progressive di origine autoimmune per le quali, ovviamente, va valutata l'indicazione chirurgica, di frequenti riniti e di altre manifestazioni allergiche.

Sclerodermia

Tra le malattie a probabile etiologia autoimmune che compromette il trofismo della mucosa orale, faringea e laringea va annoverata la *sclerodermia*, caratterizzata da ispessimento e fibrosi del connettivo sottostante cute e mucose, vasculite e coinvolgimento di vari organi interni (polmone, cuore, rene, tubo digerente). In essa sono quasi sempre dimostrabili anticorpi anti-nucleo, in particolare anti-topo-



Fig. 9. Quadro cutaneo cosiddetto «en coup de sabre» in un caso di sclerodermia localizzata alla fronte. (Da Arslan M., *Minerva Otorinolaringol.*, 1954, 4, 1).

isomerasi-I, antinucleolari ed anticentromero (questi ultimi più frequenti nella varietà CREST). La malattia può causare lesioni mucosistiche delle prime vie aeree e digestive accompagnate talvolta da retrazione del velo pendulo.

Di interesse otoriatrico sono le lesioni cutanee circoscritte che si localizzano alla faccia e in particolare alla regione frontale. La lesione sclerodermica «a fascia» determina un quadro cutaneo caratteristico: «en coup de sabre» (fig. 9).

Altri quadri di patologia autoimmune

Quadri mucosistici con ulcere facilmente sanguinanti a livello della giunzione muco-cutanea della bocca, delle coane e delle gengive si osservano anche nella *dermatomiosite*, nella *sindrome di Reiter* e nella *sindrome di Kawasaki*. Rare le mucositi del cavo orale e del naso, talvolta accompagnate da stenosi respiratoria per tessuto granulomatoso tracheale del cavo orale e nasale in corso di *colite ulcerosa* (fig. 10).

La malattia di Behçet consiste in ulcerazioni orali e genitali ed uveite a probabile genesi immunitaria per la dimostrazione di anticorpi anti-mucosa ed anti-endotelio, di vasculite e di immunocomplessi circolanti. Le ulcere orali, dolenti, a fondo giallastro sanioso, di varia dimensione, si manifestano in modo ricorrente e rispondono alla terapia cortisonica e con alfa interferone.

Nel caso della *granulomatosi di Wegener* (v. WEGENER, GRANULOMATOSI DI [v.; v.**]) si tratta di forma vasculitica

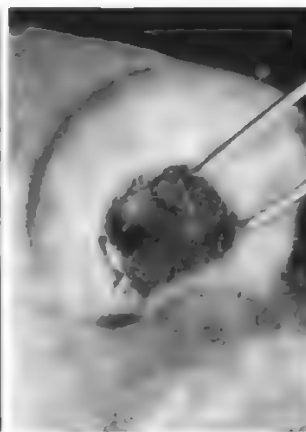
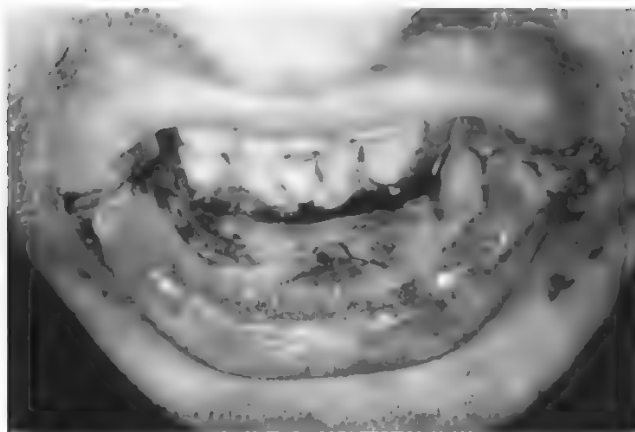


Fig. 10. Colite ulcerosa: aspetto di grave stomatite necrotico-emorragica (a sinistra) e di lesione del vestibolo nasale (a destra).

focale necrotizzante che interessa prevalentemente il tratto respiratorio superiore e inferiore, il rene, la pelle. Colpisce tipicamente l'adulto e presenta esordio talvolta acuto, tal'altra lento. Molto spesso è di pertinenza otoiatricica fino dall'inizio per presenza di otite media con sovrapposizione batterica e ipoacusia, di ulcerazioni dolorose nasali, di sinusiti refrattarie alla terapia, di faringiti, laringiti con disfonia e talvolta stenosi respiratoria alta. La patogenesi immunitaria è suggerita dal quadro istologico di granulomatosi con cellule giganti e vasculite e dalla frequentissima presenza di anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili. Buona la risposta alla terapia immunosoppressiva, subordinatamente al recupero della funzione renale.

Simile per molti aspetti, ma più grave, è il cosiddetto *midline granuloma* o granuloma della linea mediana (= *non healing granuloma*, *Stewart's granuloma*; XV, 1779), rara malattia che si presenta con ulcerazioni ed infiltrazione del naso e dei seni paranasali, del rinofaringe e delle cellule etmoidali, secrezione saniosa dal naso e che progredisce con la graduale distruzione del massiccio facciale fino a guadagnare le meningi. L'accurata valutazione istopatologica di tessuto biotico non necrotico, la determinazione dell'immunofenotipo e del riarrangiamento di geni per i recettori dei linfociti T ha consentito di definire la maggior parte di queste forme come linfomi maligni T angiocentrici post-timici, relativamente sensibili a radio-chimioterapia (fig. 11).

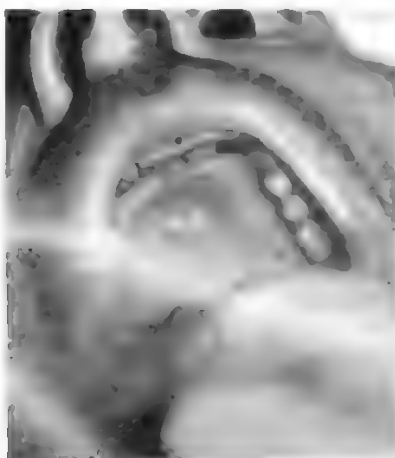


Fig. 11. Ulcera del palato duro in un paziente affetto dal cosiddetto «granuloma della linea mediana» (Du Riet V, *Le in ORI* 1980 Ed. Omnia Medica, 1).

La *policondrite* (v. *POLICONDRITE RICORRENTE**) è una rara affezione cronica flogistica distruttrice che interessa le cartilagini e il sistema cardiovascolare. Inizia con riduzione dei mucopolisaccaridi delle cartilagini periferiche, infiltrazione linfo-plasmocitaria e formazione di granulomi e distruzione centripeta della cartilagine stessa; coesistono infiltrati infiammatori nella media dell'aorta prossimale con distruzione delle fibre elastiche e muscolari e danni oculari. La patogenesi autoimmune è suggerita dalla dimostrazione di immunoglobuline e complemento nelle cartilagini interessate e dalla presenza di anticorpi anti-collagene II nel siero. Il quadro clinico è caratterizzato da deformazioni dei padiglioni auricolari che appaiono accartocciati, molli, pastosi, con scomparsa delle normali ripiegature, e della piramide nasale che subisce alterazioni per compromissione dello scheletro cartilagineo (fig. 12). La mucosa nasale appare secca, distrofica, crostosa; frequenti sono gli episodi di epistassi. Il processo interessa anche le cartilagini della laringe e trachea. È possibile la comparsa di stenosi respiratoria per interessamento delle articolazioni crico-aritenoidee e blocco della motilità delle corde vocali (fig. 13). Talvolta l'uso di una cannula tracheale può essere insufficiente per l'interessamento delle cartilagini della trachea che collabisce. È frequente la compromissione della funzione uditiva associata a vertigini di origine labirintica.

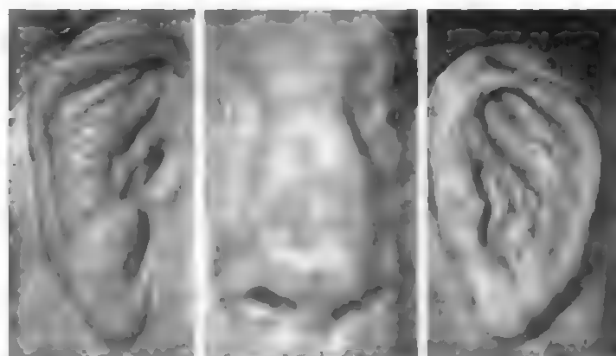
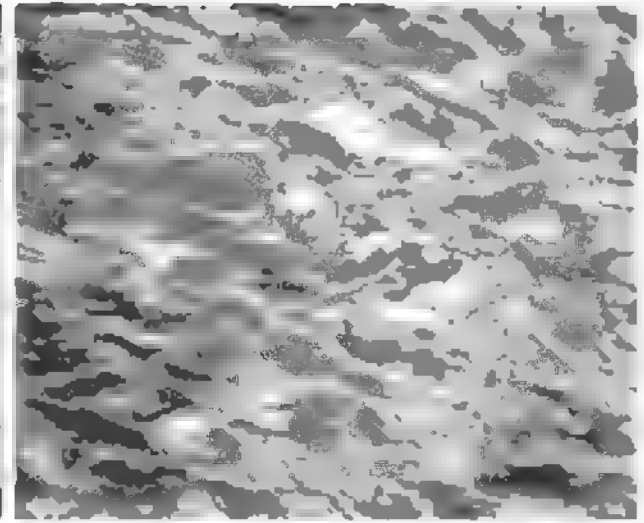
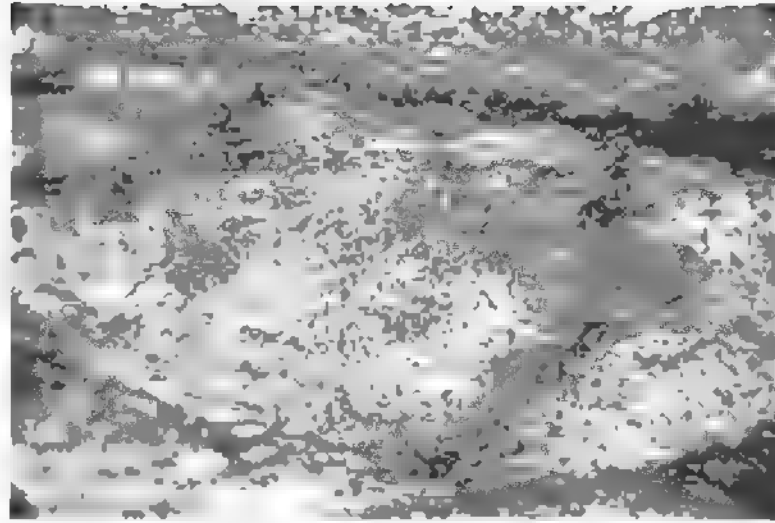


Fig. 12. Alterazioni delle cartilagini dei padiglioni auricolari e della piramide nasale in un caso di condrite accompagnata da artrite reumatoide.

Fig. 13 Stessa paziente della fig. 12. A sinistra: frammento di cartilagine aritenoidea da intervento di aritenoidectomia per stenosi respiratoria da policondrite. Cartilagine con infiltrazione di elementi linfoidi. Qualche residuo è circondato da tessuto fibroso (Azan Mallory, 60 X). A destra: frammento di cartilagine auricolare di policondrite. Si osservano esili fasci di fibrille collagene che infiltrano il tessuto cartilagineo sostituendolo e alterandone la struttura. La cartilagine presenta gravi lesioni cellulari (Azan Mallory, 15 X).



Labirintopatia di origine autoimmune

Vi sono molti elementi che depongono per la sua esistenza, pur essendovi aspetti ancora non chiari. Per quanto riguarda l'otosclerosi, è noto che in questi pazienti la capsula contiene tessuto osseo prematuro con residui cartilaginei, ed in effetti in tale affezione sono stati dimostrati titoli di anticorpi sierici contro il collagene II e IX e contro condrociti. La flogosi distruttiva a partenza cartilaginea potrebbe essere favorita da produzione di molecole di adesione, quali ICAM-1, da parte di condrociti non più ricoperti da matrice, e il successivo reclutamento di cellule della flogosi.

Per quanto riguarda le ipoacusie acute o progressive derivate da lesioni autoimmuni dell'orecchio interno si discute da molti anni sulla loro esistenza. Il concetto di «malattia autoimmune dell'orecchio interno» fu introdotto da McCabe nel 1979 per comprendere sordità improvvise, talora accompagnate da disfunzione vestibolare, in pazienti che rispondevano alla terapia immunosoppressiva e che successivamente sviluppavano, almeno nella metà dei casi, sintomi di m. a. sistemica. Una delle più convincenti dimostrazioni della natura autoimmune di queste forme è la reattività linfocitaria *in vitro* nei confronti di omogenato di orecchio interno.

Bibliografia

- Abramson A. L., Alvi A., Mullooly V. M., *Lasers Surg. Med.*, 1993, 13, 677.
 Alayon Fumero A. C., de Sertio Arias J. L., *Acta Otorinolaringol. Exp.*, 1994, 45, 137.
 Aviles A., Rodriguez L., Guzman R. et al., *Hematol. Oncol.*, 1992, 10, 141.
 Bujia J., Sittlinger M., Arnold B. et al., *HNO*, 1993, 41, 507.
 Fermin C. D., Garry R. F., *HNO*, 1993, 41, 239.
 Gavaud C., Ninet J., Monier J. C. et al., *Presse Med.*, 1993, 30, 1679.
 Megighian D., *Jour. Franc. D'ORL*, 1957, 6, 950.
 Pitzke P., Bujia J., Wilmes E., Hammer C., *Acta Otolaryngol. Stockh.*, 1994, 114, 81.
 Rickli H., Fretz C., Hoffmann M. et al., *Eur. Resp. J.*, 1994, 7, 1899.
 Roddi R., Riggio E., Gilbert P. M. et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1994, 93, 1067.
 Rudack C., *HNO*, 1995, 43, 275.
 Trioulas A. G., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1996, 14, S. 65-70.
 Vyse T., Luxon L. M., Walport M. J., *J. Laryngol. Otol.*, 1994, 108, 57.
 White W. L., Sherertz E. F., Berg D., Clark R. E., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1993, 117, 535.
 Zouboulis C. C., Treudler R., Orfanos C. E., *Hautarzt*, 1993, 44, 440.

GIUSEPPE AMADORI E DAVIDE MEGIGHIAN

MALATTIE ORFANE: V. MALATTIE RARE.**

MALATTIE RARE

F. *maladies rares; maladies orphelines*. - I. *rare diseases; orphan diseases*. - T. *seltene Krankheiten*. - S. *enfermedades raras*.

SOMMARIO

Definizione (col. 3526). - **Esempi di malattie rare** (col. 3527). - **Rilevanza sociale delle malattie rare** (col. 3529). - **Difficoltà nella diagnosi e nell'informazione sulle malattie rare** (col. 3529). - **La ricerca, unica strada per lo sviluppo della terapia per le malattie rare** (col. 3530). - **Il centro di ricerche cliniche per le malattie rare dell'Istituto Mario Negri** (col. 3531).

Definizione

Vi sono malattie che ricorrono con una così scarsa frequenza da aver meritato la designazione di *malattie rare* [m.r.]. Molte di esse sono per lo più sconosciute al pubblico e spesso anche ai medici: alla gran parte di esse, nei libri di testo di Medicina, sono dedicate solo poche righe e in letteratura si trovano poche pubblicazioni al riguardo. Lo stesso termine «m.r.» non esiste nel linguaggio di interrogazione delle banche dati bibliografiche. Come si può allora esattamente definire una m.r.? Una definizione precisa non esiste. Possiamo prendere ad es. la definizione di m.r. adottata negli U.S.A. (dove da più tempo i complessi problemi medici e sociali dei pazienti affetti da una m.r. sono stati affrontati in modo complessivo): nel 1983 fu promulgata una legge che aveva lo scopo di promuovere la ricerca e lo sviluppo dei farmaci per curare le malattie rare (i cosiddetti farmaci orfani; v.**). Nella legge veniva definita «rara» una malattia che colpisce meno di 200.000 statunitensi: in altre parole una malattia che ha una prevalenza di 1 a 1100 circa. Si tratta di un criterio abbastanza ampio che permette di includere un certo numero di malattie abbastanza conosciute e ormai facilmente diagnosticate.

In Giappone, dove pure è stata adottata recentemente una legislazione che promuove i farmaci orfani, la definizione di m.r. è più restrittiva.

Ad ogni modo sono comunque circa 5000 le malattie e le sindromi che secondo l'O.M.S. possono essere considerate rare. Di queste la grande maggioranza, cioè circa 4000, sono malattie determinate da un'anomalia genetica. È probabile che molte di queste malattie siano state descritte più volte sotto nomi diversi ed è altrettanto probabile che non tutte siano state ancora descritte in modo preciso. Dobbiamo anche considerare che molte malattie possono essere rare in alcune aree geografiche e più frequenti in altre per ragioni legate a fattori genetici, alle condizioni ambientali, alla diffusione di agenti patogeni, alle abitudini di vita, e via dicendo.

Per la maggior parte delle m.r. mancano precisi dati epidemiologici: incidenza, frequenza, prevalenza etc. Per pochissime malattie rare esiste infatti un sistema di notificazione dei casi a livello nazionale o internazionale. Pertanto è molto difficile delineare un profilo della prevalenza di queste malattie. Per lo più la segnalazione dei casi avviene

tramite la loro pubblicazione nella letteratura scientifica: ma questo dipende evidentemente dalla volontà dell'osservatore di descrivere il caso. Quando però di una certa m.r. sono stati descritti un certo numero di casi, altri successivamente non vengono più segnalati e quindi viene a mancare un dato epidemiologico preciso.

Esempi di malattie rare

Le m.r. sono moltissime: secondo una stima dell'O.M.S. si adattano alla definizione di m.r. circa 5000 malattie, delle quali circa 4000 sono malattie dismorfiche congenite ed ereditarie. Vi sono m.r. in tutte le specialità della medicina: neurologia, cardiologia, reumatologia, oncologia, ematologia, etc. Un elenco delle m.r. occuperebbe molte pagine, e non sarebbe mai esaustivo. È comunque interessante fare riferimento, sia pure molto sommariamente, a due aree della medicina alle quali afferiscono molte m.r.

Come abbiamo detto molte m.r. sono malattie che si presentano come *malformazioni congenite* o *dismorfismi*. Alcune sono facilmente riconoscibile alla nascita, come la sindrome di Down o la labio-palatoschisi. Altre malattie sono così rare che solo pochi casi sono stati descritti in letteratura, e dunque il loro riconoscimento è difficile anche per i più esperti specialisti di dismorfologia. Il processo diagnostico inizia con un'osservazione attenta del paziente, e soprattutto deve essere data attenzione meticolosa alle più inusuali e strane manifestazioni. La sindrome di Cornelia del Lange (che si manifesta con alterazioni scheletriche e facciali e con un irsutismo) può essere sospettata quando il neonato emetta un grido basso e soffocato, mentre se il pianto ricorda un miagolio si può sospettare la malattia «cri du chat» (X, 622). Strane lentiggini sul labbro indurranno a pensare alla sindrome di Peutz-Jeghers (v. POLIPO E POLIPOSI, XII, 291; *5971; v.**), mentre se le riscontriamo nel cavo ascellare, sospetteremo una neurofibromatosi.

Numerose alterazioni oculari sono associate a dismorfismi: l'eterocromia delle iridi è associata alla sindrome di Waardenburg (v. WAARDENBURG, SINDROME DI**), la dislocazione del cristallino alla sindrome di Marfan (v. MARFAN, SINDROME DI [v.; v.*; v.**]) e all'omocistinuria; un angiomaso della retina può essere il solo sintomo della malattia di von Hippel-Lindau (v. LINDAU, MALATTIA DI). Centinaia di sindromi cromosomiche sono state descritte. Alcune sono molto note, come la sindrome di Down o trisomia del cromosoma 21 (v. DOWN, SINDROME DI [v.; v.*; v.**]), la trisomia 13, la trisomia 18 (v. TRISOMIA). Altre sono estremamente rare, ma il grande numero delle diverse anomalie cromosomiche obbliga il neonatologo o il pediatra ad indagare con una mappa cromosomica ogni neonato o bambino con evidenti malformazioni o con ritardo mentale. Negli ultimi anni le scoperte della biologia molecolare hanno permesso di fare importanti passi avanti nella diagnosi di queste malattie, ed una consulenza di un genetista deve essere sempre ricercata.

Un altro importante gruppo di malattie rare è quello delle *malattie da errore congenito del metabolismo*. Questo termine fu introdotto per la prima volta nei primi anni del nostro secolo da Archibald Garrod. Le sue fondamentali osservazioni sulla natura ereditaria dell'alcaptonuria (v.; v.*) aprirono la strada alla scoperta delle malattie metaboliche. Come alcune centinaia le malattie descritte, ciascuna causata dal difetto di una specifica via metabolica, e il testo fondamentale di questa specialità (Scriver C. R. et al., eds., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*; 1995, MacGraw-Hill, New York) è composto da 3 volumi, ha migliaia di pagine e più di 1500 sezioni.

L'impatto clinico degli errori metabolici è estremamente variabile: alcune malattie sono pressoché asintomatiche,

come la cistationuria, altre causano disturbi modesti, come la cistinuria (v.; v.***) con calcolosi renale, altre sono malattie catastrofiche, come le malattie causate da difetti enzimatici del ciclo dell'urea, che portano morte o lasciano gravissimi deficit fin dall'età neonatale se non sono riconosciute tempestivamente.

La gran parte delle malattie metaboliche ha un'incidenza inferiore di 1 a 100 mila; sono per lo più malattie a trasmissione autosomica recessiva. Ciò vuol dire che i genitori sono entrambi eterozigoti, e sono *carrier* asintomatici. Molto meno numerose sono le malattie metaboliche ereditarie legate al cromosoma sessuale X: tra queste la malattia di Lesch-Nyan (un difetto del metabolismo delle purine), il deficit di ornitil transcarbamilasi e la sindrome di Hunter (una malattia del gruppo delle mucopolisaccaridosi [v.]).

La diagnosi di malattia metabolica richiede la disponibilità di un laboratorio specializzato nella ricerca e nella misurazione di metaboliti nei fluidi biologici (sangue, urine, etc.). Molti Centri Universitari e Ospedalieri in Italia sono specializzati nella diagnosi delle malattie metaboliche e dispongono di molte delle metodiche necessarie per la determinazione del difetto enzimatico; inoltre questi Centri mantengono contatti internazionali per l'eventuale invio di campioni di materiale biologico presso centri esteri specializzati.

Molte malattie metaboliche non dispongono di una terapia efficace, altre traggono giovamento dalla dieta, per altre ancora sono allo studio farmaci innovativi. Una soluzione definitiva per le malattie metaboliche potrebbe essere fornita dalla terapia genica. Essa consiste nell'integrazione di un gene, mediante tecniche della biologia molecolare, nel genoma del paziente ottenendo una espressione stabile e duratura del prodotto del gene desiderato. Già sono stati approntati protocolli di studio per applicare la terapia genica in alcune malattie causate da errori enzimatici (v. TERAPIA GENICA [v.*; v.**]).

Molte m.r. colpiscono il *sistema nervoso centrale e periferico*: tra queste si annoverano malattie congenite, come l'atassia di Friedreich (v. FRIEDREICH, MALATTIA DI**), le distrofie muscolari (v.; v.*; v.**), la malattia di Louis-Bar, e malattie acquisite come il blefarospasmo (v.**), la distonia spasmodica (v. DISTONIE**), o la sclerosi laterale amiotrofica (v.**). Quest'ultima è una grave malattia degenerativa dei neuroni di moto ed un esempio di m.r. e di malattia orfana: una malattia che non solo si riscontra con scarsa frequenza ma per la quale non c'è nessuna concreta speranza di trovare una cura efficace nel prossimo futuro.

M.r. di interesse *ematologico* sono alcune forme di anemia come l'anemia di Diamond-Blackfan e l'anemia di Fanconi, e rare forme di leucemia e di linfoma. M.r. di interesse immunoematologico sono le sindromi caratterizzate da anomalie della funzione dei linfociti: per es. vi è un gruppo di malattie denominate sindrome da immunodeficienza combinata severa (SCID; v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]) che sono determinate da deficit di enzimi come l'adenosina deaminasi, da difetto di maturazione delle *stem cell* linfoidi, da deficit di interleuchina-2.

Le *alterazioni dell'emostasi* causate da difetti congeniti di uno o più fattori della coagulazione o della funzione delle piastrine formano un gruppo nutrito di m.r.: l'emofilia (v.; v.*; v.***) è l'esempio più noto di questo gruppo di malattie, mentre meno note sono altre malattie come l'afibrinogenemia o la tromboastenia di Glanzman. Si potrebbero fare molti altri esempi, per ogni area della medicina: le m.r. rappresentano secondo alcune stime circa il 10% della patologia umana.

Rilevanza sociale delle malattie rare

Le organizzazioni sanitarie e gli ambienti scientifici riconoscono che la ricerca sulla maggioranza di queste malattie sia insufficiente. Le persone colpite da m.r. spesso ricevono infatti cure inadeguate anche nei paesi a più alto sviluppo tecnologico per l'oggettiva difficoltà nel riconoscere adeguatamente tali condizioni. Per queste malattie è stato coniato anche il termine di *malattie orfane*, ad indicare che si tratta di patologie ignorate o trascurate. Si tratta evidentemente di un problema di notevole rilevanza sociale, se si considera che molte delle m.r. sono ereditariamente trasmesse, gravi, invalidanti, prive di terapie specifiche.

La rilevanza degli aspetti economici del problema è intuitiva se consideriamo che spesso i pazienti colpiti da m.r. si sottopongono ad una lunga serie di esami di laboratorio, indagini strumentali ed infine, specialmente quando ad ammalarsi è un bambino, a peregrinazioni da un medico all'altro, da un ospedale all'altro, magari anche all'estero, in cerca di una diagnosi e di una terapia adeguate. È inoltre evidente come, in un contesto come quello del nostro Servizio Sanitario Nazionale, spesso già troppo occupato nel soddisfare esigenze di carattere più comune, i pazienti affetti da patologie rare possano trovare difficoltà ad ottenere attenzione e risposte adeguate. Appare quindi estremamente urgente ed appropriato che qualcuno si occupi delle m.r. con un approccio molto articolato.

Difficoltà nella diagnosi e nell'informazione sulle malattie rare

Il medico che si trovi di fronte nella pratica clinica ad una m.r. affronta spesso con difficoltà la formulazione di una diagnosi corretta. Uno studio condotto alla fine degli anni '80 dalla Commissione Nazionale per le Malattie Orfane istituita dal Dipartimento della Salute e Servizi Sociali del Governo degli U.S.A. ha dimostrato che anche in un paese che si considera all'avanguardia in campo medico come gli U.S.A. i pazienti affetti da m.r. soffrono della scarsità di informazione e di cultura medica. Sono stati intervistati molti pazienti affetti da una m.r. ed è stato verificato un grave ritardo nella diagnosi della malattia: nel 31% dei casi c'era voluto da uno a cinque anni per arrivare a formulare una diagnosi corretta e nel 15% dei casi questa diagnosi non c'era ancora dopo sei anni o più.

La *diagnosi* di una m.r. può evidentemente essere difficile, perché il medico curante può non aver mai visto quella malattia prima e probabilmente non ne vedrà altri casi per molti anni. Spesso quindi passa del tempo prima che venga posta la diagnosi con precisione. La stessa Commissione ha verificato che anche nel caso che la diagnosi fosse stata formulata in tempo, i pazienti, o i loro parenti, avevano molte difficoltà ad ottenere rapide ed esaurienti informazioni a riguardo della loro malattia; in particolare era difficile sapere quali erano i centri clinici più qualificati per studiare e curare le m.r. La scarsità di informazione sulle m.r. costituisce uno dei maggiori ostacoli in cui si imbattono i pazienti. La stessa Commissione ha dimostrato che vi è una evidente difficoltà per i pazienti ad ottenere informazioni adeguate sulle cause e sulle possibilità di cure per le malattie in questione. Questa notizia proviene da un paese all'avanguardia in tutti campi di ricerca medica e nel quale esiste notoriamente una grande tradizione di comunicazione tra i medici e i loro pazienti.

Una volta formulata la diagnosi, il paziente e la sua famiglia desiderano che tutto ciò che si deve sapere della malattia, specie ciò che riguarda le cause, la prognosi e la terapia, venga loro spiegato in modo chiaro e comprensibile. Spesso di fronte ad una diagnosi insolita provano il desiderio che questa diagnosi venga confermata in ambito

specialistico. Qualcuno, di fronte alla prospettiva che per una data malattia non vi sia terapia nota per essere efficace, dichiara di essere disposto a sperimentare cure nuove anche se non ancora di certa efficacia, e vuole sapere dove deve rivolgersi. Non di rado il paziente intraprende la ricerca di un centro famoso o rinomato in un certo campo da solo, e viaggia da un ospedale all'altro senza una indicazione precisa. Altre volte di fronte a una diagnosi di una malattia che non ha cura, che non viene per ora studiata in nessun posto al mondo, non rimane che rassegnarsi e vivere il proprio disagio da soli e con la propria famiglia. Però il paziente può avere bisogno di assistenza sociale, di aiuto per molti motivi non strettamente medici, o infine non rassegnandosi desidera che qualcuno si occupi del suo problema, con la ricerca e con lo studio. Spesso la risposta a questi bisogni viene da associazioni spontanee di pazienti o di familiari di pazienti che si riuniscono per affrontare insieme i loro problemi. Negli U.S.A. ci sono centinaia di queste associazioni, alcune di rilievo nazionale, molto impegnate nella diffusione tra il pubblico più vasto e presso i responsabili della Sanità pubblica delle richieste di aiuto e di solidarietà per i pazienti affetti da m.r. Queste associazioni pubblicano spesso bollettini e *newletters* che hanno grande importanza per la diffusione di notizie di grande utilità per i pazienti, i loro familiari, anche i loro medici, che possono sapere con tempestività delle iniziative di studio e di ricerca.

Anche in Italia esistono molte di queste organizzazioni, alcune note al pubblico e attive da molti anni, altre di più recente fondazione e meno conosciute. Si avverte la necessità di riunire queste associazioni in una federazione che possa costituire un mezzo per individuare i problemi comuni e quindi superarli; per incentivare la raccolta e l'uso razionale di fondi per la ricerca scientifica e clinica; per agevolare lo scambio di informazioni utili a tutti.

La ricerca, unica strada per lo sviluppo della terapia per le malattie rare

La mancanza di conoscenze sull'etiologia e sulla patogenesi è il principale ostacolo alla prevenzione, alla diagnosi e al trattamento delle malattie. Per la gran parte delle m.r. ed orfane queste conoscenze sono completamente insufficienti. L'unico modo possibile per accrescere le conoscenze in questo campo è l'incentivazione della ricerca di base e clinica. Purtroppo però l'interesse dei ricercatori per le m.r. è scarso, perché si tratta di un'area che ha poche probabilità di essere finanziata. Questo è quanto avviene negli U.S.A.: se si esamina la situazione in Italia, dove gli investimenti pubblici nella ricerca biomedica di base sono largamente insufficienti, si può facilmente intuire che per la ricerca sulle m.r. la situazione sia drammatica. Se poi si considera la ricerca clinica, altro tassello fondamentale per lo sviluppo di nuove terapie per le m.r., alle difficoltà di ordine economico si aggiungono altri ostacoli difficili da superare, quali la difficoltà a reclutare pazienti per gli studi clinici e l'inadeguatezza delle strutture ospedaliere attuali allo progettazione e svolgimento di progetti di ricerca clinica.

Per definizione le m.r. colpiscono pochi individui in una data popolazione; è dunque verosimile che pazienti con una stessa malattia siano dispersi su un'ampia area, a dimensione nazionale o addirittura sovranazionale. Quindi il disegno di un progetto di ricerca può arenarsi di fronte all'ostacolo del reclutamento dei pazienti. Infatti un campo di ricerca molto importante ma completamente trascurato è quello della *epidemiologia* delle m.r. Una accurata informazione sull'incidenza e prevalenza delle m.r. è molto importante sia per la ricerca di base che di quella clinica. L'isti-

tuzione di registri e di «database» potrebbe essere molto utile per raccogliere dati in questo campo. L'istituzione di registri di pazienti con m.r., che contenga dati clinici, biologici, anagrafici, può permettere ai ricercatori di localizzare e selezionare i pazienti che possono essere reclutati negli studi. Registri di studi clinici controllati su farmaci o altre misure terapeutiche sono utili per offrire ai pazienti l'opportunità di partecipare a protocolli avanzati di ricerca e a nuove possibilità di cura della loro malattia.

Infine un registro che contenga indicazioni per il reperimento dei farmaci orfani può essere di grande utilità a pazienti e medici. Le m.r. costituiscono anche una sfida per la ricerca scientifica e dal loro studio possono derivare conoscenze di interesse più generale. Gli esempi sono numerosi: lo studio di una patologia rara e grave come l'emofilia ha contribuito a comprendere i meccanismi della coagulazione del sangue; le ricerche sulla fenilchetonuria hanno insegnato molto nel campo dello studio del metabolismo degli aminoacidi; la deficienza congenita dell'enzima adenosina deaminasi (che provoca un grave deficit del sistema immunitario per cui il paziente che ne è affetto deve vivere completamente isolato) è stata il primo esempio di una malattia a cui sia stata applicata la terapia genica (v.*; v.**). I risultati che si ottengono studiando una m.r. possono quindi tradursi in un vantaggio per la conoscenza e la cura anche di malattie assai più diffuse.

Il centro di ricerche cliniche per le malattie rare dell'Istituto Mario Negri

Il Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare Aldo e Cele Daccò è una iniziativa dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, un Istituto che opera da più di 30 anni nel campo della ricerca biomedica. Il progetto per le m.r. nasce dall'esigenza di completare il panorama di attività nel campo della ricerca biomedica con la realizzazione di progetti di ricerca in campo clinico, con particolare l'attenzione è rivolta soprattutto alle m.r. Il Centro di Ricerche Cliniche non rappresenta semplicemente l'apertura di una clinica dove ricoverare pazienti affetti da m.r., ma un progetto organico che mira a costruire un vero e proprio centro di formazione e disseminazione di cultura medica nell'ambito delle m.r.

Il Centro ha la sua sede a Villa Camozzi, un'antica villa patrizia restaurata appositamente per diventare una clinica, a Ranica in provincia di Bergamo. Dispone di diversi servizi e strutture: attualmente è operante un reparto di Day Hospital e presto entrerà in funzione una sezione di degenza, che ha tutti i requisiti per affrontare ogni tipo di studio clinico.

Presso il Centro di Ricerche Cliniche inoltre è stato attivato dal 1992 il Centro di Informazione per le Malattie Rare, che è a disposizione di quanti (medici di base o specialisti, e anche pazienti, loro parenti od associazioni) vogliano notizie aggiornate in merito ad una m.r. Per ogni m.r. viene eseguita una ricerca bibliografica aggiornata, mirata a verificare quali siano le più recenti acquisizioni in materia, in termini di diagnosi e terapia. Le informazioni più importanti sono raccolte in una sintetica scheda. Particolare cura viene posta nell'esecuzione della ricerca bibliografica ad individuare i Centri che in Italia e in Europa si sono dedicati alla ricerca clinica su quella data malattia. Soprattutto l'attenzione è puntata ad individuare Centri che stiano sperimentando nuove terapie per le m.r. Infine nell'ambito dei progetti educativi e formativi, presso il Centro avrà sede la Scuola Europea per le Malattie Rare.

La peculiarità dell'azione culturale svolta dall'Istituto in tanti anni è sempre stata quella di fare formazione sul

campo. La formazione avviene anche tramite la partecipazione a momenti più formali come seminari, corsi, *workshops* che regolarmente si tengono nelle varie sedi dell'Istituto. Presso il Centro di Ricerche Cliniche questa attività formativa riguarda soprattutto il campo della ricerca clinica.

Bibliografia

- Aase J. A., *Diagnostic Dysmorphology*, 1990, Plenum Publishing Corporation.
 Anderson F. W., Editorial, *J. Human Gene Therapy*, 1994, 5, 281-282.
 Buyse M. L., *The Birth Defect Encyclopedia*, 1990, Blackwell Scientific Publication.
 Marlene Halfner, *L'Orphan Drug Act. Le produit orphelins aux Etats-Unis. Perspectives & Santé*, 1988, 45, 43-48.
 Report of the National Commission Orphan Diseases. Executive summary and recommendations, U.S. Dept. of Health and Human Services, February 1989.
 Scriver C. R., et al., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, 1995, McGraw-Hill, New York.
 Thompson L., *Correcting the Code: Inventing the Genetic Cure for the Human Body*, 1994, Simon & Schuster.
 Thone J. G., *Physicians' Guide to Rare Diseases*, 1995, Dowden Publishing Company.
 Van Woert M. H., Chung E., *Cooperative approaches to research and development of orphan drugs*, in *Progress in Clinical & Biological Research*, 1985, vol. 197, Alan R. Liss Inc., New York.

ARRIGO SCHIEPPATI e GIUSEPPE REMUZZI

MAMMELLA [v. vol. IX, coll. 222-307; Agg. I, coll. *4799-4846]

SOMMARIO GENERALE

TUMORI	col. 3532
CHIRURGIA PLASTICA DELLA MAMMELLA	col. 3555

TUMORI

[v. vol. IX, coll. 245-304; Agg. I, coll. *4799-4846]

SOMMARIO

GENETICA DEL CANCRO DELLA MAMMELLA	col. 3532
PROGnosi DEL CANCRO DELLA MAMMELLA NELLE DONNE GIOVANI	col. 3536
TERAPIA MEDICA DEL CANCRO DELLA MAMMELLA	col. 3537
Endocrinoterapia (col. 3538). - Chemioterapia (col. 3540). - Chemioterapia adiuvante (col. 3541). - Chemioterapia primaria (col. 3544). - Strategia terapeutica globale (col. 3545).	
CHIRURGIA [v. Agg. I, coll. *4817-4836]	col. 3548
Premessa (col. 3548). - Chemioprevenzione (col. 3549). - Nuovi progressi sulla quadrantectomia (col. 3550). - Conclusioni sulla scelta dell'approccio chirurgico (col. 3552).	

GENETICA DEL CANCRO DELLA MAMMELLA

Nei Paesi Occidentali l'incremento medio annuale del carcinoma mammario femminile è dell'1-2% ed è in gran parte dovuto ad un impiego più vasto della mammografia. Secondo le stime epidemiologiche, in Italia 7 donne su 100 (cioè una su 14) sono a rischio di manifestare clinicamente un carcinoma mammario durante il corso di una vita media normale, cioè entro l'età di 80 anni, a condizione di non morire prima per altre cause. La vasta maggioranza dei carcinomi mammari diagnosticati sono ad occorrenza sporadica, cioè non sono attribuibili a forme ereditarie, e la loro incidenza è largamente influenzata da fattori di rischio ambientale o legati allo stile di vita quali dieta, anamnesi riproduttiva, esposizione ad agenti oncogeni.

Si ritiene tuttavia che circa il 5-10% dei carcinomi mammari insorgano a causa di geni ereditari che conferiscono

un elevato rischio per questa malattia. In queste forme generalmente il carcinoma si manifesta ad un'età più giovane, è spesso bilaterale e tende a presentarsi in famiglie i cui membri sono affetti anche da altre forme tumorali, specialmente carcinoma ovarico (v. OVAIO [v.; v.**]).

In queste forme di carcinoma mammario sono stati attuati recentemente importanti studi di genetica molecolare. Nel 1990, attraverso un'analisi di *linkage* condotta in famiglie con vari casi di carcinoma mammario e ovarico diagnosticato in giovane età, è stato localizzato sul cromosoma 17q21 un gene con predisposizione per il carcinoma mammario (Hall *et al.*, 1990). Studi successivi, condotti da vari gruppi internazionali riuniti in un consorzio, hanno permesso, nella seconda metà del 1994, di isolare il gene *BRCA1* (Miki *et al.*, 1994). Queste analisi hanno anche permesso di valutare che in circa 200 famiglie, nelle quali almeno quattro membri erano affetti da carcinoma mammario, le mutazioni nel *BRCA1* erano presenti nel 50% dei casi, mentre la percentuale aumentava al 75% nelle famiglie affette sia da carcinoma mammario che da carcinoma ovarico. Sinora sono note più di 100 mutazioni del *BRCA1*, che interrompono il normale funzionamento della proteina, tra le quali alcune mutazioni *frameshift* (mutazione che modifica la lettura della sequenza di DNA) e occasionali mutazioni *missense* (mutazione che cambia il significato di un codone). Lo studio continuo di tutte queste mutazioni permetterà probabilmente di identificare i *domain* della proteina che sono funzionalmente critici nel prevenire l'insorgere del carcinoma mammario.

Particolarmente importante è ritenuta la mutazione *frameshift* alla posizione 185 nell'esone 2 che comporta la delezione di adenina e guanina, denominata *185delAG*, e che è stata identificata in più di 20 famiglie ebraiche affette da carcinoma mammario od ovarico (Collins, 1996). Un recente studio epidemiologico-genetico, condotto in una popolazione di ebrei Ashkenazi, scelta indipendentemente dall'anamnesi familiare di neoplasia, ha rivelato che circa l'1% presenta questa mutazione, apparentemente correlata alla discendenza da un antenato comune. Questa frequenza sorprendentemente elevata della mutazione *185delAG* rende probabilmente il carcinoma mammario ed ovarico, attribuibile a questa mutazione, la più importante malattia sinora identificata dovuta ad un singolo gene.

Nelle famiglie studiate per l'elevata incidenza di carcinoma mammario ed ovarico, una mutazione *BRCA1* è stata associata con un rischio potenziale dell'85% di manifestare clinicamente un carcinoma mammario durante il corso di una vita media normale. Tuttavia, occorrono ulteriori analisi per determinare se questo rischio così elevato non sia in realtà sovrastimato, in quanto valutato in famiglie con numerosi membri affetti dalla neoplasia. Due studi recentemente pubblicati hanno permesso di valutare che circa il 7,5% delle pazienti con carcinoma mammario diagnosticato prima dei 30 anni di età presenta probabilmente una mutazione germinale *BRCA1*. Molte delle pazienti presentavano un'anamnesi familiare di parenti affette da carcinoma mammario, ma un numero relativamente basso presentava un'anamnesi familiare tale da poter essere considerata veramente e altamente indicativa di una sindrome ereditaria.

In una importante frazione di famiglie affette da carcinoma mammario non è stata dimostrata una correlazione con il gene *BRCA1*. Il sospetto di uno o più altri geni associati a predisposizione per carcinoma mammario è stato posto anche in studi di famiglie con almeno un membro di sesso maschile affetto da carcinoma della mammella. Una valutazione condotta in 22 di queste famiglie aveva dimostrato che nessuna di queste presentava probabilmente mutazioni *BRCA1*.

Ulteriori e recenti studi genetici hanno localizzato un nuovo gene, chiamato *BRCA2*, sul cromosoma 13q12-13 (Wooster *et al.*, 1994). Il gene *BRCA2* è associato ad un alto rischio di insorgenza precoce di carcinoma mammario femminile, simile a quello già osservato nelle famiglie con mutazioni *BRCA1*. Diversamente da quanto osservato per questo ultimo gene, il *BRCA2* è associato ad un rischio più elevato di carcinoma mammario maschile e ad un minor rischio di carcinoma ovarico.

Come tradurre in termini clinici queste nuove scoperte? È tempo di offrire test genetici per le mutazioni di *BRCA1* a tutte le donne con anamnesi familiare per tumore o a tutte le pazienti con un carcinoma mammario diagnosticato recentemente per identificare sia le donne che presentano queste mutazioni sia i loro familiari a rischio? Anche se l'eterogeneità di tutte le possibili mutazioni del gene *BRCA1* richiede ulteriori studi genetico-epidemiologici, è possibile che nel prossimo futuro siano disponibili test genetici con sufficiente specificità e sensibilità.

Tuttavia, non sono solo gli aspetti tecnici a fornire una barriera all'impiego generalizzato di questi test. Occorre anzitutto considerare che esiste ancora una profonda incertezza relativamente all'approccio terapeutico per quelle donne che risultino affette da queste mutazioni. Infatti, in donne di età giovane non vi sono dati certi che l'impiego di esami mammografici regolari, associati ad autopalpazione del seno ed esame obiettivo eseguito da un medico, abbia ridotto il rischio di morire per carcinoma mammario. Anche l'impiego della mastectomia profilattica (o della ovariectomia profilattica, dato che le donne che presentano mutazioni del gene *BRCA1* sono ad alto rischio di sviluppare un carcinoma ovarico) non offre una sicurezza assoluta, data la possibilità che una mutazione genetica sia presente nel tessuto mammario circostante (o nel peritoneo). Un altro aspetto da considerare riguarda quelle famiglie ritenute ad alto rischio (tab. I) di predisposizione al carcinoma della mammella nelle quali la presenza di un'alterazione genetica appare altamente probabile, ma nelle quali non esiste alcuna evidenza molecolare. Per tutti questi motivi, i test genetici sono ancora oggi da ritenersi area di ricerca e non di clinica quotidiana ed è essenziale che alle famiglie sottoposte a questi test venga offerto un adeguato supporto medico, genetico e psicologico sia prima che dopo l'esecuzione di questi esami.

TAB. I. STIME DEL RISCHIO DI MANIFESTARE CLINICAMENTE UN CARCINOMA MAMMARIO (O ALTRE NEOPLASIE) PER I MEMBRI DI FAMIGLIE AD ALTO RISCHIO

Alterazione genetica	Sesso	Stima del rischio*
<i>BRCA1</i>	Femminile	Carcinoma mammario: 87% Carcinoma mammario bilaterale: 65% Carcinoma ovarico: 40-60%
<i>BRCA1</i>	Maschile	Carcinoma mammario: quasi nullo Carcinoma del colon e della prostata: 6-8%
<i>BRCA2</i>	Femminile	Carcinoma mammario: 87% Carcinoma ovarico: 15-20%
<i>BRCA2</i>	Maschile	Carcinoma mammario: 6% Altre neoplasie: in fase di valutazione

* Durante il corso di una vita media normale, cioè entro l'età di 80 anni.
NB I membri che hanno dimostrato di non essere portatori di mutazioni hanno un rischio equivalente a quello della popolazione generale.

Attualmente, circa il 30% delle famiglie con anamnesi di carcinoma della m. presentano criteri indicativi di mutazioni ereditarie in un gene autosomico dominante, ma non hanno mutazioni identificabili di *BRCA1* e non vi è evidenza di *linkage* con *BRCA2* (Hoskins *et al.*, 1995). Si presume pertanto che queste famiglie presentino in realtà mutazioni in geni simili, che però non sono stati ancora localizzati o isolati. Inoltre, altre mutazioni genetiche sono associate a predisposizione per il carcinoma della mammella (tab. II). Queste sindromi sono spesso riconoscibili come risultati di altre manifestazioni cliniche e, con la possibile eccezione della sindrome di Li-Fraumeni (v. LI-FRAUMENI, SINDROME DI*), sono responsabili solo di un numero limitato di carcinomi mammari nella popolazione generale. Data la rarità di queste sindromi e la necessità di un approccio terapeutico adeguato delle condizioni associate, è raccomandabile che i membri di queste famiglie siano seguiti in centri appropriati per valutazione, test e *counseling* genetico.

Alcuni lavori recenti (Struwing *et al.*, 1997; Couch *et al.*, 1997; Krainer *et al.*, 1997), pur confermando il ruolo delle mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* nello sviluppo del carcinoma della m., mettono in discussione l'uso del test genetico che non andrebbe utilizzato come *screening* preventivo per queste mutazioni poiché il suo valore sembra essere solo relativo, e comunque necessita di ulteriori approfondimenti.

Un altro lavoro (Schrage *et al.*, 1997), analizzando i potenziali benefici in termini di aspettativa di vita degli interventi di mastectomia e ovariectomia preventivi nelle pazienti con mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, ha verificato l'esistenza di un vantaggio significativo solo per la mastectomia preventiva.

TAB. II. CONDIZIONI GENETICHE RARE ASSOCIATE AD UN RISCHIO AUMENTATO DI CARCINOMA MAMMARIO

	Manifestazioni cliniche	Mutazione genetica
Sindrome di Li-Fraumeni	Carcinoma mammario, sarcoma, tumori cerebrali, leucemia, carcinoma adrenocorticale	<i>p53</i>
Malattia di Cowden	Lesioni mucocutanee multiple, vitiligine, angiomi, malattia proliferativa benigna di vari organi, carcinoma mammario, carcinoma tiroideo, neoplasie del colon, amartoma	non nota
Sindrome di Muir-Torre	Neoplasie del tratto gastroenterico, della cute, del sistema genito-urinario, neoplasie benigne e maligne della mammella	<i>MSH2</i> , <i>MLH1</i>
Sindrome di Peutz-Jeghers	Poliposi gastro-intestinale, neoplasie del tratto gastroenterico, della mammella, utero, ovario, testicolo	non nota
Atassia-telangiectasia*	Atassia cerebellare, telangiectasia cutanea, ipersensibilità a radiazioni, leucemia, carcinoma mammario, tumori solidi	<i>ATM</i>

* Malattia autosomica recessiva.

Segnaliamo infine il gene *HER2* (o *ErbB2*) che, in alcuni tumori della m., determina frequentemente la iperproduzione della proteina corrispondente *HER2* (o *ErbB*) che assume notevole importanza nello sviluppo di tali tumori.

È stato recentemente preparato un anticorpo (Herceptin®) che si lega alla proteina *HER2* (o *ErbB2*) (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**, col. **4200), sembra con prospettive molto interessanti.

Bibliografia

- Collins F. S., *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 186.
 Couch F. J., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (20), 1409-1415.
 Futreal P. A., Liu Q., Shattuck-Eidens D., *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 120.
 Hall J. M., Lee M. K., Newman B., *et al.*, *Science*, 1990, **250**, 1684.
 Hoskins K. F., Stopfer J. E., Calzone K. A., *et al.*, *JAMA*, 1995, **273**, 577.
 Krainer M., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (20), 1416-1421.
 Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 66.
 Savitsky K., *et al.*, *Science*, 1995, **268**, 1749-1753.
 Schrag D., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (20), 1465-1471.
 Struwing J. P., Abeliovich D., Peretz T., *et al.*, *Nature Genetics*, 1995, **11**, 198.
 Struwing J. P., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (20), 1401-1408.
 Wooster R., Neuhausen S. L., Mangion J., *et al.*, *Science*, 1994, **265**, 2088.
 Wooster R., Stratton M. R., *TIG*, 1995, **11**, 3.

ALESSANDRO M. GIANNI E GIANNI BONADONNA

PROGNOSI DEL CANCRO DELLA MAMMELLA NELLE DONNE GIOVANI

Alcuni studi epidemiologici condotti negli Stati Uniti e in altri paesi indicherebbero un eccesso di mortalità per carcinoma della m. in donne in cui la neoplasia sia stata diagnosticata ad una età giovane (cioè al di sotto dei 40-45 anni) in confronto a donne in cui la neoplasia si è sviluppata in età più avanzata. Questi studi tuttavia non sono stati in grado di spiegare se questo eccesso di mortalità fosse dovuto semplicemente alla mancanza di cause competitive di morte nelle donne giovani o a caratteristiche particolari della neoplasia in questo gruppo di pazienti, le quali potrebbero potenzialmente presentare forme tumorali più aggressive.

Uno studio recentemente condotto utilizzando i dati del Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program ha confermato che la probabilità di morire per carcinoma mammario entro 5 anni dalla diagnosi è più elevata nelle donne di età giovane (26,4% per le donne di razza bianca con neoplasia diagnosticata tra i 20 e i 29 anni; 20,1% nelle pazienti con neoplasia diagnosticata tra i 30 e 39 anni di età) e tende a diminuire con l'avanzare dell'età (Swanson *et al.*, 1994). Questo studio ha anche confermato che la probabilità di morire per cause non correlate al carcinoma mammario tende ad aumentare nelle donne di età superiore od uguale a 60 anni ed è significativamente più elevata dopo i 70 anni.

Le neoplasie mammarie diagnosticate prima di 40 anni rappresentano circa il 7% dei carcinomi mammari nelle donne bianche. In questa percentuale relativamente limitata di pazienti sono stati condotti sinora solo pochi studi per valutare i possibili fattori prognostici che pongono queste donne ad un elevato rischio di morte.

Recentemente, i ricercatori dell'Università di San Antonio nel Texas (Albain *et al.*, 1994) hanno valutato la correlazione tra fattori prognostici e gruppi di età in 8.738 pazienti. Le pazienti di età più giovane presentavano generalmente una più elevata frequenza di fattori prognostici negativi e una sopravvivenza a 5 anni inferiore rispetto alle pazienti di altre classi di età. Tuttavia, quando la probabilità di sopravvivenza è stata corretta per i fattori prognostici, le percentuali di sopravvivenza presentavano solo minime

TAB. III. CLASSI DI ETÀ, FREQUENZA DI FATTORI PROGNOSTICI SFAVOREVOLI E SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI
(Modificata da Albain *et al.*, 1994)

Classi di età	≥ 4 linfonodi %	T > 5 cm %	RE-negativi %	Sopravvivenza %
<i>Pazienti con linfonodi positivi</i>				
< 30 anni	73	38	55	41* 64**
30-35 anni	53	23	50	60 69
35-40 anni	55	27	37	62 73
40-45 anni	48	19	34	73 65
45-50 anni	51	19	28	69 70
> 50 anni	48	17	19	65 52
<i>Pazienti con linfonodi negativi</i>				
< 30 anni		13	55	82* 89**
30-35 anni		9	46	85 85
35-40 anni		6	41	84 87
40-45 anni		6	42	86 87
45-50 anni		6	35	85 87
> 50 anni		5	18	85 83

* non corretta per fattori prognostici; ** corretta per fattori prognostici; RE-negativi: recettori ormonali per l'estradiolo assenti.

variazioni. La tab. III riassume i risultati di questo studio suddivisi per pazienti con linfonodi ascellari positivi e negativi.

Un altro studio americano condotto in 980 pazienti (Fowble *et al.*, 1994), trattate con chirurgia conservativa e radioterapia mammaria ed eventuale terapia sistemica adiuvante, ha confermato i risultati riportati dai ricercatori di San Antonio soltanto per le pazienti che presentavano linfonodi ascellari positivi. Le pazienti giovani con linfonodi ascellari positivi non solo presentavano una sopravvivenza significativamente inferiore anche quando corretta per fattori prognostici, ma anche un elevato rischio di riprese locali di malattia. Tuttavia, il limitato numero di pazienti con età ≤ 35 anni non ha permesso un'adeguata valutazione di questo rischio.

I dati riportati in questi due studi suggeriscono pertanto che la diversa prognosi tra donne giovani e donne più anziane è probabilmente attribuibile ad un diverso profilo prognostico e non all'età di per sé. Sono tuttavia necessari ulteriori studi su questo argomento su più ampie casistiche così come sono necessarie nuove ricerche per meglio comprendere la reale correlazione tra fattori prognostici sfavorevoli e classi di età.

Bibliografia

- Adami H., Molker B., Holmberg L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1986, 315, 559.
 Albain K. S., Allred D. C., Clark G. M., *Monogr. Natl. Cancer Inst.*, 1994, 16, 35.
 Fowble B. L., Schultz D. J., Overmayer B. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1994, 30, 23.
 Swanson G. M., Liu C. S., *Monogr. Natl. Cancer Inst.*, 1994, 16, 69.

ALESSANDRO M. GIANNI E GIANNI BONADONNA

TERAPIA MEDICA DEL CANCRO DELLA MAMMELLA

Il progresso nel settore del trattamento farmacologico del carcinoma mammario è avvenuto utilizzando i risultati di studi clinici controllati, impostati su quesiti biologici precisi e condotti in modo rigoroso. L'efficacia della polichemio-

terapia e dell'endocrinoterapia nelle pazienti ad alto rischio di micrometastasi dopo chirurgia e, più recentemente, l'utilità di una chemioterapia primaria per aumentare la frequenza di interventi chirurgici conservativi hanno rivoluzionato gli scopi e i risultati della terapia medica.

Endocrinoterapia

Prima dell'avvento della moderna polichemioterapia il trattamento endocrino rappresentava praticamente l'unica vera forma di terapia medica per il carcinoma mammario in fase avanzata. Oggi l'impiego dell'endocrinoterapia è divenuto più selettivo se si conosce lo stato dei recettori ormonali per l'estradiolo (RE) e il progesterone (RP). La risposta terapeutica è variabile dal 20% all'80% dei casi e dipende soprattutto dal livello del recettore, espresso in fentomoli per milligrammo di proteina. Regressioni tumorali parziali o complete si osservano in oltre i due terzi dei casi quando entrambi i recettori sono positivi. La risposta al trattamento endocrino è più frequente nei tumori a lenta evoluzione, cioè con recidiva del carcinoma dopo un intervallo libero dalla chirurgia superiore a due anni e con metastasi alle parti molli (cute, linfonodi, m.) o allo scheletro. In generale, se la neoplasia è regredita dopo un primo trattamento endocrino ha molte possibilità di rispondere a un secondo trattamento ormonale quando il primo cessa di essere efficace.

Dei vecchi trattamenti endocrini di tipo chirurgico, o sottrattivo, è sopravvissuta solo l'*ovariectomia*. In realtà anche l'*ovariectomia* può essere efficacemente sostituita dall'endocrinoterapia additiva, cioè costituita da nuovi farmaci. Fra gli antiestrogeni, il *tamoxifene* (v.; v.***) è il composto più frequentemente utilizzato nella pratica clinica. Somministrabile per bocca, è molto maneggevole e poco tossico.

Fra gli ormoni pituitarici, il *goserelin* presenta il vantaggio, rispetto agli altri analoghi dell'LHRH, di richiedere una sola somministrazione mensile per via sottocutanea a spese di effetti collaterali modesti.

Altri farmaci utili nella terapia endocrina del carcinoma mammario sono i *progestinici* e gli *inibitori dell'aromatasi*.

MAMMELLA

TAB. IV. RIDUZIONE ANNUALE (% $\pm$ DS) DEL RISCHIO DI MORTE PER CARCINOMA MAMMARIO: RISULTATI A 10 ANNI DELLA META-ANALISI

(Dati dell'Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1992)

	< 50 anni	$\geq$ 50 anni
Solo polichemioterapia vs. non trattamento sistemico	27 $\pm$ 6	14 $\pm$ 5
Chemioterapia + tamoxifene vs. chemioterapia	3 $\pm$ 5	20 $\pm$ 4
Tamoxifene per $\geq$ 2 anni vs. non trattamento sistemico	[17 $\pm$ 10]*	19 $\pm$ 3
Chemioterapia + tamoxifene vs. tamoxifene	[6 $\pm$ 23]*	10 $\pm$ 7

* [] deviazione standard $\geq$ 9 = risultati statisticamente variabili.

Tra questi ultimi, l'*aminoglutetimide* (v. *) rimane il composto più ampiamente utilizzato, in grado di ottenere globalmente remissioni complete e parziali nel 30-40% delle pazienti in postmenopausa con localizzazioni alle parti molli e scheletriche. Il *4-idrossi-androstenedione* (Lentaron®) possiede una elevata selettività d'azione sull'aromatasi, con scarsa biodisponibilità per via orale (a causa dell'accelerato metabolismo epatico) che ha reso necessaria la formulazione per via parentale da somministrare due volte al mese. Plomestano ed examestano sono inibitori di seconda generazione, con potenziale elevata biodisponibilità per via orale, attualmente ancora in fase di valutazione clinica. Degli inibitori non-steroidi, soltanto due di terza generazione sono attualmente disponibili per uso clinico: il letrozolo (Femara®) e l'anastrozolo (Arimidex®). Questi composti garantiscono una prolungata inibizione periferica dell'aromatasi, nonostante la loro rapida *clearance* plasmatica. Nessuno dei nuovi inibitori ha la tossicità dell'aminoglutetimide. Gli effetti indesiderati più importanti sono i disturbi gastroenterici di modesta entità e le vampate di calore, registrati in circa un quarto delle pazienti trattate. Uno dei vantaggi di questi farmaci, nei confronti dei progestinici, è rappresentato dalla ridotta influenza sul peso corporeo, anche per trattamenti di lunga durata.

Malgrado i numerosi studi effettuati negli ultimi anni e qualche risultato promettente in termini di percentuale di regressione, non esiste una sicura evidenza che l'associazione di più ormoni (poliendocrinoterapia) sia in grado di migliorare il controllo a lungo termine del carcinoma mammario in fase avanzata.

L'*endocrinoterapia adiuvante* è oggi una realtà clinica soprattutto mediante la somministrazione per due o più anni dell'antiestrogeno tamoxifene. Nelle pazienti con linfonodi ascellari istologicamente positivi, la riduzione di mortalità per carcinoma mammario a 10 anni dall'intervento chirurgico è circa 20% nelle pazienti in postmenopausa (tab. IV). Questo effetto terapeutico è assai meno pronunciato nello stesso gruppo di pazienti con basso contenuto di RE. Quindi per poter assicurare il massimo beneficio terapeutico è consigliabile limitare la somministrazione di tamoxifene adiuvante alle pazienti con recettori endocrini positivi.

Chemioterapia

Nel carcinoma mammario, come in altre neoplasie, la chemioterapia è sviluppata e applicata soprattutto per trattare la neoplasia metastatica. Su questa base, all'inizio degli anni '70, è stata impostata la strategia terapeutica delle micrometastasi (chemioterapia adiuvante; v. sotto) nelle pazienti ad alto rischio di ricaduta dopo trattamento loco-regionale. Negli ultimi anni il trattamento farmacologico antitumorale è stato utilizzato quale primo evento terapeutico (chemioterapia primaria o neoadiuvante) per ridurre il volume tumorale e consentire quindi una mastectomia nei carcinomi localmente in fase avanzata (T4) o un intervento chirurgico conservativo (quadrantectomia, tumorectomia) nelle neoplasie con diametro fra 3 e 7 centimetri.

La tab. V presenta gli schemi polichemioterapici di più frequente impiego nel trattamento del carcinoma mammario, a prescindere dallo stadio clinico o patologico. L'utilizzo appropriato di questi trattamenti richiede considerevole esperienza. Infatti al fine di ottenere il risultato terapeutico ottimale è indispensabile somministrare i farmaci con un'elevata intensità di dose senza produrre effetti collaterali gravi se non irreversibili. Tra i farmaci indicati il mitoxantrone (Novantrone®; v. TUMORI**) è quello meno frequentemente associato a vomito e caduta (reversibile) dei capelli, eventi molto importanti per la qualità di vita delle pazienti. La mielodepressione, in particolare la leucopenia, è un evento comune a tutti gli schemi terapeutici

TAB. V. SCHEMI DI POLICHEMIOTERAPIA

	Farmaci	Dosi e via di somministrazione	Intervallo
CMF standard	Ciclofosfamide Metotressato Fluorouracile	100 mg/m ² per os 1° → 14° giorno 40 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 600 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno	ogni 28 giorni
CMF e.v.	Ciclofosfamide Metotressato Fluorouracile	600 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 40 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 600 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno	ogni 28 giorni
FAV	Fluorouracile Adriamicina Ciclofosfamide	500 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 50 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 500 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno	ogni 21 giorni
FFC	Fluorouracile Epirubicina Ciclofosfamide	500 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 75 mg/m ² e.v. 1° giorno 500 mg/m ² e.v. 1° giorno	ogni 21 giorni
FNC	Fluorouracile Novantrone® (mitoxantrone) Ciclofosfamide	500 mg/m ² e.v. 1° e 8° giorno 10 mg/m ² e.v. 1° giorno 500 mg/m ² e.v. 1° giorno	ogni 21 giorni

indicati, ma forse un poco più frequente dopo mitoxantrone rispetto all'epirubicina (v.*). L'amenorrea indotta da ciclofosfamide è frequente e sovente irreversibile se l'età della paziente è ≥ 40 anni.

Gli effetti collaterali più temibili sono quelli a distanza e quindi riscontrabili nelle pazienti lungo sopravvivenze. In pazienti adulte, non preirradiate sul torace e senza aritmia cardiaca in atto, la manifestazione clinica di miocardiopatia da farmaci è oggi un evento molto raro ($\leq 1\%$), purché il dosaggio cumulativo non superi la dose rischio. Una somministrazione prolungata nel tempo di farmaci alchilanti, quali la ciclofosfamide, può essere cancerogena e quindi indurre la comparsa di secondi tumori, in particolare la leucemia acuta non linfoblastica. Questo rischio è ovviamente importante nelle pazienti sottoposte a chemioterapia adiuvante. Come è stato ampiamente dimostrato nella vasta casistica dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano, seguita per oltre 10 anni, dopo 6-12 cicli di CMF adiuvante il rischio di cancerogenesi indotta dalla chemioterapia è minimo e, in ogni caso, non superiore a quello delle pazienti trattate con sola chirurgia.

Nel carcinoma in fase localmente avanzata o clinicamente metastatizzata la polichemioterapia è indicata quando esiste rapida evoluzione della malattia, stato recettoriale negativo o resistenza a un pregresso trattamento endocrino. Gli schemi terapeutici segnalati nella tab. V inducono risposte terapeutiche equivalenti. Le regressioni tumorali misurabili alla palpazione o mediante immagini radiologiche variano dal 50 al 75%; la percentuale di risposta dipende soprattutto dalla massa neoplastica globale, cioè dal numero di sedi anatomiche interessate. Le remissioni cliniche complete non superano il 20-25% dei casi responsivi. La durata mediana della risposta oscilla tra 7 e 10 mesi; la sopravvivenza mediana dall'inizio della chemioterapia non è quasi mai superiore a 18-20 mesi. Tra gli schemi di recente impiego, va segnalata l'associazione di adriamicina (60 mg/m² per via endovenosa a bolo) e taxolo (200 mg/m² per infusione endovenosa di 3 ore) ogni tre settimane (v. anche TAXANI**). Nelle pazienti non pretrattate con chemioterapia, l'esperienza iniziale dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano è assai favorevole: risposte obiettive in circa il 90% dei casi con un'elevata (circa 40%) frequenza di remissioni complete. Tuttavia, l'associazione ha un elevato rischio di cardiotoxicità, soprattutto se si superano dosi cumulative di 360 mg/m² di adriamicina, e quindi le pazienti in trattamento necessitano di un accurato monitoraggio cardiologico.

Anche recenti tentativi con alte dosi di chemioterapia seguiti da trapianto di midollo osseo autologo o da reinfusione di progenitori emopoietici circolanti, pur aumentando la percentuale di remissioni cliniche complete, non sono stati in grado di dimostrare un significativo prolungamento della remissione e della sopravvivenza globale nel trattamento del carcinoma mammario in fase avanzata.

Chemioterapia adiuvante

Il trattamento chemioterapico adiuvante nelle pazienti con alto rischio di malattia micrometastatizzata, al momento dell'intervento chirurgico, ha costituito negli ultimi 25 anni l'evento recente più significativo di tutta la terapia del carcinoma mammario. La strategia del trattamento combinato (chirurgia → chemioterapia) è fondata su solidi principi biologici e farmacologici. Brevemente, si ritiene che le micrometastasi contengano una percentuale minima di cellule geneticamente farmaco-resistenti e siano quindi più vulnerabili a dosi ottimali di chemioterapici rispetto alle macro-metastasi, nelle quali la quota di cellule farmaco-resistenti è sempre assai elevata (Bonadonna, 1992). Dal punto di vista

strettamente clinico, il trattamento multidisciplinare del carcinoma mammario operabile si basa essenzialmente sul concetto che esistono micrometastasi disseminate nel 75% dei casi con linfonodi ascellari positivi e in circa il 25% quando i linfonodi sono negativi. Le moderne sperimentazioni terapeutiche controllate prendono avvio all'inizio degli anni '70 con il *National Surgical Adjuvant Breast Project* in USA (programma melfalan) e l'Istituto Nazionale Tumori di Milano (programma CMF) (Bonadonna *et al.*, 1995). L'efficacia terapeutica della chemioterapia adiuvante è stata confermata nel 1992 da una revisione internazionale condotta dall'*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (tab. IV). Questa revisione ha confermato che il trattamento medico adiuvante postoperatorio è in grado di ridurre significativamente a 10 anni il rischio di ricaduta di malattia, soprattutto se viene impiegata una polichemioterapia tipo CMF o, come dimostrato dagli studi condotti all'Istituto Nazionale Tumori di Milano, con un adeguato trattamento sequenziale con antraciclina e CMF (tab. VI).

Per quanto riguarda la sopravvivenza globale, i risultati delle prime sperimentazioni hanno messo in evidenza un netto vantaggio della chemioterapia nelle pazienti in premenopausa. Studi recenti, in cui si è prestata maggior attenzione alla somministrazione di adeguata intensità di dose per i vari farmaci, hanno dimostrato che in realtà i risultati terapeutici fra pre- e postmenopausa sono sovrapponibili.

All'inizio degli anni '90 non esistono ancora risultati definitivi in merito alla superiorità dell'associazione di chemio-ormonoterapia nei confronti della sola chemioterapia o della sola ormonoterapia. Infatti, se un beneficio è evidente nelle pazienti in postmenopausa, il vantaggio è meno certo per le pazienti in premenopausa (tab. IV). Dal momento che la popolazione neoplastica è eterogenea, nel senso che è sovente costituita da una commistione di cellule

TAB. VI. RISULTATI A 10 ANNI DEGLI STUDI RANDOMIZZATI CONDOTTI PRESSO L'ISTITUTO NAZIONALE TUMORI DI MILANO IN PAZIENTI CON LINFONODI ASCELLARI POSITIVI

(Bonadonna *et al.*, 1995)

	Sopravvivenza libera da malattia %	Sopravvivenza globale %
Linfonodi 1-3		
Solo chirurgia	38	53
vs.		
CMF standard (12 cicli)	51	60
CMF c.v.*	59	75
vs.		
CMF c.v.** → Adriamicina	57	75
Linfonodi > 3		
Solo chirurgia	20	33
vs.		
CMF standard (12 cicli)	30	44
Adriamicina → CMF**	42	58
vs.		
CMF c.v. alternato con Adriamicina	28	44

* 12 somministrazioni ogni 3 settimane

** 8 somministrazioni ogni 3 settimane

recettore-positivo e recettore-negativo, a rapida e lenta velocità di moltiplicazione, la somministrazione di chemioterapia e ormonoterapia potrebbe risultare più efficace e sono quindi necessari ulteriori studi randomizzati per dirimere questo aspetto.

Per quanto riguarda le pazienti con linfonodi ascellari istologicamente negativi, l'indicazione a una terapia medica adiuvante di routine rimane in parte controversa, in quanto un'elevata percentuale di pazienti (70-75%) potrebbe essere considerata guarita, a 5 anni dall'intervento, con il solo trattamento loco-regionale. Occorre quindi informare con tatto le pazienti sul possibile rischio di nuove manifestazioni di neoplasia in base a semplici indicatori prognostici. La presenza di due o più indicatori prognostici sfavorevoli, come semplificato nella tab. VII, può favorire l'indicazione a una polichemioterapia adiuvante tipo CMF. I dati finora segnalati da vari centri oncologici hanno confermato a 5 e più anni la validità del trattamento chemioterapico adiuvante nei sottogruppi di pazienti ad alto rischio di recidiva. La somministrazione di tamoxifene adiuvante per 2 o più anni nelle pazienti con linfonodi ascellari negativi può essere giustificata solo dalla presenza di positività recettoriale. Il vantaggio terapeutico esiste soprattutto nella sopravvivenza libera da malattia, anche se la differenza, tra gruppo trattato e non, è modesta.

Da un punto di vista pratico, la chemioterapia adiuvante va iniziata entro 2-3 settimane dall'intervento chirurgico controllando il livello dei leucociti e delle piastrine circolanti lo stesso giorno della somministrazione endovenosa dei farmaci. L'endocrinoterapia con tamoxifene può essere iniziata dopo qualche giorno dall'intervento chirurgico. Le pazienti devono essere visitate mensilmente durante tutta la durata del trattamento chemioterapico, quindi ogni 6 mesi per i primi 5 anni e successivamente ogni anno.

Durante il primo anno gli esami radiologici di controllo consistono nella radiografia del torace e in quella dello scheletro (o scintigrafia ossea) ogni 6-8 mesi. A partire dal quarto anno gli esami radiologici vanno eseguiti ogni 12 mesi compresa la mammografia della m. controlaterale o la mammografia bilaterale nelle pazienti sottoposte ad approccio conservativo.

Nel sospetto o in presenza di ripresa di malattia, deve essere fatto ogni ragionevole sforzo per documentare accuratamente (anche con biopsia) la sede e l'entità della metastatizzazione. Il tipo di trattamento secondario dipende in gran parte dallo stato dei recettori per l'estradiolo determinati al momento dell'intervento chirurgico. Se questi sono negativi e l'intervallo fra il termine della terapia adiuvante e la manifestazione clinica di metastasi è maggiore di 12 mesi si può utilizzare ancora la chemioterapia iniziale ottenendo risposte obiettivamente in circa il 30-50% dei casi. Se invece l'intervallo è inferiore a 12 mesi è opportuno utilizzare una polichemioterapia con farmaci non cross-resistenti.

Una nuova classe di composti chimici che potrebbero svolgere un ruolo nel trattamento adiuvante del carcinoma mammario è rappresentata dai bifosfonati. Questi farmaci, dotati di spiccata attività nelle malattie osteolitiche dell'osso, potrebbero infatti rivestire un ruolo ancor più rilevante dell'attuale, come trattamento adiuvante nel carcinoma mammario. In particolare, un recente studio randomizzato (Diel *et al.*, 1998) ha dimostrato che il trattamento con clodronato (a dosaggio nella maggior parte delle pazienti ad una chemio o ormonoterapia adiuvante) è in grado di ridurre l'incidenza e il numero di nuove metastasi ossee ottenendo un significativo prolungamento della sopravvivenza di pazienti operate per carcinoma mammario ad alto rischio di recidiva.

Chemioterapia primaria

La terapia combinata con chemioterapia primaria (neoadiuvante) rappresenta oggi quasi ovunque il trattamento di elezione nelle pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato. Il trattamento farmacologico iniziale comprende quasi sempre una combinazione contenente adriamicina (o epirubicina), tipo FAC (fluorouracile, adriamicina, ciclofosfamide) o FEC (fluorouracile, epirubicina, ciclofosfamide), oppure CMF (ciclofosfamide, metotressato, fluorouracile), per via endovenosa per 3-4 cicli mensili. La percentuale di risposte obiettive (50-80%) varia soprattutto in rapporto alla massa tumorale, ma in genere le remissioni clinico-mammografiche complete non superano il 20%.

Nelle pazienti con carcinoma mammario non infiammatorio, la chemioterapia primaria viene seguita da un intervento chirurgico con dissezione ascellare completa e quindi da una radioterapia loco-regionale postoperatoria, oppure dalla sequenza inversa, o dalla sola radioterapia. L'intervento chirurgico consiste generalmente nella mastectomia radicale modificata. Il reperto anatomico-patologico evidenzia quasi sempre residui ascellari e solo in circa il 5% di questi tumori è documentabile una remissione istopatologica completa. Dopo il completamento della terapia loco-regionale è consigliabile somministrare un trattamento chemioterapico postoperatorio per circa 6 mesi, seguito da un eventuale endocrinoterapia (tamoxifene per almeno 2 anni) specie in presenza di RE+.

Le pazienti con carcinoma infiammatorio (T4_d) hanno prognosi ancora peggiore di quelle con stadio T4_{bc}. Il trattamento di scelta in questa forma aggressiva di neoplasia è costituito dalla chemioterapia primaria comprendente adriamicina o epirubicina. Molti oncologi medici preferiscono aggiungere anche un corticosteroide al trattamento citotossico. La percentuale di risposte obiettive varia tra il 50 e l'80%. Ottenuta la massima regressione tumorale con la chemioterapia primaria, il trattamento loco-regionale è ancora oggi rappresentato dalla radioterapia; l'intervento chirurgico può essere eseguito solo in casi molto ben selezionati. Non è tuttora ben definito l'approccio consigliabile dopo il trattamento loco-regionale. Teoricamente sarebbe logico somministrare una polichemioterapia non cross-resistente per 3-5 cicli nel tentativo di ridurre o dilazionare la comparsa di nuove manifestazioni di neoplasia. È certo, pur in assenza di studi randomizzati, che una terapia medica intensiva è in grado di migliorare la sopravvivenza globale delle pazienti con carcinoma infiammatorio.

La terapia combinata con chemioterapia primaria nelle pazienti con carcinoma mammario operabile rappresenta una nuova strategia terapeutica il cui scopo iniziale è quello di sostituire un intervento chirurgico mutilante, quale la mastectomia radicale modificata, con un intervento chirurgico conservativo (ad es. *quadrantectomia*) nelle pazienti in cui la dimensione del tumore primario (3-5 cm) può rappresentare un fattore di rischio elevato per recidive locali dopo sola chirurgia conservativa o in cui la dimensione del tumore primario rende tecnicamente non eseguibile l'intervento conservativo. Dati recenti dell'Istituto Tumori di Milano hanno confermato che l'intervento chirurgico conservativo dopo chemioterapia primaria può essere eseguito in circa l'85% delle pazienti altrimenti candidate ad un intervento chirurgico mutilante. Questo risultato terapeutico può essere ottenuto con vari schemi terapeutici (CMF, FAC, FEC, FNC, sola adriamicina a 75 mg/m² ogni 3 settimane, sola epirubicina a 120 mg/m² ogni 3 settimane) a prescindere dallo stato menopausale, recettoriale e citoproliferativo.

TAB. VII. LINEE GUIDA PRINCIPALI PER I TRATTAMENTI FARMACOLOGICI ADIUVANTI

Linfonodi ascellari	Stato menopausale	Recettori ormonali	Attività proliferativa	Terapia medica consigliata
0	Pre e post	Positivi	Bassa	Nessuna se T ≤ 2 cm
	Pre	Positivi	Alta	CMF per 6 cicli mensili
	Post	Positivi	Alta	CMF per 6 cicli mensili seguito da tamoxifene per 2-5 anni
1-3	Pre e post	Negativi	Indifferente	CMF per 6 cicli mensili
	Pre	Indifferenti	Indifferente	CMF per 6 cicli mensili
	Post	Positivi	Bassa	Tamoxifene per 2-5 anni
	Post	Positivi	Alta	CMF per 6 cicli mensili seguito da tamoxifene per 2-5 anni
> 3	Pre	Indifferenti	Indifferente	Chemioterapia intensiva (antraciclina seguita da CMF)
	Post	Positivi	Indifferente	Antraciclina → CMF seguiti da tamoxifene per 2-5 anni
	Post	Negativi	Indifferente	Antraciclina → CMF

Dopo chemioterapia primaria, l'entità della regressione della neoplasia è inversamente proporzionale alle dimensioni cliniche iniziali del tumore primario, ma la quadrantectomia è stata tecnicamente eseguibile anche in più del 60% delle pazienti con tumore > 5 cm alla diagnosi. In circa il 3% delle pazienti il reperto istopatologico ha evidenziato una regressione completa della neoplasia sia a livello mammario che dei linfonodi ascellari, mentre la presenza di microfocoli neoplastici residui è un reperto relativamente frequente dopo chemioterapia primaria adeguata.

L'intervento chirurgico conservativo, con dissezione completa dei linfonodi ascellari e seguito da radioterapia postoperatoria sulle porzioni residue della mammella, è in grado di ottenere un buon risultato estetico, specialmente se il diametro massimo della neoplasia iniziale è ridotto a 3 cm o meno al controllo mammografico preoperatorio. A circa 6 anni dall'intervento chirurgico conservativo il rischio di ripresa locale è inferiore al 6% (Bonadonna e Valagussa, 1996).

Risultati simili sono stati ottenuti anche da altri ricercatori. Tuttavia, la chemioterapia primaria seguita dall'intervento chirurgico conservativo e dalla radioterapia mammaria rimane ancora oggi un trattamento sperimentale *per quanto concerne i risultati in termini di sopravvivenza libera da malattia e di sopravvivenza globale*. Occorre infatti valutare adeguatamente un'integrazione ottimale tra chemioterapia primaria e terapia farmacologica postoperatoria nelle pazienti a rischio di ripresa della neoplasia perché la preservazione dell'integrità corporea sia associata a un ulteriore reale miglioramento della sopravvivenza nei confronti di strategie terapeutiche convenzionali.

Strategia terapeutica globale

Le tabb. VII e VIII riassumono schematicamente le linee strategiche generali oggi consigliabili nella pratica clinica corrente. Come si può vedere, predomina l'approccio multidisciplinare. La *chemioterapia primaria* viene inserita ogni qualvolta la dimensione del tumore superi 2,5 cm in quanto è dovere del medico cercare di preservare, ove possibile, l'integrità corporea della paziente. In linea generale, è consigliabile che la *radioterapia* venga eseguita dopo la chemioterapia postoperatoria per evitare una sommazione di effetti mielotossici. È inoltre raccomandabile determinare

sul tessuto neoplastico asportato, o sui suoi residui, tutti gli indicatori prognostici (grado istologico, stato linfonodale, recettoriale e citoproliferativo) utili a formulare la strategia postoperatoria.

TAB. VIII. LINEE TERAPEUTICHE CONSIGLIABILI IN PRESENZA DI NEOPLASIA IN APPARENTE FASE LOCO-REGIONALE

Stadio clinico o dimensione in cm	Trattamento
T1-T2 ≤ 2,5 cm	Chirurgia conservativa (quadrantectomia o tumorectomia) + Dissezione ascellare completa + Radioterapia sulla m. operata Terapia medica adiuvante in base ai fattori prognostici (tab. VII)
T2 > 2,5 cm-T3	Chemioterapia primaria per 3-4 cicli + Chirurgia conservativa (quadrantectomia o tumorectomia) + Dissezione ascellare completa + Radioterapia sulla mammella operata Terapia medica adiuvante per 3-6 cicli nelle pazienti ad alto rischio <i>oppure</i> Mastectomia semplice o radicale modificata Terapia medica adiuvante in base ai fattori prognostici (tab. VII)
T4 _(abc)	Chemioterapia primaria fino alla massima regressione tumorale + Chirurgia (conservativa o mastectomia in rapporto alla regressione ottenuta) + Dissezione ascellare completa + Terapia medica adiuvante (es. chemioterapia per 6 cicli → ormonoterapia) + Radioterapia postoperatoria (parete toracica, linfonodi mammari interni e sovraclaveari omolaterali)
T4 _(d)	Chemioterapia primaria fino alla massima regressione tumorale + Radioterapia loco-regionale + Eventuale chirurgia in casi selezionati + Terapia medica adiuvante

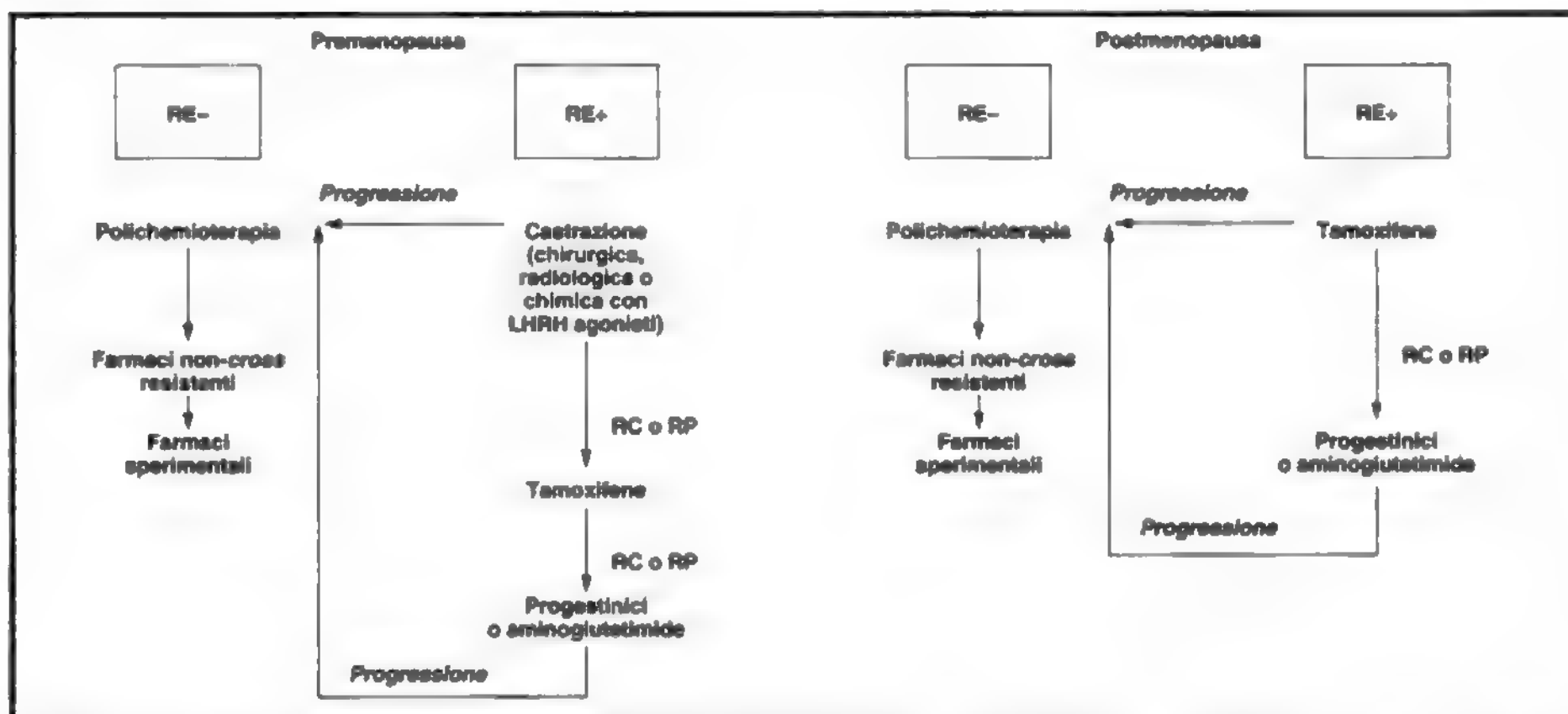


Fig. 1. Linee strategiche generali nella terapia del carcinoma mammario metastatizzato. RE) recettori per l'estradiolo; RC) regressione tumorale completa; RP) regressione parziale.

Nella tab. VII sono state riassunte le linee guida principali per la *terapia medica adiuvante*. Pur basandosi sulle conclusioni della Consensus Development Conference tenutasi nel 1985 al National Cancer Institute di Bethesda e sulla revisione internazionale, tali linee guida prendono in considerazione i risultati di studi clinici più recenti. Inoltre, per alcuni sottogruppi ad alto rischio, suggeriscono un *trattamento combinato sequenziale* con *chemioterapia* seguita da *tamoxifene*. La sequenzialità è preferibile alla somministrazione simultanea ad evitare possibili interferenze negative tra chemioterapia e ormonoterapia. Tali linee guida non escludono variazioni opportune dallo schema consigliato in casi particolari, ma tendono a scoraggiare trattamenti arbitrari, se non improvvisati, per i quali l'efficacia terapeutica e/o la tossicità non sono noti.

Nel carcinoma in fase clinicamente metastatizzata la fig. 1 schematizza le linee strategiche generali. Come si vede, il trattamento è fondato soprattutto sulla conoscenza dello stato dei recettori per l'estradiolo (RE). Come più volte ripetuto, la determinazione dei recettori consente di selezionare il trattamento iniziale in modo più adeguato. Se il RE ha un basso livello di fmo (< 10) e la malattia ha caratteri di aggressività (ad es. intervallo libero < 2 anni, metastasi epatiche massive e/o polmonari di tipo linfangitico) è opportuno somministrare sequenzialmente polichemioterapia ed endocrinoterapia. In linea generale, nelle pazienti con età ≥ 70 anni è sempre opportuno iniziare il trattamento medico con endocrinoterapia (ad es. tamoxifene) e utilizzare la chemioterapia solo quando esiste una chiara evidenza di non responsività all'ormonoterapia.

Bibliografia

- Bonadonna G., *Cancer Res.*, 1992, 52, 2127.
- Bonadonna G., *Eur. J. Cancer*, 1996, 32A, 209.
- Bonadonna G., Robustelli della Cuna G., *Medicina Oncologica*, 5 ed., 1996, Masson, Milano.
- Bonadonna G., Valagussa P., Moliterni A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995a, 332, 901.
- Bonadonna G., Valagussa P., *Semin. Oncol.*, 1995b, 23, 164.
- Bonadonna G., Zambetti M., Valagussa P., *JAMA*, 1991, 273, 342.

- Diel I. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, 357-363.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, *Lancet*, 1992, 339, 1 e 71.
- Harris J. et al., *Malignant Tumours of the Breast*, in DeVita V. T. et al., *Cancer*, 1997, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1557-1616.
- Hortobagyi G. N., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339 (14), 974-984.

ALESSANDRO M. GIANNI E GIANNI BONADONNA

CHIRURGIA [v. IX, coll. 282-304; Agg. I, coll. *4817-4836]

Premessa

Paradossalmente, le novità di maggior rilievo nel campo dei tumori della m. in questo scorcio di fine secolo sono due, ma solo una viene dai laboratori della ricerca scientifica: la scoperta del gene che predispone le componenti delle famiglie ad alta incidenza di questo tumore, a sviluppare la malattia nel corso della propria vita (v. sopra). L'altro elemento nuovo viene invece dalla cosiddetta «società civile», origina negli Stati Uniti e merita di essere raccontato perché introduce in modo molto diretto le donne stesse tra i protagonisti della lotta contro questo tumore, che per una buona parte di mondo è divenuto ormai «la malattia femminile» per eccellenza.

Ora, accade nel 1990 che si ammali di cancro al seno la suocera del Vice Presidente degli U.S.A. e che la figlia, giustamente preoccupata di fronte alla gravità della malattia, si rivolga al marito per sapere che cosa si stia davvero facendo per sconfiggere questo terribile male. Poiché gli sforzi compiuti dallo Stato e i relativi investimenti economici sembrano subito piuttosto inadeguati alla gravità della situazione, la signora in questione prese l'iniziativa di organizzare una marcia pacifica su Washington ed una vastissima raccolta di firme con invio di cartoline al Congresso per sensibilizzare i senatori sull'argomento. L'azione ebbe tale efficacia che, per la prima volta nella storia degli Stati Uniti, fu presa la decisione di tagliare una parte del bilancio federale della Difesa, trasferendo lo stesso importo al National Cancer Institute (NCI), per finanziare studi esclusivamente nel campo del carcinoma della m. Nacque così con questa iniziativa un movimento di opinione che si è andato progressivamente espandendo e che ben presto ha trovato anche in Europa il suo

continuo sviluppo.

In proposito, fa piacere notare che il movimento europeo è stato il risultato di un'iniziativa italiana, della Scuola Europea di Oncologia di Milano e che, a riconoscimento di questa originalità, esso si chiama *Europa Donna*, in italiano, in tutti i 22 Paesi che vi hanno aderito e che inviano le loro rappresentanti alla conferenza annuale (Nelson, 1994). Anche *Europa Donna* ha raccolto centinaia di migliaia di firme, depositate periodicamente presso i vari Parlamenti nazionali, e sta contribuendo con impressionante efficacia a diffondere consapevolezza, informazioni, insegnamenti che possano permettere alle donne di ogni Paese di difendersi in tempo dal più comune dei tumori (in Europa una donna su 14 ormai ne viene colpita).

La novità che viene dalla ricerca di base, invece, riguarda, come dicevamo, la possibilità di stabilire con precisione quasi assoluta se una singola donna, appartenente a una famiglia in cui il cancro al seno si è manifestato più volte, è candidata ad ammalarsi oppure no. Il test si basa sulla scoperta del gene che determina la predisposizione ad ammalarsi, identificato e descritto dall'americano Skolnick e chiamato *BRCA1* (Miki *et al.*, 1994). È molto importante precisare ancora una volta che questo test è possibile solo all'interno delle cosiddette famiglie ad alto rischio, dove cioè almeno tre parenti di primo grado si siano ammalate, e non riguarda la stragrande maggioranza della popolazione dove il tumore appare in maniera casuale.

Chemioprevenzione

Si pone comunque il problema di che cosa offrire a questi soggetti ad alto rischio e una delle possibili risposte è oggi la cosiddetta *chemioprevenzione*. L'idea di una *chemioprevenzione* dei tumori nasce dalla constatazione assai semplice che le sostanze che troviamo in natura e popolano l'ambiente in cui viviamo hanno spesso anche un loro contrario. Se esistono quindi tanti cancerogeni chimici, perché non potrebbero esistere anche degli agenti capaci di proteggerci dai tumori? Alla fine degli anni '70 comincia ancora una volta negli U.S.A. la ricerca di composti chimici capaci di bloccare il processo di cancerogenesi e di inibire la trasformazione maligna delle cellule e dei tessuti. L'attenzione si focalizza progressivamente sulla vit. A e sui suoi derivati, i *retinoidi*, poiché è noto da tempo che queste molecole sono essenziali per la differenziazione dei tessuti umani e animali e che pertanto svolgono in natura un'azione opposta a quella dei cancerogeni. È nel 1981 che si rende disponibile per la sperimentazione un retinoide, analogo sintetico della vit. A chiamato in sigla 4-HPR e con nome farmacologico *fenretinide*, dotato dell'importante capacità di concentrarsi nella ghiandola mammaria. Proprio in quell'anno, l'oncologo chirurgo italiano Veronesi pubblica sulla più autorevole rivista americana, il *New England Journal of Medicine*, la prima dimostrazione controllata e verificata della possibilità di curare i tumori al seno di piccole dimensioni senza ricorrere all'asportazione totale della mammella (Veronesi *et al.*, 1981). Accade così che proprio a Veronesi si rivolge l'industria che ha sintetizzato la fenretinide. Dopo cinque anni di studi preliminari e ricerche sulla dose ottimale per evitare la tossicità, cominciò nel 1986 uno studio che coinvolgerà quasi tremila donne operate al seno che accetteranno volontariamente di prendere ogni sera due pillole di vit. A sintetica per cinque anni. I risultati di questa ricerca tutta italiana hanno dimostrato l'efficacia protettiva della fenretinide nelle donne ancora in età fertile (l'effetto quasi scomparire con il passaggio in menopausa) non solo nei confronti del carcinoma mammario, ma anche di quello dell'ovaio,

aprendo così la via all'impiego del retinoide anche in ginecologia (Sabichi *et al.*, 1998).

Ed è anche sulla scia di queste pionieristiche ricerche italiane che i ricercatori inglesi hanno cominciato a lavorare verso la fine degli anni '80 ad un altro ambizioso progetto: provare a somministrare quotidianamente a donne sane, volontarie, a rischio di tumore al seno, il *tamoxifene* (v.; v.***) farmaco dotato di proprietà anti-estrogeniche. Poiché infatti sono proprio gli ormoni estrogeni gli agenti causali o almeno promuoventi più spesso chiamati in causa nell'insorgenza del carcinoma mammario, si ritiene che l'assunzione regolare di un loro antagonista possa contribuire a ridurre l'incidenza della malattia. Sono attualmente in corso tre grandi studi nel mondo che hanno lo scopo di verificare questa ipotesi e che, ancora una volta, sono condotti da chirurghi: Michael Baum in Inghilterra, Bernard Fisher negli Stati Uniti e ancora Veronesi in Italia. Nel marzo 1998, in occasione di un'analisi preliminare dei loro risultati i ricercatori USA del BCPT (*Breast Cancer Prevention Trial*) trovano una tale differenza a favore delle donne che usavano tamoxifene come profilattico del cancro del m. da decidere di interrompere lo studio e consigliare a tutti i soggetti a rischio la regolare assunzione del farmaco. Italiani e inglesi hanno risultati meno eclatanti ma molto interessanti in alcuni sottogruppi (ad esempio nelle donne che hanno ricevuto il tamoxifene assieme alla terapia ormonale sostitutiva) e decidono di proseguire i loro studi fino al 2002 come previsto (Veronesi *et al.*, 1998; Powles *et al.*, 1998).

Nuovi progressi sulla quadrantectomia

Il ruolo chiave che i chirurghi continuano a svolgere nella diagnosi e terapia del carcinoma mammario è sostanzialmente dovuto al fatto che la cura di questa malattia è tuttora in gran parte legata alla riuscita e tempestività dell'intervento chirurgico. Agli inizi degli anni '80 aveva incontrato molto successo la teoria secondo la quale il tumore mammario è fin dall'inizio una malattia *sistemica*, cioè diffusa in tutto l'organismo, e che il nodulo presente nella ghiandola è solo la punta di questo *iceberg*. Questa ipotesi intendeva aprire la strada ad un più massiccio uso della chemioterapia e ad una progressiva contemporanea riduzione della chirurgia. Tuttavia, come le casistiche di tutto il mondo hanno poi confermato, vi è un vastissimo numero di pazienti affette da carcinoma mammario, curate con il solo intervento chirurgico (in questi casi una mastectomia) e perfettamente guarite a dieci e più anni dall'intervento. È questa una dimostrazione evidente dell'estensione solo locale di una grande maggioranza dei tumori al seno ed una ulteriore conferma del ruolo centrale del chirurgo. Si è andato con gli anni sviluppando il tentativo di sottoporre le pazienti a chemioterapia preoperatoria, per ridurre il volume del tumore e consentire una chirurgia conservativa.

È infatti proprio quest'ultima ad essere più richiesta dalle pazienti stesse e perseguita dagli operatori più competenti ed aggiornati. La mutilazione della mastectomia, infatti, non è più tollerabile nella società contemporanea, e la sua reale necessità «biologica» è sempre più messa in discussione (Fisher, 1993). Questo tema è stato a tal punto sviluppato dalla comunità oncologica internazionale che il dibattito sulla chirurgia del carcinoma mammario è caratterizzato, negli anni '90, dal confronto fra le due principali metodiche correntemente in uso nel mondo, la cosiddetta *nodulectomia* (*lumpectomy*) dell'americano Fisher e la *quadrantectomia* dell'italiano Veronesi. La prima offre un risultato cosmetico eccellente, perché si limita ad asportare il

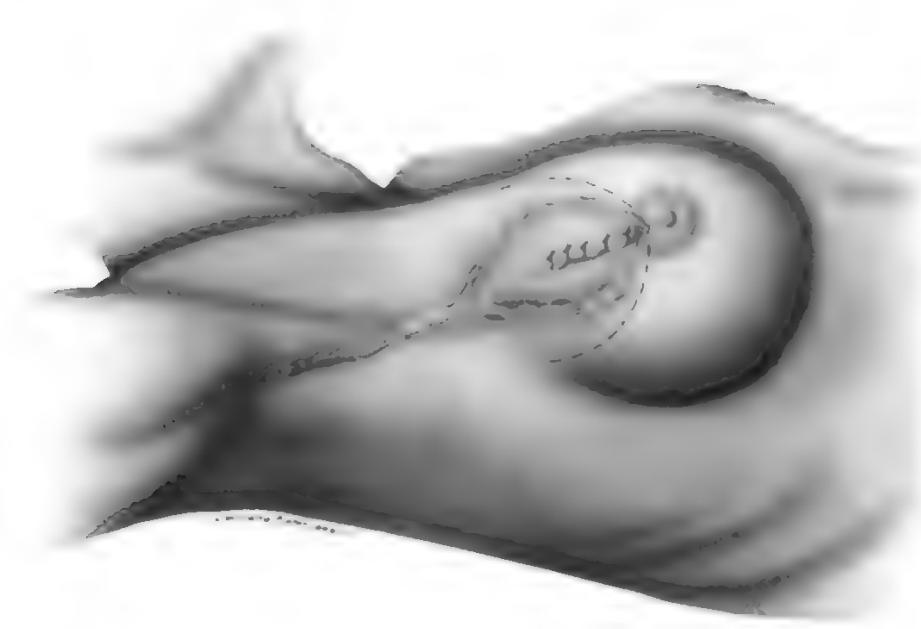


Fig. 2. Linee di incisione della quadrantectomia supero-esterna: i punti di sutura dell'incisione radiale, a partire dal capezzolo, sono quelli della biopsia che fu praticata inizialmente per misurare il diametro del tumore. L'incisione a losanga attorno ad essa corrisponde alla quantità di cute che si asporta nella quadrantectomia. La linea tratteggiata corrisponde alla quantità di ghiandola asportata (maggiore di quella cutanea).

nodulo tumorale, ma è seguita da una considerevole percentuale di *recidive locali*, cioè di ritorni della malattia nella stessa mammella dopo un tempo assai limitato (in genere tre anni) dall'intervento. La quadrantectomia (v. MAMMELLA*, coll. *4820-4828), basata sul criterio anatomico di asportare l'intero quadrante di seno contenente il nodulo tumorale, lascia necessariamente una mammella di volume minore ed una cicatrice ovviamente più lunga (figg. 2 e 3), ma offre garanzie di gran lunga superiori in termini di protezione dalle recidive. L'importanza di questo aspetto risiede nel fatto che, sebbene la recidiva locale non rappresenta necessariamente il prodromo di una disseminazione diffusa della malattia (metastatizzazione), essa costituisce una difficilissima prova per la paziente, che si sente nuovamente ammalata dopo poco tempo, e per il suo chirurgo che vive inevitabilmente il disagio di non essere riuscito a «debellare» totalmente la malattia. Ridurre al minimo il rischio di recidiva locale è quindi un obiettivo fondamentale anche e soprattutto della chirurgia conservativa e per questo assumono tanta importanza le ricerche di tipo preventivo come quelle precedentemente descritte e le nuove ipotesi di tecnica operatoria.

Fra queste ultime merita di essere brevemente menzionata una linea di ricerca tutta europea, nata dalla fusione dell'esperienza italiana con quella francese e belga e in corso di valutazione approfondita al nuovo Istituto Europeo di Oncologia di Milano. Premessa fondamentale di tale sperimentazione è la constatazione che il tumore mammario compare in grande maggioranza dei casi nei quadranti superiori della mammella e che la sua età di comparsa si localizza molto spesso tra i 45 e i 55 anni quando il seno è generalmente già piuttosto *ptosico*, cioè «cadente». L'idea del gruppo chirurgico europeo riunito a Milano è stata quella di associare l'ampio intervento di Veronesi (la quadrantectomia) alla ben nota operazione di *mastopexia*, cioè di correzione estetica della ptosi.

La tecnica che viene quindi seguita prevede che la consistente asportazione di tessuto attorno al nodulo tumorale venga «assorbita» dal sollevamento dell'intera mammella e

che altrettanto venga realizzato dall'altro lato. Si intende in tal modo associare un intervento a scopo curativo del tumore (fig. 4 a) con un'operazione estetica che lascia entrambi i seni di dimensioni più piccole ma non più cadenti (fig. 4 b). Il risultato è ovviamente di grande conforto per la paziente (fig. 4 c) che si vede al tempo stesso curata della grave malattia e anche «migliorata» nel suo aspetto estetico, raggiungendo così un obiettivo che è esattamente l'opposto della mastectomia, violenta mutilazione dell'immagine corporea e dell'identità della donna. Questa nuova tecnica, infine, non impedisce affatto di procedere in modo adeguato alla dissezione dei linfonodi ascellari, elemento tuttora fondamentale per un'accurata definizione della prognosi della malattia, assieme al dosaggio dei recettori ormonali ed alla misurazione della velocità di crescita del tumore. Inoltre, l'intervento può (e deve) essere seguito da radioterapia sulla mammella che conteneva il tumore esattamente come previsto dall'operazione originale di Veronesi, per ridurre ulteriormente il rischio di comparsa di recidive locali.

Infine, a seguito di ricerche sviluppatesi rapidamente negli ultimi due anni, appare oggi possibile anche evitare la dissezione ascellare linfonodale soprattutto nei casi in cui il tumore sia di piccole dimensioni. La tecnica italiana pubblicata nel 1997 (Veronesi *et al.*, 1997; De Cicco *et al.*, 1998) si basa sull'esame accurato del cosiddetto «linfonodo sentinella» e sulla capacità di «prevedere» lo stato patologico degli altri linfonodi, evitandone la rimozione in caso di negatività (cfr. Krag *et al.*, 1998; McMaisters *et al.*, 1998).

Conclusioni sulla scelta dell'approccio chirurgico

I tumori del seno costituiscono la più importante e grave malattia del sesso femminile. Una nuova consapevolezza della gravità di questo problema è la premessa fondamentale per una sua diagnosi precoce (v. MAMMELLA*, coll. *4802-4817) e una maggior curabilità. La chirurgia continua ad essere il trattamento principale ma rischia di rimanere incompleta se non si integra con la radioterapia e la terapia medica allo scopo di raggiungere il massimo di probabilità di guarigione. D'altra parte la chirurgia demolitiva

Fig. 3. Asportazione del quadrante supero-esterno contenente la zona dove si trovava il tumore, tolto poco prima con la biopsia escissionale (nel riquadro) eseguita per conferma istologica e misurazione del diametro.

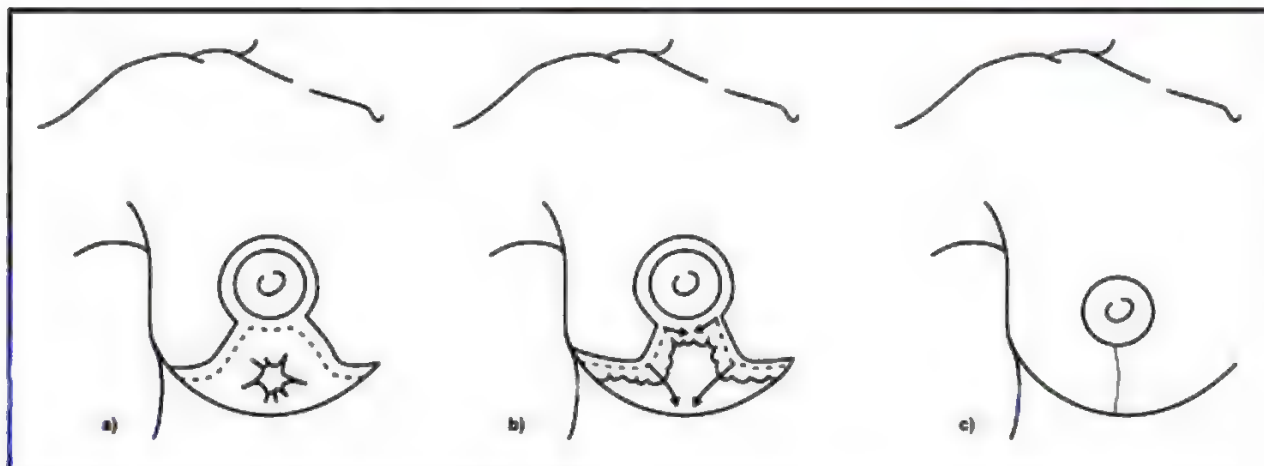
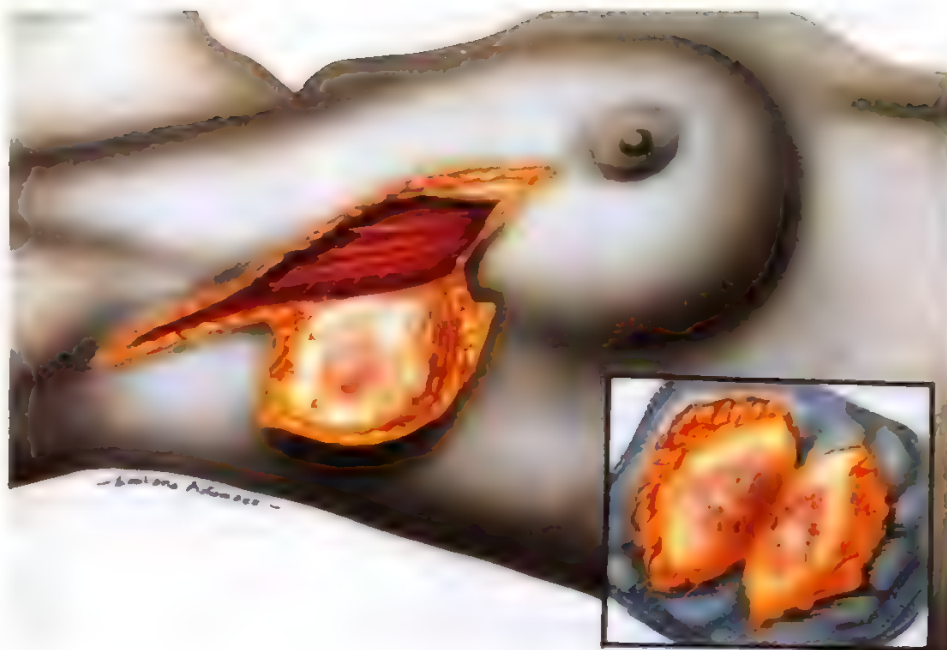


Fig. 4. Ricostruzione plastica da quadrantectomia inferiore. Cfr. spiegazioni nel testo.

(v. MAMMELLA*, coll. *4829-4836), rappresentata dalle varie forme di mastectomia, è ormai da considerarsi obsoleta alla luce delle più moderne conoscenze biologiche e come tale va progressivamente abbandonata. A tal proposito il lavoro di Fisher *et al.* (1995), che riporta la rianalisi e i risultati dopo 12 anni di *follow-up* in una sperimentazione clinica controllata che comparava la mastectomia totale con la quadrantectomia (lumpectomia), con o senza irradiazione, nel trattamento del cancro della m., dimostra che non vi sono significative differenze tra i due metodi di terapia chirurgica.

La possibilità di associare interventi curativi con operazioni estetiche sta rapidamente mutando il volto della cura dei tumori al seno e dà corpo alle speranze provenienti dalla chemioprevenzione per un futuro che si spera non lontano in cui sarà possibile non solo curare efficacemente

la malattia ma addirittura prevenirne l'insorgenza nei soggetti più a rischio.

Bibliografia

- De Cicco C. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 1998, **30**, 2080.
- Fisher B., *Annals Oncology*, 1993, **4**, 96-98.
- Fisher B. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **333**, 1456-1461.
- Krag D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1988, **339** (14), 940-946.
- McMasters K. M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339** (14), 990-995.
- Miki Y. *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 66-71.
- Nelson C., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1994, **86** (17), 1274-1275.
- Powles T. *et al.*, *Lancet*, 1998, **352**, July 11.
- Reintgen D. *et al.*, *Lymphatic Mapping and Sentinel Lymph Node Biopsy*, in Wilmore D. W. *et al.* eds., *Scientific American Surgery, Surgical Techniques*, **17**, 1998, New York.
- Sabichi A. L., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1998, **90** (8), 597.
- Veronesi U. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1981, **305**, 6-11.
- Veronesi U. *et al.*, *Lancet*, 1997, **349**, 1864.
- Veronesi U. *et al.*, *Lancet*, 1998, **352**, 93-97.

ALBERTO COSTA

CHIRURGIA PLASTICA DELLA MAMMELLA

SOMMARIO

Premessa (col. 3555). - **Chirurgia estetica** (col. 3555): *Mastoplastica riduttiva*. - *Mastopessi*. - *Mastoplastica additiva*. - *Capezzolo introflesso*. - *Ginecomastia*. - **Ricostruzione mammaria** (col. 3558): *Skin expander*. - *Lembi miocutanei*. - *Ricostruzione dell'areola e del capezzolo*.

Premessa

La chirurgia plastica della mammella [m.] può avere una finalità estetica o ricostruttiva. La chirurgia *estetica* ha lo scopo di migliorare l'aspetto di m. non attraenti per forma o volume, anche se per altro normali, e comprende la mastoplastica riduttiva (per seno voluminoso), la mastopessi (per ptosi), la mastoplastica additiva (per seno piccolo), la plastica del capezzolo (per ipertrofia o inversione del capezzolo) e, nell'uomo, l'ablazione della ginecomastia. La chirurgia *ricostruttiva* ha il fine di ricostruire la m. asportata per tumore.

Chirurgia estetica*Mastoplastica riduttiva*

Storia. - La chirurgia plastica della m. ha origine nella seconda metà dell'800, con sporadici tentativi di riduzione della ghiandola. Nel primo '900, Thorek (1922) e Aubert (1923) misero a punto una tecnica di riduzione della m., combinata al rimodellamento della cute e alla trasposizione del capezzolo (per trapianto libero). La prima mastoplastica riduttiva con rispetto della funzione è da attribuire a Biesenberger (1928). Dopo la seconda guerra mondiale furono messe a punto tecniche molto più progredite, con conservazione dei peduncoli vascolari e nervosi della ghiandola (Ariè, 1957; Strombeck, 1960; Pitanguy, 1961; Skoog, 1963).

Scopi e principi di chirurgia. - L'obiettivo è di ridurre il volume della mammella per escissione di tessuto ghiandolare-adiposo, pur garantendo una gradevole forma, cicatrici minime, capacità di lattazione e sensibilità del capezzolo (fig. 5). La scelta fra le numerose varianti tecniche è guidata dall'entità dell'anomalia da correggere: ipertrofia moderata (asportazione fino a 500 g), macromastia (da 500 a 1500 g) o gigantomastia (oltre i 1500 g).

Molti chirurghi prima dell'intervento disegnano sulla cute delle linee-guida (medio-sternale, mammillare, solco sottomammario) e dei punti-guida per valutare l'ampiezza della resezione, specie in presenza di una marcata asimmetria mammaria. Le tecniche, con un gran numero di varianti e di risultati, possono essere suddivise a seconda della cicatrice chirurgica: solo verticale (Ariè, 1957; Doufourmental

et al., 1961); ad ancora (Pitanguy, 1967; Skoog, 1963; Strombeck, 1960); a L (Meyer *et al.*, 1975; Regnault, 1974).

Un altro criterio classificativo è in funzione del tipo di resezione ghiandolare e/o della tecnica di trasferimento del complesso areola-capezzolo nella nuova sede, con lembo peduncolato dermo-ghiandolare:

- a base superiore (Ariè; Pitanguy);
- supero-laterale (Skoog; Planas);
- infero-laterale (Doufourmental);
- inferiore (Robbins; Giorgade);
- bipeduncolato trasversale (Strombeck);
- bipeduncolato verticale (McKissock).

In casi selezionati di gigantomastia, la trasposizione del complesso areola-capezzolo può essere effettuato come innesto libero (Barnes, 1953; Wise, 1963), che tuttavia preclude ogni possibilità di conservare la funzione dell'allattamento, l'erezione e, in gran parte, la sensibilità del capezzolo.

Complicanze. - Le complicanze, diminuite con il progredire delle tecniche, sono in rapporto al volume asportato: dall'1,8% per resezioni fino a 500 g, al 16% oltre i 1000 g (Strombeck, 1968). Si tratta di complicanze immediate (ematomi, infezioni, deiscenza di suture, necrosi parziale di cute e/o di ghiandola o dell'areola-capezzolo), o a distanza (ridotta sensibilità, cicatrici ipertrofiche, asimmetrie o malposizioni del complesso areola-capezzolo).

Mastopessi

La ptosi mammaria è il più comune effetto dell'involuzione senile, ma può anche intervenire in seguito a eccessivo dimagrimento, gravidanze o menopausa. Se ne distinguono tre gradi (Bostwick, 1986): capezzolo posizionato fra il livello del solco mammario e 1 cm inferiormente (I grado); fra 1 e 3 cm al di sotto del solco sottomammario (II grado); oltre i 3 cm (III grado).

Le tecniche di correzione variano da quelle per i casi più lievi, limitate alla resezione della cute sopra l'areola e reimpianto di questa in alto, a quelle in cui, oltre all'asportazione della cute in eccesso (a cicatrice verticale, laterale o ad ancora), anche la ghiandola viene rimodellata e il complesso areola-capezzolo ricollocato nella nuova sede (fig. 6), (Ariè; Bostwick; Pitanguy; Planas; Regnault ed altri). In caso di marcata involuzione può rendersi opportuno reintegrare il volume della ghiandola con una protesi.

Le complicanze sono analoghe a quelle della mastoplastica riduttiva, anche se meno frequenti.

Mastoplastica additiva

I primi tentativi per aumentare il volume del seno furono effettuati con lembi addominali disepitelizzati e ruotati al di sotto della m. (Longacre, 1953) o con innesti liberi dermo-adiposi nello spazio retroghiandolare (Barnes, 1959), presto



Fig. 5. A sinistra: macromastia con ptosi di elevato grado. A destra: correzione mediante mastoplastica.

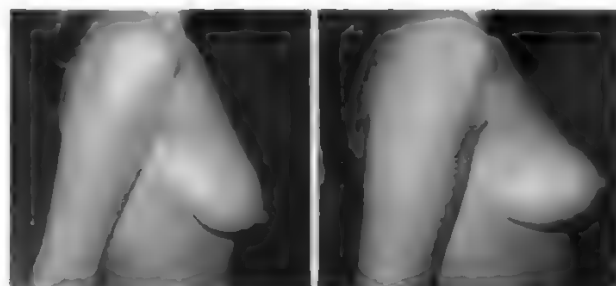


Fig. 6. A sinistra: ptosi mammaria. A destra: risultato dopo correzione con mastopessi.



Fig. 7. A sinistra: ipoplasia mammaria da iposviluppo postpuberale. A destra: correzione mediante protesi mammaria.

però abbandonati per le complicanze e il riassorbimento del volume aggiunto. Altri tentativi, infruttuosi, con materiali alloplastici (spugne di varia natura) risalgono al '59, ma solo dagli anni '60 si sono ottenuti buoni risultati e una vasta diffusione delle mastoplastiche additive, grazie alle protesi di silicone riempite di soluzione fisiologica o di gel di silicone (Cronin e Geron, 1964).

Le protesi di prima concezione stimolavano però, all'intorno, un eccesso di tessuto reattivo-fibroso, a forte effetto retraente, che incapsulava l'impianto e provocava, in un buon 40% di casi, un fastidioso indurimento della m., conferendole un aspetto innaturale, rigido e sferico. Per ridurre l'incidenza di questo inconveniente, dapprima attribuito soltanto allo spessore della parete, furono ideate numerose varianti delle protesi in silicone: a parete sottile, a riempimento con soluzione fisiologica, a parete in più strati, a doppia camera (di cui l'interna riempita di gel e l'esterna di soluzione fisiologica), a superficie coperta da poliuretano, corrugata, etc.

Mentre miglioravano i biomateriali, anche la tecnica chirurgica ha fatto registrare un reale progresso (fig. 7), sia per la via di accesso (incisione sottomammaria, periareolare, ascellare) e la sede d'impianto (retromammaria, retropettorale), sia per lo strumentario (illuminatori a fibre ottiche, endoscopio con monitor televisivo).

Nel 1992 il F.D.A. (Food and Drug Administration, ente di controllo degli USA), a seguito di segnalazioni di sospette patologie riferite ai biomateriali, ha autorizzato solo l'impiego di involucri in silicone riempiti di soluzione fisiologica, sospendendo qualsiasi altro tipo di protesi mammaria. In seguito, dopo attente verifiche su ampie casistiche, molti dubbi sulle protesi riempite in silicone sono scomparsi; unico decisamente vietato: il silicone liquido, che iniettato libero nei tessuti in quantità rilevanti può produrre danni locali e a distanza, nel corso degli anni.

Capuzzolo introflesso

È presente nel 2% circa della popolazione femminile e costituisce un problema non soltanto estetico, ma anche funzionale (impossibilità di allattamento). A seconda della gravità, si distingue un capezzolo ombelicato (esteriorizzabile con lieve pressione) e uno invaginato (più grave, con brevità dei dotti e non esteriorizzabile). Nel primo caso la lattazione è difficoltosa, nel secondo impossibile.

Le tecniche di correzione sono distinguibili in due gruppi (Bracaglia, 1993):

- 1) tecniche che conservano l'integrità dei dotti galattofori e la funzione lattatoria, applicabili nei casi «minori»;
- 2) tecniche che comportano la sezione dei dotti rendendo impossibile la funzione lattatoria, nei casi «maggiori».

Fra le complicanze specifiche vanno annoverati il rischio di recidiva e la perdita di sensibilità del capezzolo.

Ginecomastia

L'ipertrofia mammaria nell'uomo è relativamente frequente nell'adolescenza ma di solito regredisce intorno ai 20 anni. Può però presentarsi anche nell'adulto o nell'anziano, per ipertrofia del tessuto adiposo o per iperplasia adiposo-ghiandolare, a volte associata a un'areola più ampia del normale. Nella maggior parte dei casi si tratta di un'anomalia di origine ignota; più di rado è attribuibile a un disordine endocrino (disfunzione, iperplasia o tumore ormono-secrente a sede surrenalica, testicolare o altra), di cui la ginecomastia può rappresentare un'utile «spia» clinica. Solo in questi casi essa può regredire con le cure mediche (risolvendosi il problema endocrino), altrimenti l'unico rimedio è nell'ablazione del tessuto mammario in eccesso.

La tecnica, nei casi di ipertrofia ghiandolare, prevede un'incisione periareolare, poco visibile, e l'uso di strumenti a fibre ottiche o di un endoscopio per ridurre al minimo la traumatizzazione. È assolutamente da evitare l'incisione sottomammaria, che lascia una cicatrice antiestetica, oggi inaccettabile. Nei casi di più comune iperplasia adiposa è consigliabile la semplice liposuzione, con il massimo dei risultati: asportando anche il grasso sottodermico, è possibile provocare una buona retrazione della cute soprastante in relativo eccesso.

V. anche: CHIRURGIA ESTETICA** (coll. **1144-1157).

Ricostruzione mammaria

Per la ricostruzione *post-mastectomia* è necessario provvedere al reintegro del volume della ghiandola, mediante tessuti autologhi o protesi, e della cute. L'evoluzione di questa chirurgia è costellata di tentativi d'ogni genere soprattutto per la ricostruzione cutanea, dai lembi peduncolati locali (toracici, mammari controlaterali) a quelli a distanza (dall'addome), piani o tubulati, inizialmente con risultati assai modesti dal punto di vista estetico. In seguito, i maggiori progressi si sono avuti grazie all'uso degli «espansori» (*skin expander*) e dei lembi mio-cutanei (v. anche: CHIRURGIA PLASTICA*).

Skin expander

Si tratta della metodica più semplice, che utilizza i tessuti localmente disponibili e una protesi «espansore» (Argenta *et al.*, 1983). Se ne ottiene la sovradistensione della cute locale fino alla dimensione necessaria per ricostruire una m. anche di notevole volume (e con ptosi naturale).

Il principio dell'*espansione* cutanea si basa sull'osservazione che la pelle messa in graduale tensione si allunga quanto basta per le esigenze ricostruttive. Una protesi-espansore viene collocata semivuota sotto la cute mammaria e, quando la cicatrice post-mastectomia è ormai consolidata, di settimana in settimana viene riempita di soluzione fisiologica in misura crescente, per puntura attraverso una valvola sottocutanea comunicante con l'espansore. Il vantaggio è di evitare nuove cicatrici e di ricostruire la m. con la cute stessa del torace (e non con la cute da altra sede, di aspetto diverso). Ovviamente tale metodica può essere utilizzata solo se la regione ha tessuti di buona qualità (non irradiati, né sottili o fibrosi).

Per completezza, usualmente la m. controlaterale viene rimodellata al fine di ristabilire la simmetria.

Lembi miocutanei

Nei casi in cui la cute mammaria non è idonea all'espansione, è necessario ricorrere all'apporto da una regione

vicina. I lembi miocutanei attualmente in uso utilizzano il *latissimus dorsi* o il retto addominale, con il vantaggio di poter trasportare in unico tempo un'isola cutanea di cospicue dimensioni, soprastante l'unità muscolare che funge da *carrier* (supporto vascolare).

Nel caso del *latissimus dorsi* è necessario aggiungere una protesi mammaria al di sotto del lembo per ottenere un volume adeguato. Nel caso del retto addominale (*Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous: T.R.A.M.*), l'isola cutaneo-sottocutanea trasferita dall'addome è in genere sufficiente ad evitare l'aggiunta protesica.

Gli svantaggi sono costituiti dal deficit da trasposizione del muscolo e dalle cicatrici nelle sedi di donazione (alla spalla nel caso del *latissimus dorsi*, nei quadranti inferiori dell'addome nel caso del T.R.A.M.), oltre al differente aspetto della cute nella sede ricostruita.

Ricostruzione dell'areola e del capezzolo

Si tratta dell'atto operatorio finale, di solito a distanza di mesi. Si decide la sede di ricostruzione accuratamente simmetrica e si procede in vario modo. Ad es., per il capezzolo si può utilizzare parte di quello controlaterale (se voluminoso), impiantandolo come innesto libero; o si può ricorrere a lembi pedunculati locali, modellati in modo da ricreare la forma del capezzolo controlaterale (Little e Spear, 1988; Bostwick, 1986). Per l'areola si può eseguire un innesto libero di cute a tutto spessore prelevato a distanza (ad es. dalla regione inguino-perineale, se di aspetto idoneo e colorito brunoastro). Altrimenti ci si limita al semplice tatuaggio, simil-areolare, sulla m. ricostruita.

Bibliografia

- Argenta L., Marks M., Grabb W., *Ann. Plast. Surg.*, 1983, **11**, 188.
 Arie G., *Rev. Ibero Lat. Ann. Chir. Plast.*, 1957, **3**, 28.
 Aubert V., *Arch. Franco Belg. Chir.*, 1923, **3**, 284.
 Barnes H. O., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1953, **11**, 404.
 Biesenberger H., *Zentralbl. Chir.*, 1928, **55**, 2382.
 Bostwick J., *Chirurgia ricostruttiva ed Estetica della Mammella*, 1986, Capozzi Ed., Roma.
 Cronin T., Geron F., *Augmentation mammoplasty: a new natural fee prothesis in Transac*, Third Int. Cong. Plast. Surg., 1964, Excerpta Medica, Amsterdam.
 Doufourmental C. et al., *Ann. Chir. Plast.*, 1961, **6**, 45.
 Little J., Spear S., *Perspect. Plast. Surg.*, 1988, **2**, 1.
 Longacre J. J., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1953, **11**, 380.
 Meyer R. et al., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1975, **55**, 139.
 Pitanguy I., *Breast hypertrophy in Transactions of the Inter. Soc. of Plast. Surg.*, 1960, Livingstone, Edinburgh.
 Pitanguy I., *Br. J. Plast. Surg.*, 1967, **20**, 78.
 Planas J. et al., *Ann. Plast. Surg.*, 1980, **4**, 297.
 Regnault P., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1974, **53**, 19.
 Skoog T., *Acta Chir. Scand.*, 1963, **126**, 453.
 Strombeck J. O., *Reduction mammoplasty*, in Grabb W., Smith J. eds., *Plastic Surgery*, 1968, Little Brown, Boston.
 Strombeck J. O., *Br. J. Plast. Surg.*, 1960, **13**, 79.
 Thorek M., *N.Y. Med. J. Rec.*, 1922, **116**, 572.
 Wise J., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1963, **32**, 12.

ROBERTO BRACAGLIA

MANO-PIEDE-BOCCA, MALATTIA

F. *maladie main-pied-bouche*. - I. *hand-foot and mouth disease*. - T. *Hände-Füsse-Mund Krankheit*. - S. *manos-pies-boca enfermedad*.

SOMMARIO

Definizione ed epidemiologia (col. 3559). - Etiologia (col. 3560). - Patogenesi (col. 3560). - Manifestazioni cliniche (col. 3560). - Diagnosi differenziale (col. 3561).

Definizione ed epidemiologia

La «malattia mano-piede-bocca», dall'inglese *Hand-Foot-and Mouth disease* (HFM) è una forma morbosa tipica,

anche denominata «stomatite vescicolare con esantema», caratterizzata dalla comparsa di elementi vescicolari a carico del cavo orale, delle mani e dei piedi. Riconosciuta come entità clinica la prima volta a Toronto nel 1957, fu definitivamente caratterizzata in seguito ad un'epidemia occorsa nel 1959 in Inghilterra, a Birmingham (Alsop et al., 1960).

Afezione prevalentemente ma non esclusivamente dell'infanzia, compare più frequentemente nel corso dell'estate o dell'autunno sotto forma di casi sporadici o piccole epidemie. Non vengono riferiti *pattern* stagionali nei climi tropicali. Condizioni di sovraffollamento o scarsa igiene ne favoriscono la diffusione. Le tipiche manifestazioni cutanee osservate in tutti i pazienti infetti in età prescolare, sono presenti solo nel 38% dei bambini in età scolare e nell'11% dei soggetti adulti.

Etiologia

L'HFM è causata più frequentemente dal virus Coxsackie A16 e, in percentuale minore, dai tipi A5, A10, B2 e B5 e dall'Enterovirus 71 che, identificato per la prima volta nel 1970, causò numerose epidemie di questa sindrome. In particolare, i virus Coxsackie, facenti parte, insieme agli Echovirus, del gruppo degli Enterovirus (v.*), sono responsabili di forme esantematiche febbrili comuni nella prima e seconda infanzia. Per tale motivo, a tutt'oggi la malattia mano-piede-bocca non viene più considerata come entità nosologica a sé stante, ma descritta nel gruppo delle forme esantematiche sostenute dai virus Coxsackie. In effetti, soprattutto nelle fasi iniziali di malattia, le manifestazioni cliniche possono essere confuse con quelle dell'herpangina, o faringite vescicolare, comunemente provocata dai sierotipi A2-6, A8 e A10, meno spesso dai tipi A16-22 o B1-5.

Patogenesi

L'ingresso dei virus generalmente avviene attraverso il cavo orale ed è seguito da replicazione nelle cellule epiteliali e linfoidi con diffusione attraverso la corrente ematica agli organi bersaglio.

Le tipiche lesioni mucose e cutanee sono infatti da attribuirsi a localizzazione del virus, per tropismo elettivo, in queste stesse sedi, raggiunte tramite il circolo ematico. L'esantema maculopapuloso è probabilmente l'espressione di una reattività cutanea a fattori immunitari umorali e cellulari.

Manifestazioni cliniche

Il periodo d'incubazione è generalmente di pochi giorni (4-7). Più frequentemente l'HFM si manifesta, in assenza di prodromi, con dolore al cavo orale, faringodinia ed enantema di tipo vescicolare che può diventare rapidamente ulcerativo. Le lesioni, presenti in numero di 5-10, compaiono sul palato, sulla mucosa orale, sulle gengive, sulle labbra e sulla faringe. L'esantema, che compare subito dopo le lesioni orali, è caratterizzato da vescicole, in numero limitato, a carico del dorso delle mani e dei piedi, meno frequentemente delle palme e delle piante (fig. 1). Generalmente le vescicole, di dimensioni comprese tra 3 e 7 mm, presentano forma lineare o arcuata, con una zona eritematosa alla base. Rara è la contemporanea comparsa di un'eruzione maculopapulosa ai glutei, come pure lo sviluppo di un'eruzione vescicolosa estesa.

La malattia, usualmente a decorso benigno, si risolve in media nell'arco di una settimana; del tutto eccezionali sono

MAPPE GENETICHE: V. GENOMA UMANO**.

MARFAN, SINDROME DI [v. vol. IX, coll. 431-435; Agg. I, coll. *4860]

SOMMARIO

Epidemiologia ed ereditarietà (col. 3562). - **Etiologia e patogenesi** (col. 3565). - **Fenotipo** (col. 3566): *Apparato scheletrico*. - *Sistema oculare*. - *Sistema cardiovascolare*. - *Altri sintomi e condizioni frequenti*. - *Atteggiamento terapeutico e comportamento medico* (col. 3571).

Epidemiologia ed ereditarietà

Antonin Bernard Marfan (1858-1942), professore di pediatria a Parigi, riportò per la prima volta nel 1896 il caso di una bimba affetta da malformazioni congenite mai segnalate precedentemente (fig. 1). Nel 1931 la sindrome veniva segnalata come «distrofia mesodermica congenita, tipo Marfan». Finalmente nel 1955 Victor McKusick, creando la nosologia delle *malattie ereditarie del tessuto connettivo* (METC) definiva ufficialmente le caratteristiche della «sindrome di Marfan» [s. di M.] (Beighton, 1993).

Gli studi sulla prevalenza della s. di M. effettuati dallo stesso McKusick nell'area di Baltimora (U.S.A.), indicavano la presenza di 4-6 casi su 100.000 nati; tuttavia si trattava di una sottostima: infatti dall'insieme delle segnalazioni si può parlare di almeno 1 caso ogni 10.000 nati. Inoltre, dal momento che alla base della malattia esistono frequenti mutazioni spontanee, non esiste a priori il motivo per sospettare una predisposizione etnica.

La s. di M. si trasmette generalmente con modalità autosomica dominante come dimostrato in una delle più ampie famiglie studiate (200 membri, 6 generazioni) (Cadle e Hall, 1989) (fig. 2). La penetranza della malattia è molto alta; per es. nella famiglia suddetta ognuno dei 105 membri aveva almeno un genitore affetto da s. di M. Esiste l'evidenza anche di forme severe della s. di M. a trasmissione autosomica recessiva e, nei casi di nuove mutazioni (30%), l'età del genitore è apparsa maggiore di quella della media generale.



Fig. 1. Esantema localizzato sulle piante del piede.

le complicanze, caratterizzate da meningite a liquor limpido e miocardite.

È possibile dimostrare la presenza del virus, sia su tamponi orofaringei che nelle urine, per una settimana dall'inizio della malattia. È anche possibile isolarlo dal liquido contenuto nelle vescicole.

Diagnosi differenziale

La diagnosi della malattia è relativamente semplice, a causa delle tipiche vescicole, sia a carico del cavo orale che della cute. In presenza di lesioni ulcerative della mucosa orale, la diagnosi differenziale va posta con herpes simplex, stomatite aftosa o herpangina; quest'ultima si caratterizza per la presenza di numerose e piccole vescicole o ulcere del diametro compreso tra 2 e 4 mm localizzate su pilastri tonsillari anteriori, palato molle e uvola.

Bibliografia

- Alsop J., Flewett T. H., Foster J. R., *Br. Med. J.*, 1960, **2**, 1708.
 Fields B. N., Knipe D. M., *Virology*, 1990, 2 ed., Raven Press, New York, p. 565.
 Gorbach S. L., Bartlett J. G., Blacklow N. R., *Infectious Diseases*, 1992, Saunders, Philadelphia, pp. 1120-1125.
 Hyypia T., Stanway G., *Adv. Virus Res.*, 1993, **42**, 343-373.
 Mandell G. L., Bennet J. E., Dolin R., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4 ed., 1995, Churchill Livingstone, New York, pp. 1623-1624; 1631-1632.
 Moroni M., Esposito R., De Lalla F., *Manuale di Malattie Infettive*, 3 ed., 1991, Masson, 3 ed., Milano.
 Thomas I., Jenniger C. K., *Cutis*, 1993, **52**(5), 265-266.
 Tindall J. P., Callaway J. L., *Am. J. Dis. Child.*, 1972, **124**, 372.

LUIGI ELIA, PATRIZIA D'ARGENIO E STEFANIA BERNARDI

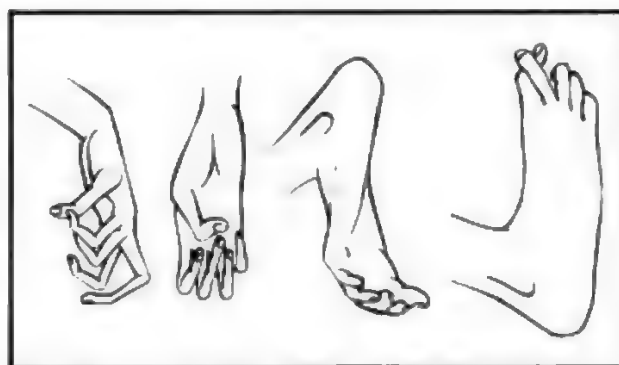


Fig. 1. Prima rappresentazione grafica delle deformità scheletriche a livello delle dita (aracnodattilia) nella s. di M., effettuata dallo stesso Antonin Bernard Marfan nel 1896. (Da Beighton, 1993, ridisegnata e modificata).

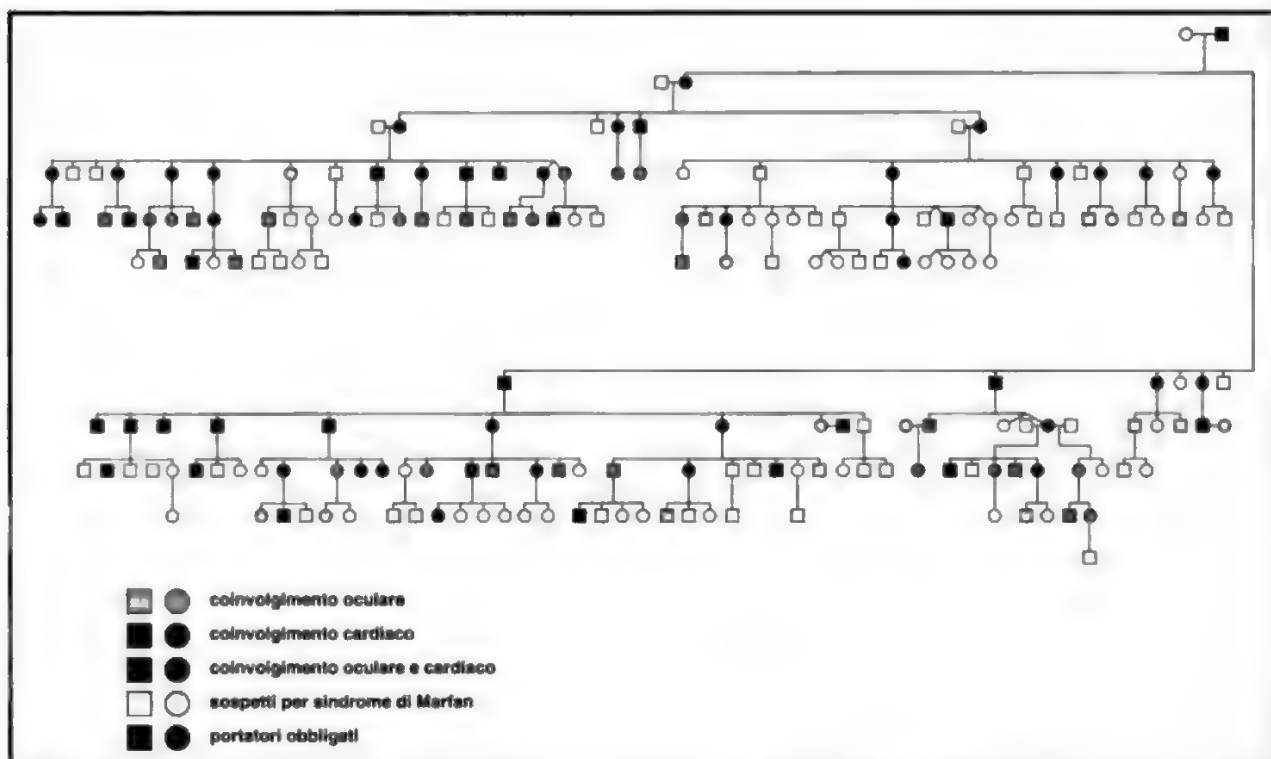


Fig. 2. Albero genealogico che dimostra la trasmissione autosomica dominante della s. di M. in una delle più ampie famiglie studiate. La famiglia abbraccia sei generazioni e oltre 200 membri. (Da Beighton, 1993, ridisegnata e modificata).

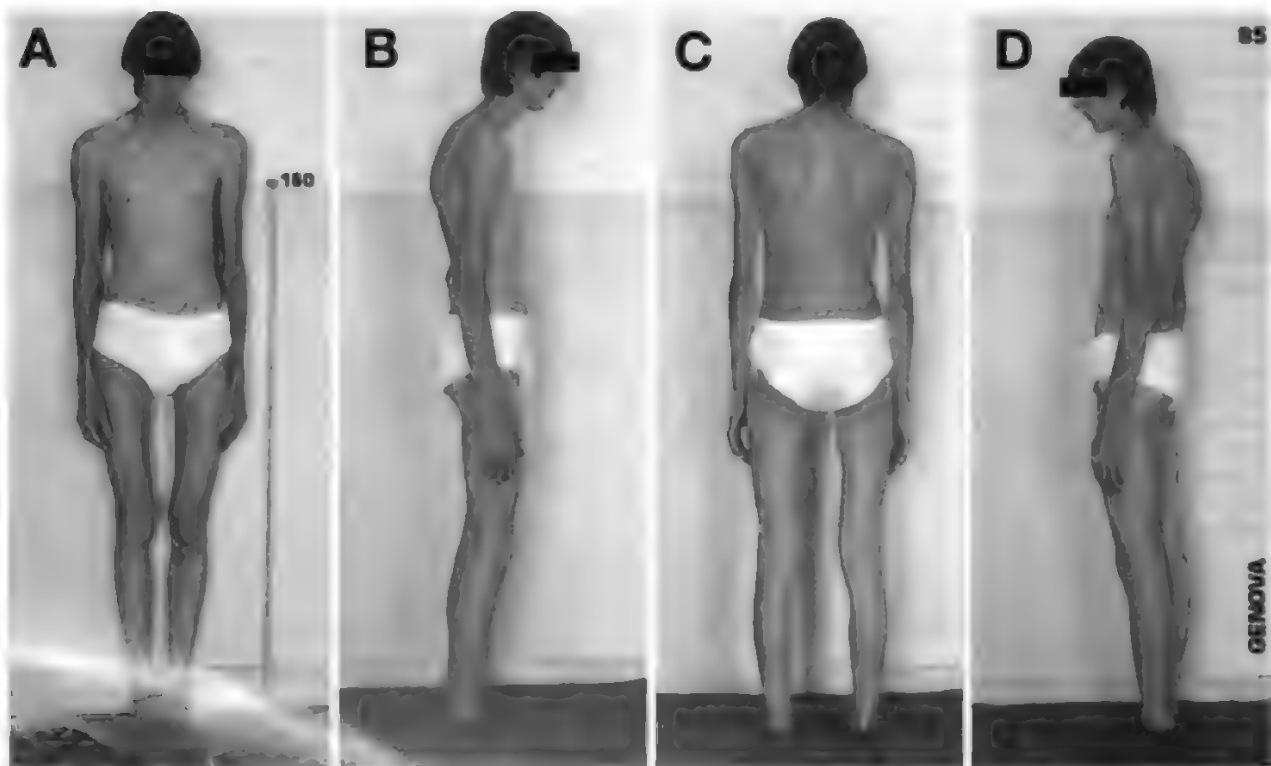


Fig. 3. Caso di s. di M. Il paziente all'età di 30 anni presentava un'altezza di 192 centimetri ed un peso di 72 chili. E' evidente una eccessiva lunghezza degli arti (A, B), associata a scoliosi e a cifosi dorsale (D). (Archivio Dr. M. Cutolo).

Etiologia e patogenesi

L'etiologia della s. di M. rimane incerta; tuttavia considerando la sua trasmissione autosomica dominante, la causa più probabile viene attribuita a mutazioni a livello di proteine costituenti la matrice extracellulare. Mutazioni a livello dei geni dei procollageni noti sono state a lungo ricercate come possibile causa della sindrome, tuttavia, almeno per i procollageni di tipo I-II-III-V- e VI, non sono state trovate alterazioni nelle famiglie studiate. D'altro canto le anomalie segnalate a livello di proteoglicani, glicosaminoglicani e ac. ialuronico nei tessuti di pazienti affetti dalla s. di M. rappresentano in effetti un comune epifenomeno delle METC (Royce e Steinmann, 1993). Nel 1959 quindi, cominciò a venire sospettato nella s. di M. il coinvolgimento patologico delle fibre elastiche.

Le fibre elastiche sono formate da elastina e microfibrille. L'elastina (v.; v.*), componente amorfo delle stesse fibre, pur essendo un candidato etiologico ovvio, non è stata mai trovata direttamente alterata a livello genico, ma soltanto indirettamente diminuita nei tessuti o nei suoi prodotti di degradazione a livello urinario in pazienti affetti dalla s. di M.

Le indagini si sono quindi indirizzate sulla composizione delle microfibrille elastiche. Nel 1986 venivano identificate le fibrilline (v. FIBRILLINA**), glicoproteine di circa 350 kDa il cui gene è localizzato sui cromosomi 15 (*FBN1*) e 5 (*FBN2*) (Sakai *et al.*, 1986; Shores *et al.*, 1994; Tobias *et al.*, 1995; Tsiouras *et al.*, 1992). Le fibrilline sono subito apparse come le maggiori componenti delle microfibrille elastiche sia durante l'embriogenesi, sia nell'età adulta. D'altra parte, nel 1990 veniva localizzato il locus per il gene della s. di M. sul cromosoma 15. La localizzazione del gene *FBN* coincideva quindi con quella per il gene della s. di M. propriamente detta. Sempre nel 1990, veniva studiata sui pazienti affetti da s. di M. la sintesi di fibrilline da parte di fibroblasti posti in coltura e la distribuzione delle proteine nei tessuti patologici. Gli studi confermavano la presenza di varie alterazioni nella sintesi e nella distribuzione delle fibrilline in circa in 90% dei casi esaminati (Kainulainen *et al.*, 1993).

Sulla base delle diverse anomalie osservate sono state proposte 4 classi di pazienti affetti da s. di M. Pazienti i cui fibroblasti sintetizzano solo il 50% della normale fibrillina (*FBN1*), altri che ne sintetizzano una quantità normale, tuttavia o la secernono meno efficientemente dei soggetti normali oppure non la incorporano nella matrice elastica, altri ancora, infine, che producono una normale quantità di fibrillina che viene incorporata nella matrice elastica, senza evidenti danni morfologici.

Gli studi molecolari sul DNA dei pazienti affetti da s. di M. hanno evidenziato almeno venti diverse mutazioni a livello del gene *FBN1*. In almeno otto delle dieci mutazioni riportate, l'alterazione è stata localizzata a livello del gene *FBN1* che codifica per una sequenza simile all'*epidermal growth factor* (EGF-like) (Kailunainen *et al.*, 1994).

La rappresentazione schematica della struttura della *FBN1* e la sede delle differenti mutazioni ad oggi identificate sono riportate nella fig. 3 della voce fibrillina (v.**). L'assemblaggio dei monomeri di *FBN1* alterati con i monomeri normali comporterebbe la comparsa di un fenotipo grave di s. di M.; al contrario la mancata interazione dei monomeri alterati con quelli normali, determinerebbe soltanto un minore contenuto di fibrillina nelle microfibrille e si associerebbe a forme medie di s. di M. (Pyeritz e McKusick, 1979). Gli studi molecolari hanno anche permesso di identificare una sequenza del DNA della *FBN1* che cosegrega con la s. di M. e che quindi permette di effettuare una diagnosi presintomatica nei parenti dei pazienti affetti.

Gli studi anatomopatologici, esclusa la presenza di alterazioni nelle fibre elastiche, non hanno mai evidenziato aspetti pienamente caratteristici per la s. di M.

Fenotipo

Apparato scheletrico

Trattandosi di una METC, tutti i tessuti ed organi possono essere coinvolti e non meraviglia quindi di potere riscontrare nei malati affetti da s. di M., la differente associazione di una o più delle circa 50 differenti condizioni patologiche quali vengono riportate nella tab. I.

TAB. I. MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLA SINDROME DI MARFAN IN RELAZIONE AI DIVERSI ORGANI E TESSUTI COINVOLTI

(da Cutolo *et al.*, 1994)

Scheletro

Deformità della cassa toracica:
asimmetria toracica
pectus excavatum/carenatum
Dolicostenomelia
Deformità del piede (es.: piede arcuato)
Aracnodattilia
Deformità della colonna vertebrale
scoliosi
lordosi o ridotta cifosi toracica
cifosi toracica o toracolombare
spondilolistesi
Alta statura (soprattutto se paragonata all'altezza dei genitori o dei fratelli non affetti)
Palato arcuato
Affollamento dei denti
Malocclusione dentale
Protrusione dell'acetabolo
Anormale mobilità articolare degli arti
contratture congenite in flessione
ipermobilità

Occhio

Ectopia lentis
Cornea piatta
Aumento della lunghezza assiale del globo oculare
Distacco di retina
Miopia

Apparato cardiovascolare

Dilatazione dell'aorta ascendente
Dissezione aortica
Insufficienza aortica e mitralica
Prolasso della mitrale
Calcificazione dell'*anulus* mitralico
Aneurismi dell'aorta addominale
Aritmie
Endocardite

Apparato respiratorio

Pneumotorace spontaneo
Presenza di bolle apicali
Sindrome restrittiva (secondaria a deformità della cassa toracica)
Enfisema

Cute e tegumenti

Strie (senza causa nota come: gravidanza, dimagrimento, etc.)
Ernie recidivanti
Ernie inguinali, ombelicali, diaframmatiche, etc.

Sistema Nervoso Centrale

Ectasie della dura madre
Meningocele lombosacrale
Mielomeningocele
Ritardo nell'apprendimento
Iperattività (associata o meno a deficit dell'attenzione)

Una delle caratteristiche cliniche che maggiormente deve indurre al sospetto di s. di M. è l'aspetto scheletrico, caratterizzato dall'eccessiva altezza del soggetto, accompagnata da braccia e gambe sproporzionatamente allungate e sottili, tuttavia con un peso corporeo abnormemente basso. Come si osserva nel caso riportato nella fig. 3, all'età di 18 anni il paziente presentava un'altezza di 192 centimetri ed un peso di 72 chili. In pratica è stato calcolato che i pazienti affetti da s. di M. superano abbondantemente per l'altezza il 97° percentile, mentre per il peso sono sotto il 50° percentile, derivandone quindi un alterato rapporto altezza/peso in relazione anche all'età. I pazienti presentano un viso stretto e lungo ed il cranio allungato appare come dolicocefalo.

Un'altro aspetto scheletrico caratteristico è la notevole lunghezza delle dita (aracnodattilia) che permette ai pazienti di eseguire «varie evoluzioni» tipo quella di circondare largamente con la mano il polso controlaterale (*segno di Walker-Murdoch*), o di fare apparire il pollice dal lato ulnare della mano chiusa a pugno (*segno di Steinberg*), come dimostrato nella fig. 4.

La volta plantare può essere sia accentuata (piede cavo)

sia ridotta (piede piatto) con conseguenti disturbi nella deambulazione, alterato carico scheletrico e danni secondari alle anche e alle ginocchia. In quasi tutti i casi di s. di M. completa, è inoltre presente un'accentuata cifosi a livello toracico alto (fig. 3).

Altra frequente anomalia scheletrica è rappresentata da una scoliosi di diversa gravità. Il torace inoltre, presenta numerose anomalie e, specie a livello sternale, possono essere presenti, per l'eccessiva crescita in lunghezza delle costole, sia un petto «scavato», sia un petto «carenato» (fig. 5). D'altra parte in alcuni casi, è possibile osservare, nello stesso paziente in tempi diversi, l'alternarsi di entrambe le anomalie.

Le conseguenze delle alterazioni vertebrali e costali toraciche suddette sono spesso rappresentate dalla comparsa di patologia polmonare restrittiva e cuore polmonare. A livello delle articolazioni coxo-femorali è frequente la comparsa di *protrusio acetabuli*, con conseguente asimmetria del bacino che tuttavia può rimanere asintomatica per lungo tempo: questa condizione è evidente nel caso riportato nella fig. 6.



Fig. 4. Casi di s. di M. Dita allungate e filiformi (aracnodattilia) (A) Segno di Walker-Murdoch: il paziente riesce a circondare il polso controlaterale con le dita che si sovrappongono abbondantemente (B) Segno di Steinberg: il pollice appare dal lato ulnare della mano a pugno chiuso (C). (Archivio Dr. M. Cutolo).



Fig. 5. Casi di s. di M. A seguito dell'eccessiva crescita in lunghezza delle costole i pazienti possono presentare un petto «scavato» (A) o «carenato» (B). (Archivio Dr. M. Cutolo).

Sistema oculare

Il globo oculare dei pazienti affetti da s. di M. è tipicamente allungato e ciò contribuisce alla comparsa della miopia,

inoltre è un fattore di rischio per il distacco retinico e per l'associazione con la dislocazione del cristallino (*ectopia lentis*). La cornea tende a presentarsi più piatta del normale. L'iride appare spesso omogenea e «vellutata» e la transilluminazione è possibile solo nel 20% dei pazienti. Inoltre la dilatazione della pupilla è resa difficoltosa per la ipoplasia del muscolo dilatatore.

Circa nel 60% dei casi è presente dislocazione del cristallino di vario grado che inizia dall'età dei 4 anni (Mau-menee, 1981). La dislocazione può avvenire in qualsiasi direzione e può progredire; tuttavia, in genere, la ectopia rimane stabile per il resto della vita. Lo sviluppo della cataratta è accelerato nei pazienti con la s. di M. ed è una delle manifestazioni prevalenti nei pazienti più longevi. Il distacco retinico è raro e comunque più frequente in seguito a interventi di chirurgia intraoculare. Nella maggior parte dei pazienti affetti da s. di M. si ottiene, almeno in un occhio, una correzione della miopia di 20/40. Ovviamente il distacco retinico compromette la visione fino a determinare cecità.

Sistema cardiovascolare

La prognosi di un malato affetto da s. di M. dipende dalle alterazioni del sistema cardiovascolare (Child *et al.*, 1989). In pratica la causa di morte più o meno prematura, va attribuita al danno cardiovascolare in oltre il 90% dei casi, con prevalenza di rottura di aneurisma aortico, insufficienza della valvola aortica ed insufficienza cardiocircolatoria acuta da incontinenze valvolari (mitrale inclusa).

In effetti, il danno cardiaco più frequente e per primo riconosciuto nella s. di M. è rappresentato dal *prolasso della valvola mitrale* del tutto simile, dal punto di vista qualitativo e auscultatorio a quello riscontrabile nella popolazione generale, ma che più facilmente evolve verso la vera insufficienza mitralica in almeno il 25% dei malati. La mitrale, presumibilmente a causa dell'elevato carico pressorio cui è sottoposta, è assolutamente la valvola maggiormente danneggiata nella s. di M. L'insufficienza della mitrale è più frequente nei pazienti di sesso femminile. Fre-quente anche la calcificazione dell'*anulus* della mitrale. Pazienti affetti da s. di M. e con scarso danno scheletrico e/o oculare possono invece presentare una insufficienza val-volare grave che va quindi identificata e controllata in tempo e nel tempo. L'impegno della *valvola aortica* è anche molto frequente, e progredisce verso una severa insufficienza per graduale perdita di tenuta delle cuspidi, legata al danno strutturale del tessuto connettivo. La dilatazione dei seni di Valsalva spesso inizia a manifestarsi ancora *in utero* e si rileva all'ecocardiogramma nei neonati. Ovviamente il rischio di sviluppare insufficienza aortica è correlato con il grado di dilatazione.

Il maggiore rischio cardiovascolare deriva tuttavia dalla rottura dell'*aneurisma aortico*. La sede di comparsa dell'aneurisma è imprecisabile, in genere è molto vicina all'origine dell'arteria e quando avviene la rottura, questa in genere inizia nella porzione ascendente dell'aorta. Sebbene la sintomatologia legata alla rottura dell'aneurisma sia classica, molti pazienti non sanno descrivere alcun sintomo al momento del danno. Si può avere anche l'aneurisma disse-cante delle arterie coronarie (Claudon *et al.*, 1972) (v. ANEURISMI**).

Altri sintomi e condizioni frequenti

Nei malati affetti da s. di M. altre frequenti condizioni sono costituite dalla comparsa di ernie inguinali e diaframmatiche, dalla possibilità di pneumotorace spontaneo e dalla presenza, in circa il 35% dei pazienti, di «strie atrofiche», lesioni cutanee che compaiono durante la fanciullezza nelle

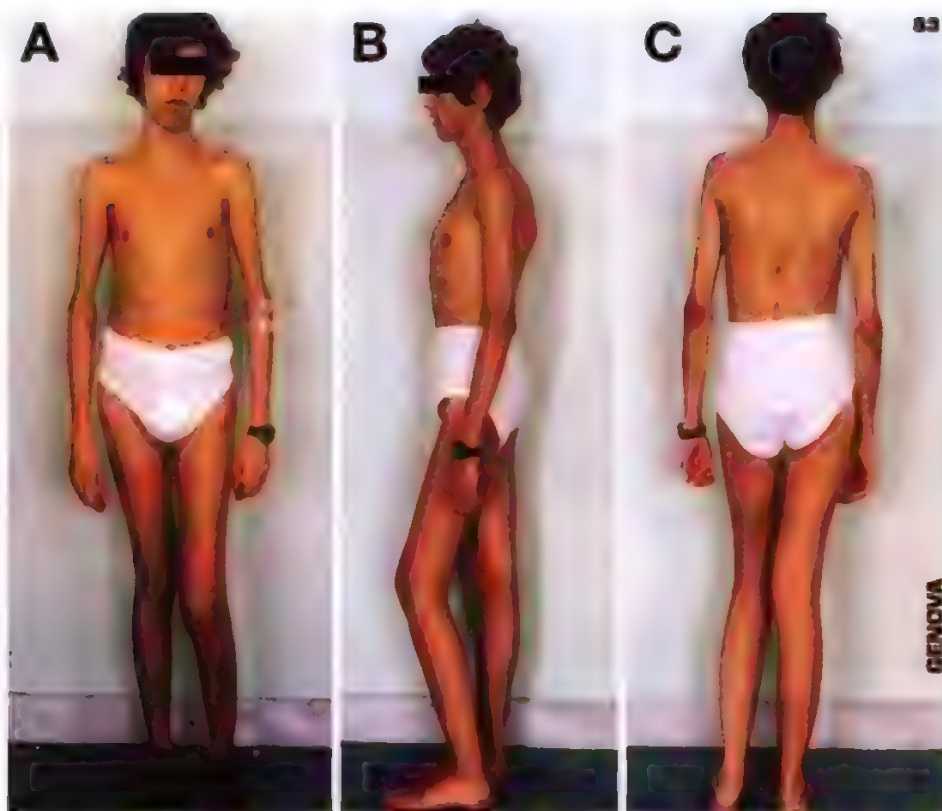


Fig. 6. Caso di s. di M. Il paziente presenta una evidente scoliosi (C) ed una asimmetria del bacino dovuta ad una «protrusione acetabuli» a livello dell'articolazione coxofemorale di sinistra (A-B). (Archivio Dr. M. Cutolo).

aree flessorie e che si riconoscono meglio all'epoca della pubertà. Recentemente, è stata dimostrata una ingravesciente osteopenia che secondo alcuni studi può predisporre, con l'avanzare dell'età a frequenti fratture. Mancano tuttavia indagini nell'età avanzata (Tobias *et al.*, 1995). Possibile anche l'associazione con altre patologie ereditarie.

Atteggiamento terapeutico e comportamento medico

Per quanto riguarda l'atteggiamento terapeutico, esclusa per ora la possibilità di una terapia causale e quindi genica, il trattamento del malato affetto da s. di M. è ovviamente multidisciplinare. La cura delle alterazioni scheletriche, che prevalgono in questa METC prevede anche terapie endocrinologiche, oltre a quelle chirurgiche. In effetti l'induzione, nelle bambine affette da s. di M., di una pubertà precoce, tramite la somministrazione quotidiana di estrogeni coniugati (Premarin® 10 mg) e, in aggiunta, per 14 giorni consecutivi al mese, di medrossiprogesterone acetato (Provera® 10 mg), può dare risultati notevoli sull'arresto dell'eccessiva crescita staturale (Peyeritz e McKusick, 1979). Ovviamente, è importante non iniziare il trattamento estrogenico troppo tempo prima della comparsa del menarca, al fine di non determinare una riduzione di altezza eccessiva rispetto alla norma.

L'esperienza sul trattamento dei maschi con androgeni è invece minima. D'altra parte, la chirurgia toracica e vertebrale permette di ridurre le malformazioni ivi presenti, ottenendo una prevenzione della restrizione respiratoria grave nei malati giunti in età matura, sempre che il danno cardiaco non abbia indotto un decesso prematuro. Dal momento che la rottura improvvisa di un aneurisma aortico rappresenta la maggiore causa di decesso nei malati affetti da s. di M., il controllo del diametro aortico ed il suo trat-

tamento chirurgico sembra l'approccio profilattico-terapeutico più ovvio.

Naturalmente, le attività sportive che impongono sforzi improvvisi e scontri fisici (pallacanestro) o la pratica di esercizi isometrici, vanno assolutamente evitati.

Esiste un betabloccante, il propranololo, che a basse dosi ha dimostrato di ridurre nel tempo la dilatazione dell'aorta aneurismatica. Il meccanismo di azione sembra legato ad un intervento diretto del farmaco sulla organizzazione della matrice proteica extracellulare con un incremento dei legami crociati del collagene e dell'elastina ed un aumento quindi della resistenza tessutale. Un recente studio aperto, effettuato su malati affetti da s. di M. e trattati con propranololo, ad un dosaggio medio totale di 212 ± 68 mg/die e divisi in quattro somministrazioni per una media di sette-nove anni, ha dimostrato una significativa riduzione della dilatazione aortica ($p < 0,001$) rispetto ai malati non trattati (Shores *et al.*, 1994). Recentemente, risultati positivi, si sono ottenuti anche con l'impiego dell'atenololo e del metoprololo.

Il comportamento del medico nei confronti dei malati affetti da s. di M., oltre al controllo nel tempo della funzionalità degli organi maggiormente colpiti (ad es. cuore, occhio, scheletro), deve prendere in considerazione anche i gravi problemi psicosociali del soggetto malato. La coscienza di «vedersi» diverso ed «essere visto» diverso, richiede un continuo impegno affinché ciò non diventi motivo di sconforto irrisolvibile. Quindi, compatibilmente con la funzionalità degli organi affetti, il soggetto deve venire inserito in qualsiasi ambiente e poter praticare attività sportive anche se sotto stretto controllo medico. Il livello di intelligenza dei malati affetti da s. di M. valutato secondo i test standard (Q.I.) risulta comunque nella norma (Hofman

TAB. II. NORME DI COMPORTAMENTO CLINICO E TERAPEUTICO NELL'ASSISTENZA DEI MALATI AFFETTI DALLA SINDROME DI MARFAN

(da Cutolo et al., 1994)

	Neonati	Età prescolare (5 anni)	Pubertà (10-20 anni)	Adulti
Cuore	Ecocardiogramma Ecocardiogramma nei genitori se è affetto il primogenito	Ripetere ecocardio Beta-bloccanti se familiarità per cardiopatia	Ecocardiogramma ogni 1-2 anni Restrizione dell'esercizio fisico intenso e degli sport violenti	Periodici ecocardiogrammi Consigli sull'eventuale trattamento chirurgico della patologia cardiaca
Occhio	Ricercare eventuale ectopia lentis, strabismo	Correzione della miopia, se presente	In presenza di «ectopia lentis», attenzione alla insorgenza di glaucoma	Visite oculistiche periodiche, se necessario
Scheletro	Misurare la statura	Misurare la statura; ricercare eventuale scoliosi e piedi piatti	Ricercare eventuale scoliosi fino all'età di 18 anni	Eventuale terapia chirurgica della scoliosi
Polmone			A 18 anni controllo radiografico toracico per ricercare bolle sottopleuriche e fibrosi	
Aspetti genetici	Informare i genitori. Rischio del 50% alla gravidanza successiva se uno dei genitori è affetto. Inseminazione artificiale? Adozione?	«Perché sono diverso dagli altri?» (possibile stress psicologico)	Fornire spiegazioni sulla ereditarietà della malattia e consigli sulle eventuali gravidanze e su come informare il/la fidanzato/a	
Aspetti psico-sociali	Sollevare i genitori dal senso di colpa, tristezza, impotenza a risolvere il problema	Stress psicologico; consigli	Consigli sulle possibilità di inserimento sociale	Diagnosi post-matrimoniale

et al., 1988). Nella tab. II vengono sintetizzati alcuni consigli di comportamento da attuare nel corso della vita del paziente affetto da s. di M. (Cutolo et al., 1994).

Bibliografia

- Beighton P., McKusick's *Heritable Disorders of Connective Tissue*, 1993, 5 ed., Mosby, St. Louis.
 Cadle R., Hall B., *Am. J. Med. Genet.*, 1989, **32**, 239.
 Child J. S., Perloff J. K., Kaplan S., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1989, **14**, 429.
 Claudon D. G. et al., *Circulation*, 1972, **45**, 259.
 Cutolo M., Sulli A., Barone A., Serio B., Accardo S., *Reumatismo*, 1994, **47**, 216.
 Hofman K. J., Bernhardt B. A., Pyeritz R. E., *Am. J. Med. Genet.*, 1988, **31**, 331.
 Kainulainen K., Pulkkinen L., Savolainen A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 935.
 Kainulainen K., Karttunen L., Lonnqvist L., *Fibrillin mutations produce diverse clinical phenotypes*, in Cutolo M. ed., *Workshop on The Heritable Disorders of the Connective Tissue: from the Biology to the Clinic*, *Eur. J. Histochem.*, 1993, 37/3.
 Kainulainen K., Karttunen L., Puhakka L. et al., *Nature Genetics*, 1994, **6**, 64.
 Marfan A. B., *Bull. Mém. Soc. Med. Hôp Paris*, 1896, **13**, 220.
 Maumenee I. H., *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 1981, **79**, 684.
 Pyeritz R. E., McKusick V. A., *N. Engl. J. Med.*, 1979, **300**, 772.
 Royce P. M., Steinmann B., *Connective tissue and its heritable disorders*, 1993, Wiley-Liss, New York.
 Sakai L. Y., Keene D. R., Engvall E., *J. Cell Biol.*, 1986, **103**, 2499.
 Shores J., Berger K. R., Murphy E. A., Pyeritz R. E., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 1335.
 Tobias J. H., Dalzell N., Child A. H., *Br. J. Rheumatol.*, 1995, **34**, 516.
 Tsipouras P., Del Mastro R., Sarfarazi M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 905.
 Zhang H., Hu W., Ramirez F., *J. Cell Biol.*, 1995, **129**, 1165.

MAURIZIO CUTOLO

MARIHUANA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3574): - Effetti farmacologici acuti (col. 3575). - Meccanismo d'azione (col. 3575). - Effetti dell'uso ripetuto (col. 3576).

Introduzione

Nel continente americano tutte le preparazioni di *Cannabis* sono chiamate generalmente *marijuana*, anche se spesso tale termine viene riservato alle droghe contenenti parti riconoscibili dalla pianta (foglie apicali, infiorescenze resinose femminili) per distinguerle dalla resina e cioè dall'*hashish* (nella dizione araba) o dal *charas* (nella dizione indiana). Alle preparazioni di foglie e infiorescenze fa riferimento il termine *marihuana* [m.] adottato nell'EMI.

Il contenuto medio di Δ^9 -THC (*trans*-tetraidrocannabinolo con doppio legame in posizione 9), il principio attivo della *Cannabis* al quale è dovuto l'abuso nell'uomo [v. CANAPA INDIANA, III, 597], si aggira intorno all'1% nelle preparazioni di m. presenti nel mercato occidentale e al 5-19% nell'*hashish*. Se si considera un contenuto medio per sigaretta di 500 mg di m. e una biodisponibilità di circa il 50%, la dose di Δ^9 -THC assorbita attraverso il fumo di una sigaretta di m. è circa 2,5 mg.

Negli ultimi anni il titolo in principio attivo della m. disponibile nel mercato è aumentato considerevolmente a causa della utilizzazione di *cultivar* selezionate di *Cannabis* che contengono una percentuale di Δ^9 -THC circa 10-20 volte superiore a quello delle *cultivar* tradizionali.

Effetti farmacologici acuti

Attraverso il fumo gli effetti della *Cannabis* insorgono entro 2-3 minuti, raggiungono un massimo in 10-20 minuti e terminano dopo circa 2 ore [v. ALLUCINOGENI, I, 1320; Agg. I, *234].

Nell'uomo tutti gli effetti più importanti della *Cannabis* possono essere riprodotti dal Δ^9 -THC. Gli effetti subiettivi consistono in moderata euforia, aumento dell'attenzione e senso subiettivo di maggiore acuità delle sensazioni, alterazione della percezione del tempo che sembra scorrere più lento, senso di rilassamento e passività. A dosi più elevate si hanno vuoti nella memoria a breve termine e nell'attenzione, alterazioni del pensiero e una sensazione di disagio che prelude, a dosi molto elevate, ad una vera sindrome di depersonalizzazione, alterazioni dello schema corporeo, distorsioni sensoriali. In alcuni individui sono state riportate vere reazioni di panico, con allucinazioni e ideazioni paranoiche, simili al *bad trip* che si può osservare con l'LSD e gli altri allucinogeni.

Gli effetti somatici della m. nell'uomo consistono in iniezione congiuntivale, aumento dell'appetito, astenia, sonnolenza, atassia e incoordinazione motoria, secchezza delle fauci, riduzione della pressione intraoculare, aumento della frequenza cardiaca e della pressione sistemica, vasodilatazione corneale.

Meccanismo d'azione

Il Δ^9 -THC esercita i suoi effetti centrali e periferici perché stimola recettori specifici. Due recettori ai cannabinoidi, sono stati recentemente clonati, l'uno localizzato nel sistema nervoso centrale (CB_1) ed l'altro localizzato nel sistema nervoso periferico (CB_2). Il recettore centrale ai cannabinoidi è un tipico recettore metabotropo che utilizza come meccanismo di trasduzione l'inibizione dell'adenilato ciclasi.

La sintesi di enantiomeri ad attività cannabinoide marcati con tritio ad alta attività specifica, ha reso possibile la dimostrazione e lo studio della distribuzione dei recettori al Δ^9 -THC (fig. 1). I recettori al Δ^9 -THC sono concentrati nei gangli della base, nel cervelletto, nel sistema limbico e nella corteccia cerebrale; tale distribuzione ben si accorda con gli effetti centrali della *Cannabis*.

Recentemente è stato isolato un composto endogeno ad attività cannabinoide, l'anandamide (fig. 2), un derivato etanolamidico di un acido grasso presente nelle membrane cellulari, l'acido arachidonico; l'anandamide potrebbe svol-

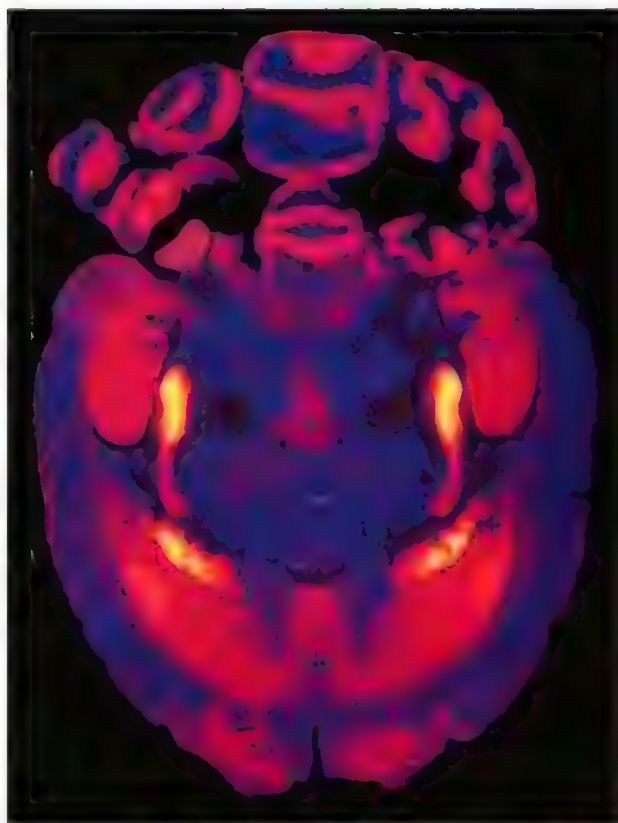


Fig. 1. Autoradiografia della distribuzione dei recettori al Δ^9 -THC nel cervello di ratto. Si può notare l'elevata densità dei recettori nel caudato-putamen, globo pallido, substantia nigra, cervelletto, ipocampo e corteccia prefrontale. (Da Herkenham et al., 1991).

gere un ruolo importante come modulatore dell'attività funzionale delle cellule del sistema nervoso centrale che esprimono recettori ai cannabinoidi.

Effetti dell'uso ripetuto

Studi clinici controllati hanno dimostrato che l'uso costante di elevate quantità di Δ^9 -THC (240 mg al giorno suddivisi

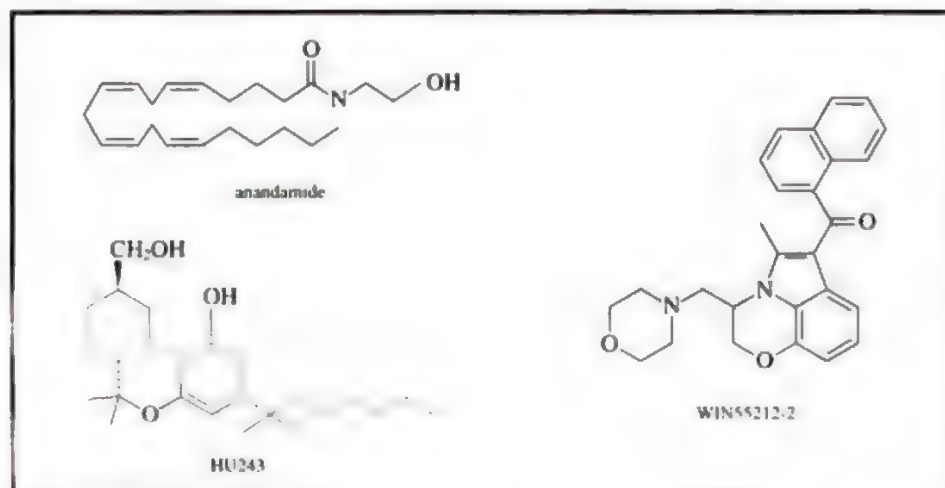


Fig. 2. Struttura chimica dell'agonista endogeno dei recettori al Δ^9 -THC (anandamide) e di due analoghi sintetici (HU 243 e WIN 55212-2).

in 6 dosi) determina una tolleranza alla maggior parte degli effetti a partire dal 5°-10° giorno di somministrazione; la sospensione della stessa somministrazione provocava una sindrome di astinenza caratterizzata da disturbi del sonno, irritabilità, irrequietezza, diminuzione dell'appetito, sudorazione, riduzione di peso per perdita di liquidi. Questa sindrome appare piuttosto lieve in confronto a quella di astinenza all'alcool, ai barbiturici o agli oppiacei. Recentemente è stato sintetizzato un composto ad attività antagonista degli effetti del Δ^9 -THC (SR 141716-A) capace di precipitare una crisi di astinenza in soggetti cronicamente esposti al Δ^9 -THC. Alla m. è stato imputato il ruolo di iniziazione nell'escalation verso le droghe pesanti (eroina, allucinogeni, cocaina). Ciò potrebbe essere vero nella misura in cui l'esperienza e la domestichezza con la m. contribuiscono a far cadere il tabù, tipicamente occidentale, dell'essere sotto l'influenza di sostanze capaci di alterare in maniera sottile l'attività psichica, le percezioni e le emozioni.

L'uso cronico di m. è stato ritenuto responsabile della cosiddetta «sindrome amotivazionale», che tuttavia non appare specifica della m., essendo piuttosto un tratto distintivo della tossicomania in generale e cioè della sostituzione delle comuni motivazioni con quella dominante della ricerca e del consumo della droga (v. TOSSICOMANIE [v.: v.**]).

La m. può provocare in certi individui una condizione di tossicodipendenza e di tossicomania. L'incidenza di questa condizione è destinata ad aumentare con l'aumento del titolo in principi attivi delle preparazioni commerciali di *Cannabis*.

Bibliografia

- Devane W. A., Dysarz F. A. I., Johnson M. R. et al., *Mol. Pharmacol.*, 1988, **34**, 605-613.
Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R. et al., *J. Neurosci.*, 1991, **11**, 563-583.
Howlett A. C., Johnson M. R., Melvin L. S., Milne G. M., *Mol. Pharmacol.*, 1988, **33**, 297-302.

- Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J. et al., *Nature*, 1990, **346**, 561-563.
Mechoulam R., Shani A., Edery H., Grunfeld Y., *Science*, 1970, **169**, 611-612.

GAETANO DI CHIARA

MASA SINDROME: V. CRASH, SINDROME** (col. **1426); PARAPLEGIA SPASTICA FAMILIARE**.

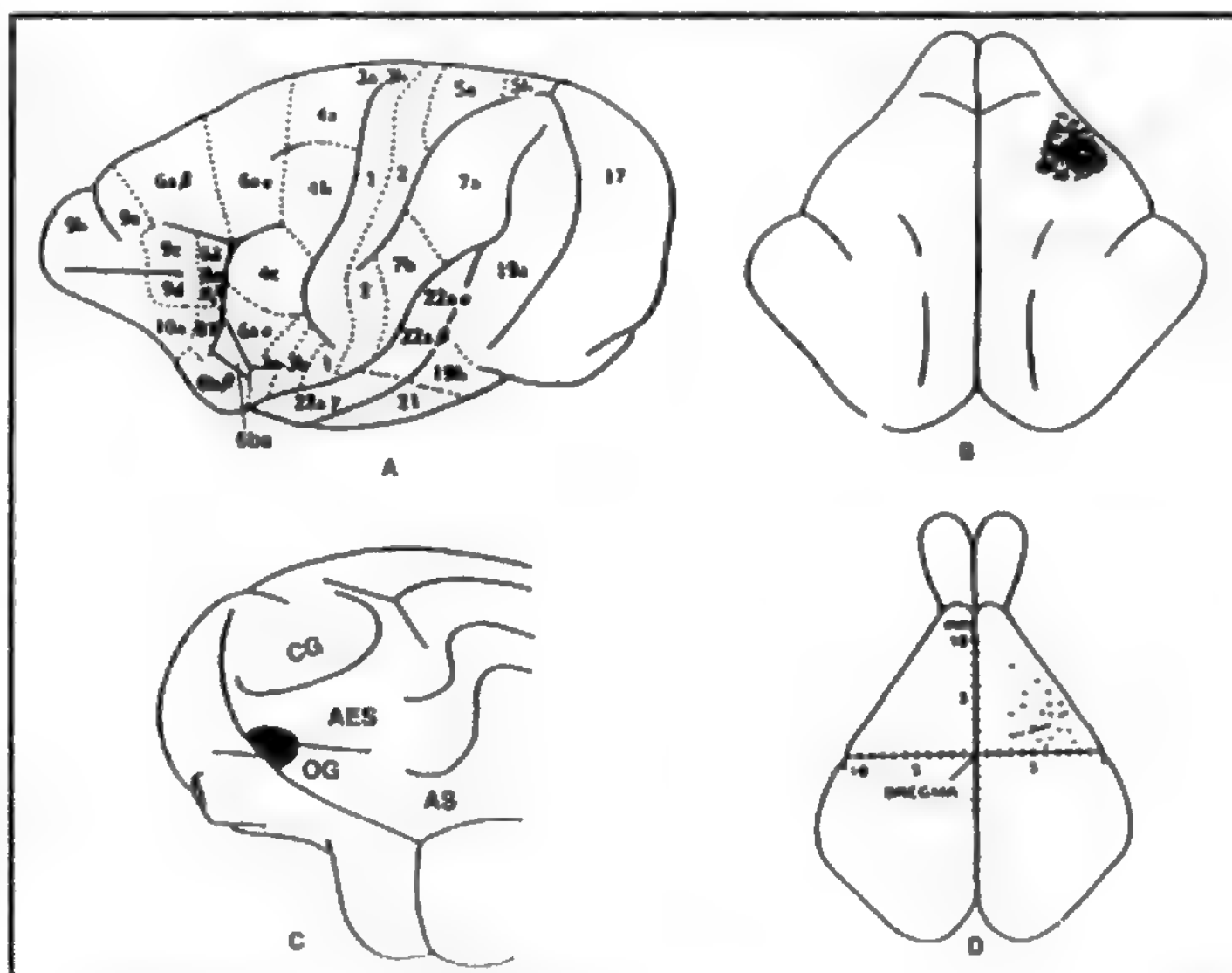
MASTICAZIONE [v. vol. IX, coll. 446-447; Agg. I, coll. *4861-4880]

Controllo nervoso della masticazione

È oggi generalmente ammesso che la masticazione [m.] è comandata da un meccanismo centrale o «generatore centrale» a sede troncoencefalica, che determina il modello e il ritmo di base dei movimenti masticatori (*central pattern generator*, CPG) e il cui funzionamento è sotto il controllo di centri corticali e sottocorticali e viene modulato da informazioni provenienti dalla periferia stomatognatica, in modo che risulti continuamente adattato ai differenti caratteri dei vari cibi e alle modifiche che questi subiscono nel corso della stessa m., dalla loro introduzione nella bocca fino alla fase immediatamente predeglutitoria (v. MASTICAZIONE*, coll. *4875-4878). In questi ultimi anni nuovi dati sono stati acquisiti su questo generatore centrale, sulla sua localizzazione, sulle modalità di funzionamento e sui collegamenti con i centri superiori e con la periferia, anche se non poco resta ancora da chiarire, specie sull'organizzazione dei circuiti neuronali e sulle specifiche proprietà funzionali dei gruppi di neuroni coinvolti.

È nota da tempo la possibilità di indurre in diverse specie animali movimenti masticatori ritmici mediante stimolazione di varie strutture encefaliche, corticali e sottocorticali (quali amigdala, capsula interna, gangli della base, ipotalamo laterale, alcune zone del tronco encefalico). Particolarmente studiata è l'area masticatoria corticale (fig. 1),

Fig. 1. L'area masticatoria corticale: A) scimmia (area 6 ba); B) cavia; C) gatto; D) coniglio (area punteggiata). AES, giro ectosilviano anteriore; AS, giro silviano anteriore; CG, giro coronale; OG, giro orbitario.



dalla cui stimolazione è possibile ottenere movimenti ritmici della mandibola, accompagnati da movimenti coordinati della lingua ed anche da secrezione di saliva, risultandone nel complesso un modello di comportamento orofacciale strettamente somigliante alla m. naturale, cosicché si è fortemente indotti a ritenere che questa risposta da stimolazione corticale coinvolga a livello troncoencefalico gli stessi elementi neuronali che sono implicati nell'attività del generatore centrale nella m. naturale, per cui la si è spesso utilizzata come modello nello studio di quest'ultima.

Uno degli aspetti di maggior rilievo messi recentemente in evidenza da vari studi sulla risposta masticatoria da stimolazione corticale in differenti condizioni sperimentali è la possibilità di indurre variazioni della frequenza dei movimenti ritmici dei muscoli masticatori indipendentemente da modificazioni della loro ampiezza (o altri loro caratteri), e viceversa. In accordo con queste osservazioni si può assumere che il CPG masticatorio sia articolato in due gruppi neuronali funzionalmente distinti: un gruppo di neuroni che genera il ritmo masticatorio, emettendo il segnale di tempo per l'alternanza ritmica dell'abbassamento e dell'elevazione della mandibola (*central rhythm generator*, CRG), e l'altro gruppo che genera il modello spaziotemporale delle attività dei muscoli della mandibola, della lingua e della faccia. Si postula che questo gruppo di neuroni riceva il segnale ritmico dal CRG, lo integri con altri segnali di origine centrale e periferica e trasmetta ai motoneuroni cranici dei muscoli della mandibola, della lingua e della faccia il comando motorio per attuare il modello di movimenti masticatori di volta in volta più idoneo (Nakamura e Katakura, 1995).

Questo complesso meccanismo generatore centrale, la cui attività ritmica di base è opportuno ricordare che può essere sperimentalmente evocata senza la partecipazione di livelli cerebrali superiori o di afferenze dalla periferia (v. MASTICAZIONE*, coll. *4876-4877), viene localizzato nella sostanza reticolare ponto-bulbare. Sulla base di nuovi dati ottenuti dallo studio della risposta masticatoria alla stimolazione corticale, analizzata sia elettrofisiologicamente, con la registrazione di attività neuronali singole e di massa, sia morfologicamente con la marcatura con perossidasi di rafano per individuare i rapporti tra i neuroni coinvolti, è stato proposto recentemente uno schema di organizzazione della catena neuronale attraverso cui viene generato il comando ritmico e viene trasmesso ai motoneuroni trigeminali dei muscoli masticatori. La mappa rappresentata nella fig. 2 è stata costruita da osservazioni compiute sulla cavia (Nakamura e Katakura, *loc. cit.*). In sintesi, secondo questa ricostruzione, l'attività ritmica si genera nella porzione orale del nucleo reticolare gigantocellulare (GCo) e regione adiacente della parte dorsomediale della formazione reticolare bulbare. Da queste strutture, che pertanto sarebbero da identificarsi con il CRG, vengono ritmicamente eccitati monosinapticamente i neuroni della formazione reticolare parvocellulare bulbare (PCRF), dorsolaterale alla porzione caudale del nucleo reticolare gigantocellulare (GCe). Nella PCRF si trovano i neuroni premotori che proiettano, per contatto sinaptico diretto, ai motoneuroni del nucleo motore del trigemino (NV) per i muscoli elevatori e per quelli abbassatori della mandibola, proiezioni che possono essere dirette oltre che all'NV dello stesso lato anche a quello contralaterale. Il GCo e regione adiacente contraggono, a monte, connessioni monosinaptiche eccitatorie con i neuroni della parte dorsale del nucleo reticolare paragigantocellulare (dPGC) dello stesso lato. Questo a sua volta riceve proiezioni dalla parte posteriore dell'area masticatoria corticale, principalmente del lato opposto, e dalle fibre cuneobulbari del tratto piramidale (PT) che sono in rapporto

monosinaptico eccitatorio con i neuroni del dPGC. E se si stimola ripetitivamente la corteccia masticatoria da dove provengono queste proiezioni, registrando simultaneamente le attività di singole unità neuronali dalle regioni del dPGC e del GCo, si osserva che l'attività evocata dai neuroni del dPGC è cadenzata con una breve latenza su ogni stimolo portato sulla corteccia ma non ha caratteri di ritmicità,

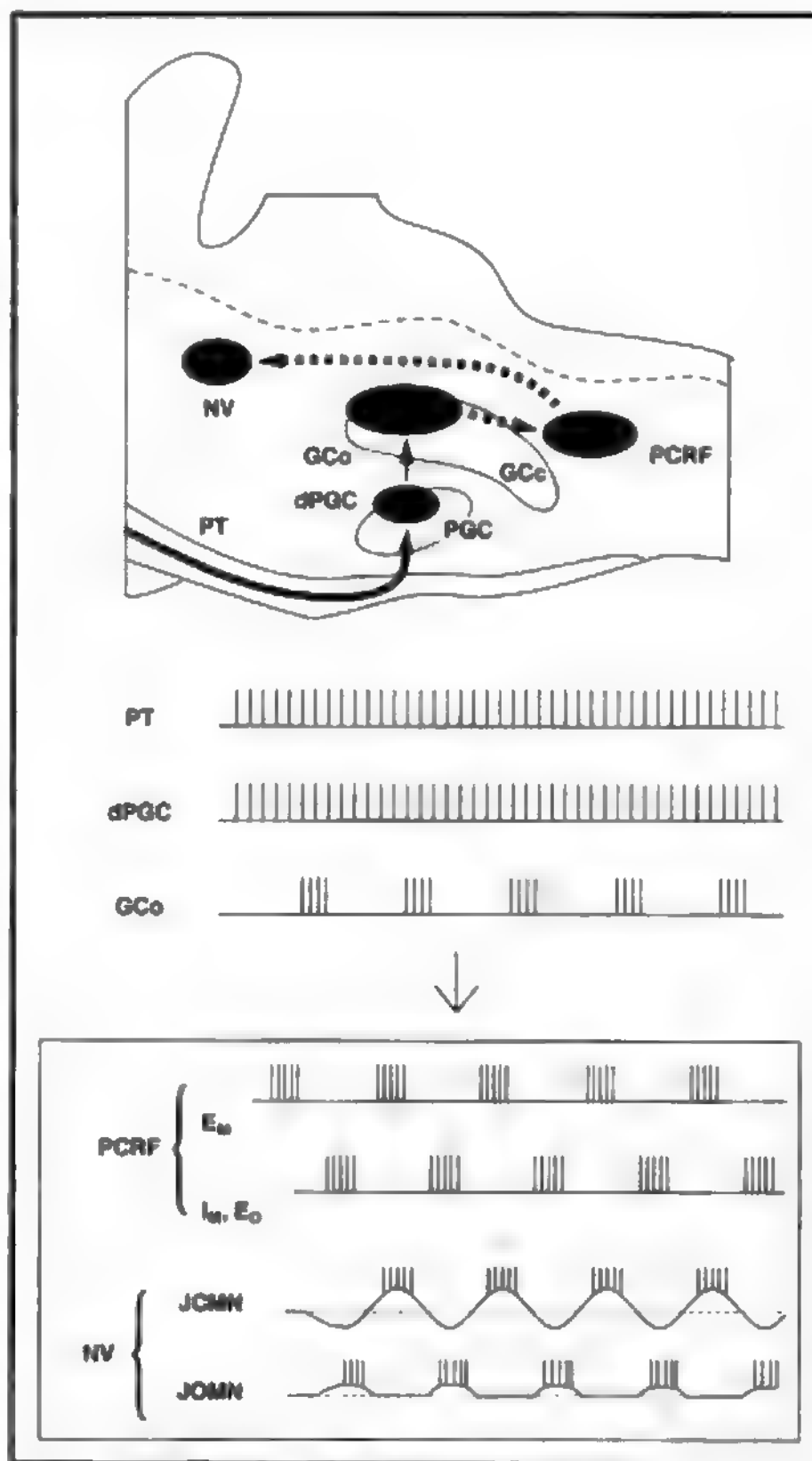


Fig. 2. Localizzazione del CRG masticatorio nella cavia. In alto, schema della catena neuronale dal tratto piramidale (PT) al nucleo motore del trigemino (NV), sul piano sagittale del tronco encefalico; le frecce continue e quelle tratteggiate rappresentano rispettivamente attività neuronali non ritmiche e ritmiche. Al centro e in basso, tracciati dell'attività di singoli neuroni registrata dai rispettivi siti (indicati a sinistra) della via neuronale. Il ritmo è generato in GCo (porzione orale del nucleo reticolare gigantocellulare) ed è assunto dai neuroni della PCRF (formazione reticolare parvocellulare) e dai motoneuroni trigeminali (NV) nella relazione di fase indicata nel pannello in basso. I tracciati del pannello centrale e i primi due di quello inferiore rappresentano potenziali a punta extracellulare, mentre gli ultimi due rappresentano potenziali intracellulari di motoneuroni di muscoli elevatori (JCMN) e abbassatori (JOMN) della mandibola (le linee tratteggiate indicano il livello del potenziale di riposo). Per le altre abbreviazioni cfr. testo (da Nakamura e Katakura, 1995).

mentre diventa ritmica quella che si registra dai neuroni della regione del GCo, cui si attribuisce appunto il ruolo di generatore del ritmo masticatorio (fig. 2). Sembra esistere, in base a osservazioni di AA. diversi, un CRG masticatorio in entrambi i lati del tronco encefalico e l'attività simmetrica bilaterale dei due centri ritmogeni verrebbe assicurata da un sistema commessurale a livello della parte ventrale del midollo allungato.

Si è già detto (v. sopra) che nella cavia si localizzano nella formazione reticolare parvocellulare (PCRf) neuroni premotori che fanno da relé tra il CRG masticatorio e i motoneuroni trigeminali: è stata, infatti, accertata nella PCRf la presenza di neuroni che dopo iniezione di perossidasi di rafano nel nucleo motore trigeminale risultano marcati in via retrograda o che rispondono antidromicamente a una microstimolazione selettiva di motoneuroni del muscolo massetere o del digastrico nel suddetto nucleo motore e reagiscono ortodromicamente a una stimolazione dell'area masticatoria corticale. Sono stati individuati 3 tipi di neuroni premotori trigeminali: un tipo eccitatorio (E_M) ed uno inibitorio (I_M), che si alternano ritmicamente nella loro attività e proiettano ai motoneuroni del massetere e altri muscoli elevatori della mandibola, e un terzo tipo (E_D), eccitatorio, che proietta la sua attività ritmica ai motoneuroni del digastrico e altri muscoli abbassatori (fig. 2). Corrispondentemente, i motoneuroni dei muscoli elevatori della mandibola (JCMN, *jaw-closing motoneuron*) presentano un'attività ritmica alternata di eccitazione e inibizione in coincidenza rispettivamente con le fasi di chiusura e apertura della bocca, mentre quelli dei muscoli abbassatori (JOMN, *jaw-opening motoneuron*) mostrano solo un'eccitazione ritmica (non alternata con inibizione) coincidente con la fase di apertura.

L'inibizione dei motoneuroni JCMN nel corso della fase di apertura ha lo scopo di impedire l'attivazione riflessa da stiramento dei muscoli elevatori, provvisti abbondantemente di fusi neuromuscolari, che in qualche modo ostacolerebbe l'apertura della bocca, inibizione che invece non si registra a livello dei motoneuroni JOMN durante la fase di chiusura giacché non è possibile che si evochi un riflesso da stiramento dei muscoli abbassatori, virtualmente privi di fusi.

In realtà, durante la fase di chiusura della bocca, anche se non può innescarsi come ora si è detto un riflesso antagonista da stiramento dei muscoli abbassatori, potrebbe essere evocato un riflesso di apertura, per stimolazione meccanocettiva della mucosa orale da parte del cibo presente nella cavità buccale, se un tale riflesso non venisse, come in effetti avviene, opportunamente inibito in modo da consentire un'ottimale esecuzione del movimento di chiusura. Si tratta di una inibizione tonica, che si protrae per la durata della sequenza masticatoria, alla quale si aggiunge un'inibizione fasica in coincidenza dei singoli atti di chiusura. L'inibizione, però, non si esercita direttamente sui motoneuroni dei muscoli abbassatori della mandibola, ma su interneuroni dell'arco del riflesso di apertura.

Neuroni premotori che mediano l'output ritmico del CRG masticatorio ai motoneuroni trigeminali sono stati trovati nel gatto, nel ratto e nel coniglio, oltre che nella formazione reticolare parvocellulare, anche nelle zone circostanti il nucleo motore del trigemino (regioni sopratrigeminale, intertrigeminale e iuxtatrigeminale) e nell'ambito dei nuclei sensitivi di questo nervo. Nel gatto, ad es., nella porzione orale del nucleo spinale del trigemino sono stati individuati neuroni premotori di due tipi, che proiettano alcuni ai motoneuroni trigeminali dei muscoli elevatori e altri a quelli dei muscoli abbassatori della mandibola (Yoshida *et al.*, 1994).

La trasmissione del segnale eccitatorio ai neuroni premotori e ai motoneuroni trigeminali è, come nella maggior parte delle sinapsi

del S.N.C., di tipo glutammatergico. Secondo dati recenti (Inoue *et al.*, 1994), i segnali eccitatori diretti dal CRG ai premotoneuroni attivi nella fase di apertura sono mediati principalmente da recettori non-NMDA, mentre quelli per i premotoneuroni attivi nella fase di chiusura sono mediati sia da recettori NMDA che non-NMDA e si alternano a input inibitori glicinerfici. La trasmissione del segnale eccitatorio dai premotoneuroni ai motoneuroni dei muscoli abbassatori (JOMN) impegna sia recettori NMDA che non-NMDA (Katakura e Chandler, 1990). L'attivazione dei motoneuroni dei muscoli elevatori (JCMN) sembra mettere in gioco principalmente recettori non-NMDA (Chandler, 1989) e la loro inibizione ad opera dei neuroni I_M durante la fase di apertura è mediata dalla glicina (Nozaki *et al.*, 1993).

Numerose recenti osservazioni confermano che su neuroni premotori del meccanismo centrale masticatorio, accanto ai segnali ritmici emessi dal CRG e ad afferenze dalla periferia stomatognatica, convergono input da livelli encefalici superiori. Così, nel ratto si è trovato che la *pars reticulata* della sostanza nera invia proiezioni dirette o tramite il collicolo superiore ai premotoneuroni della formazione reticolare parvocellulare (von Krosigk e Smith, 1991; Yasui *et al.*, 1992, 1994), costituendo parte di una via extrapiramidale che attraverso i gangli della base può influenzare la m. e, più in generale, il comportamento oro-facciale. Nella cavia sono stata individuate di recente (cfr. Nakamura e Katakura, 1995) vie che dalla parte anteriore della corteccia masticatoria terminano nel collicolo superiore e in minor misura nella parte dorsolaterale della formazione reticolare mesencefalica ipsilaterale. Dal collicolo superiore fibre proiettano poi alla formazione reticolare parvocellulare adiacente al nucleo spinale del trigemino nel bulbo, mentre dalla formazione reticolare mesencefalica proiezioni extrapiramidali discendono controlateralmente fino alla formazione reticolare bulbare. Il controllo extrapiramidale sulla m. va ad affiancarsi a quello esercitato dall'area masticatoria corticale con le sue proiezioni sui neuroni della formazione reticolare gigantocellulare tramite fibre corticobulbari del tratto piramidale. L'equilibrata integrazione di questi due sistemi centrali di controllo concorre ad assicurare l'esecuzione ottimale della funzione masticatoria (cfr. Mogoseanu *et al.*, 1993).

Anche il cervelletto partecipa al controllo della m. Già da diversi anni sono state documentate numerose proiezioni afferenti dai nuclei sensitivi trigeminali alla corteccia della zona intermedia degli emisferi e al nucleo interposito, attraverso le quali il cervelletto riceve continuamente informazioni (tattili, meccanocettive, propriocettive) dal territorio oro-facciale. Più recentemente, si è osservato che la stimolazione del nucleo interposito può modificare l'attività di motoneuroni trigeminali nonché il ritmo dei movimenti masticatori indotti da stimolazione dell'area masticatoria corticale. Attualmente, si ritiene possa ammettersi che l'output dal nucleo interposito abbia un ruolo nel controllo della coordinazione dei movimenti masticatori utilizzando l'informazione trigeminale e possa modulare la loro ritmicità, esercitando i suoi effetti sia sul CRG masticatorio sia sui motoneuroni del trigemino.

Bibliografia

- Chandler S. H., *Brain Res.*, 1989, **477**, 252-264.
 Inoue T., Chandler S. H., Goldberg L. J., *J. Neurophysiol.*, 1994, **71**, 2061-2073.
 Katakura N., Chandler S. H., *J. Neurophysiol.*, 1990, **63**, 356-369.
 Mogoseanu D., Smith A. D., Bolam J. P., *J. Comp. Neurol.*, 1993, **336**, 53-65.
 Nakamura Y., Katakura N., *Neurosci. Res.*, 1995, **23**, 1-19.
 Nozaki S., Iriki A., Nakamura Y., *J. Neurophysiol.*, 1993, **69**, 595-618.
 von Krosigk M., Smith A. D., *Eur. J. Neurosci.*, 1991, **3**, 260-273.
 Yasui Y., Nakano K., Nakagawa Y. *et al.*, *Brain Res.*, 1992, **585**, 361-366.

Yasui Y., Tsumori T., Ando A. *et al.*, *Brain Res.*, 1994, **656**, 420-426.
Yoshida A., Yasuda K., Dostrovsky J. O. *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 1994, **347**, 495-514.

PIETRO D'ARCANGELO

Errata-corrigé

Alla col. *4868, Agg. I (vol. 3), 1 riga dell'ultimo capoverso, sostituire «con l'elettromiografia» con «graficamente».

MEDIASTINO [v. vol. IX, col. 545-666; Agg. I, coll. *4902-4931]

TUMORI E CISTI DEL MEDIASTINO IN ETÀ PEDIATRICA

SOMMARIO

Distribuzione e incidenza (col. 3583): *Sedi particolari e rare*. - **Sintomatologia e quadri clinici: caratteri generali** (col. 3592): *Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino anteriore*. - *Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino medio*. - *Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino posteriore*. - **Metodiche diagnostiche** (col. 3599). - **Conclusioni e indirizzo terapeutico** (col. 3601). - **La toracosopia nello studio del mediastino in età pediatrica** (col. 3602).

Distribuzione e incidenza

Nonostante che 1/3 delle tumefazioni mediastiniche del bambino siano asintomatiche e di casuale riscontro, spesso costituiscono un serio problema diagnostico-terapeutico: ciò è dovuto sia alla presenza di masse con caratteri istologici di malignità, sia a quelle lesioni che, in virtù del loro volume e della peculiare localizzazione topografica, sono capaci di provocare una sintomatologia compressiva spesso severa.

Caratteristicamente, ogni processo patologico che origina nel mediastino [m.] si sviluppa in una sede tipica, a seconda dell'organo o del residuo embrionale da cui pro-

TAB. I. TUMORI DEL MEDIASTINO IN ETÀ PEDIATRICA (0-14 ANNI)

Patologie frequenti	Patologie rare
<i>Timo</i>	<i>Timo</i>
Iperplasia timica vera	Timoma
Cisti	Sarcoma
Ectopia	Carcinoide
<i>Cisti</i>	<i>Cisti</i>
Broncogena	Pericardica
Eterogena	Mesoteliale
Neuroenterica	Pseudoaneurismatica
<i>Tumori neurogeni</i>	<i>Tumori neurogeni</i>
Neuroblastoma	Schwannoma
Ganglioneuroblastoma	Neurilemmoma
Ganglioneuroma	Chemodectoma
<i>Tumori vascolari</i>	<i>Tumori vascolari</i>
Emangioma	Emangiopericitoma
	Emangiocendoteloma
<i>Altri istotipi</i>	<i>Altri istotipi</i>
Teratoma	Lipoblastoma
Linfoma	Desmoids
Granuloma plasmacellulare	

viene: in questo modo le cisti, le iperplasie ed i tumori del timo si svilupperanno nel m. anteriore, le lesioni dei gangli della catena simpatica paravertebrale si localizzeranno nel m. posteriore e le patologie linfonodali saranno soprattutto tipiche del m. medio.

Tuttavia, in alcuni casi la sede originaria non rappresenta l'unica localizzazione di una massa, la cui crescita più o meno rapida dà luogo all'invasione di altri compartimenti o addirittura dell'intero m.: è quanto si osserva nel bambino affetto da alcuni tumori vascolari e linfatici a carattere benigno, quali l'emangioma cavernoso, l'emolinfangioma e il linfangioma. Analogo comportamento si osserva anche in caso di alcune patologie maligne, come le neoplasie dei tessuti molli, fibrosarcomi e rhabdomyosarcomi (RMS), i tumori del sistema linfatico, linfomi Hodgkin e non-Hodgkin, oppure taluni disgerminomi particolarmente aggressivi e a rapidissimo accrescimento, come gli *Yolk Sac Tumours*.

La tab. I riporta un elenco dei tumori del m. più frequenti nel bambino, mentre la tab. II riporta gli istotipi e la corrispondente incidenza dei tumori e cisti del m. nel bambino, rispetto all'età adulta.

TAB. II. TUMORI E CISTI DEL MEDIASTINO*

Istotipi e incidenza in età pediatrica		Istotipi e incidenza in età adulta	
Tumori neurogeni	33%	Tumori neurogeni	23%
Linfomi	24,6%	Timomi	18%
Cisti intestino anteriore primitivo	10,3%	Linfomi	16%
Disgerminomi	9%	Tumori endocrini	10,8%
Lesioni timiche benigne	5,6%	Disgerminomi	10%
Tumori mesenchimali	5%	Cisti intestino anteriore primitivo	7,3%
Sarcomi	4%	Tumori mesenchimali	7%
Altre patologie linfonodali	3%	Cisti pericardiche	6%
Timomi	0,7%	Miscellanea	1,9%
Cisti pericardiche	0,3%		
Miscellanea	4,5%		

* La serie pediatrica è costituita da 679 casi riportati dai seguenti AA.: Heimburger e Battersby, 1965; Haller *et al.*, 1969; Grosfeld *et al.*, 1971; Whittaker e Lynn, 1973; Pokorny, 1983; Bower e Kiesewetter, 1977; King *et al.*, 1982. La serie adulta è costituita da 720 casi riportati dagli AA. indicati nella tab. III.

TAB. III. TUMORI E CISTI DEL MEDIASTINO* (Diversa percentuale di incidenza nei tre compartimenti mediastinici)

	Età pediatrica (0-16 anni)	Età adulta (> 16 anni)
Mediastino anteriore (MA)	28,6%	45,4%
Mediastino medio (MM)	21,6%	26,5%
Mediastino posteriore (MP)	49,8%	28,1%

* La serie pediatrica è composta da 679 casi riportati dai vari AA.: Heimburger, Haller, Grosfeld, Whittaker, Pokorny, Bower, King. La serie adulta è costituita da 720 casi riportati dai seguenti AA.: Fontenelle *et al.*, 1971; Benjamin *et al.*, 1972; Rubush *et al.*, 1973; Luosto *et al.*, 1978; Ovrum e Birkeland, 1979.

È molto utile definire in quale compartimento del m. (anteriore, medio, posteriore) è situata la lesione, poiché ciò orienta verso una diagnosi iniziale e la conseguente via d'accesso chirurgica (tab. III).

Nei bambini, le patologie che più comunemente si riscontrano nel m. anteriore (MA) sono lesioni timiche, teratomi, linfomi e tumori angiomasiosi. Il m. medio (MM) è invece la sede più comune di lesioni cistiche, che devono essere indicate più correttamente come malformazioni dell'intestino anteriore primitivo, ma anche di linfomi e di altre patologie linfonodali neoplastiche tra cui l'istiocitosi a cellule di Langerhans oppure benigne come la TBC. Nel m. posteriore (MP) più frequentemente si osservano i tumori neurogeni e le duplicazioni enterogene, anche se non vanno escluse a priori alcune patologie ad evidenza neonatale come il mielomeningocele e altre proprie delle età successive come le ectopie timiche e i lipoblastomi isolati o diffusi (lipoblastomatosi [fig. 1]).

Accanto a queste patologie più frequenti, i tre compartimenti mediastinici possono ospitare, in età pediatrica, alcune tumefazioni meno frequenti, che pongono difficili problemi di diagnosi differenziale, talora risolti solamente all'atto dell'intervento. Di riscontro inusuale sono infatti nel MA i desmoidi, alcuni tumori mesenchimali (tra cui i lipoblastomi e i lipomi), le cisti pleuropericardiche (o mesoteliali) e le neoplasie germinali ad elevata malignità, teratocarcinomi soprattutto. Il MM può essere sede di una neof ormazione metastatica, di un granuloma plasmacellulare o di un sarcoma (più frequenti sono i rhabdomyosarcomi). Altrettanto difficile appare il riscontro di una cisti idatidea oppure di un feocromocitoma nel MP. Appare quindi evidente come il m. nel suo complesso possa essere nell'infan-

zia, più che nell'età adulta, paragonato a un vaso di Pandora, per l'eterogeneità e la molteplicità delle lesioni che in esso possono allocare.

Dal punto di vista della distribuzione, il 50% circa delle masse mediastiniche dell'infanzia sono di pertinenza del MP, mentre solamente il 21% occupa il MM ed il 28,6% ha sede nel MA. Del tutto opposta è la distribuzione nell'età adulta (tab. III). In una serie di 544 piccoli pazienti osservati da cinque differenti AA., il gruppo delle neof ormazioni maligne è pari al 60% del totale.

I tumori neurogeni, i linfomi e i teratomi costituiscono nell'ordine le più frequenti patologie del m. nel bambino; insieme, rappresentano il 76% delle masse solide ed il 67% di tutte le lesioni riscontrabili.

I linfomi, Hodgkin e non-Hodgkin (fig. 2), sono il gruppo di neoplasie maligne del mediastino più spesso diagnosticate in età pediatrica anche se assai raramente si presentano come lesioni isolate, poiché la malattia è già sistemica e presente spesso contemporaneamente con localizzazioni addominali, linfonodali oppure intraparenchimali (infiltrati renali, epatici, splenici, talora gonadici). Eccezionalmente si può diagnosticare un linfoma intrapolmonare isolato con linfadenopatia mediastinica consensuale.

Come nel bambino, anche nell'adulto i tumori neurogeni sono al primo posto per incidenza, precedendo tuttavia i timomi, rarissimi al di sotto dei 14 anni, i linfomi, ed un gruppo omogeneo per frequenza costituito dai teratomi e dai tumori endocrini (10% e 10,8% rispettivamente); questi ultimi sono tipici del secondo decennio di vita. I neuroblastomi e i neurofibromi (fig. 3), questi ultimi come parte della neurofibromatosi multipla o malattia di von Recklin-

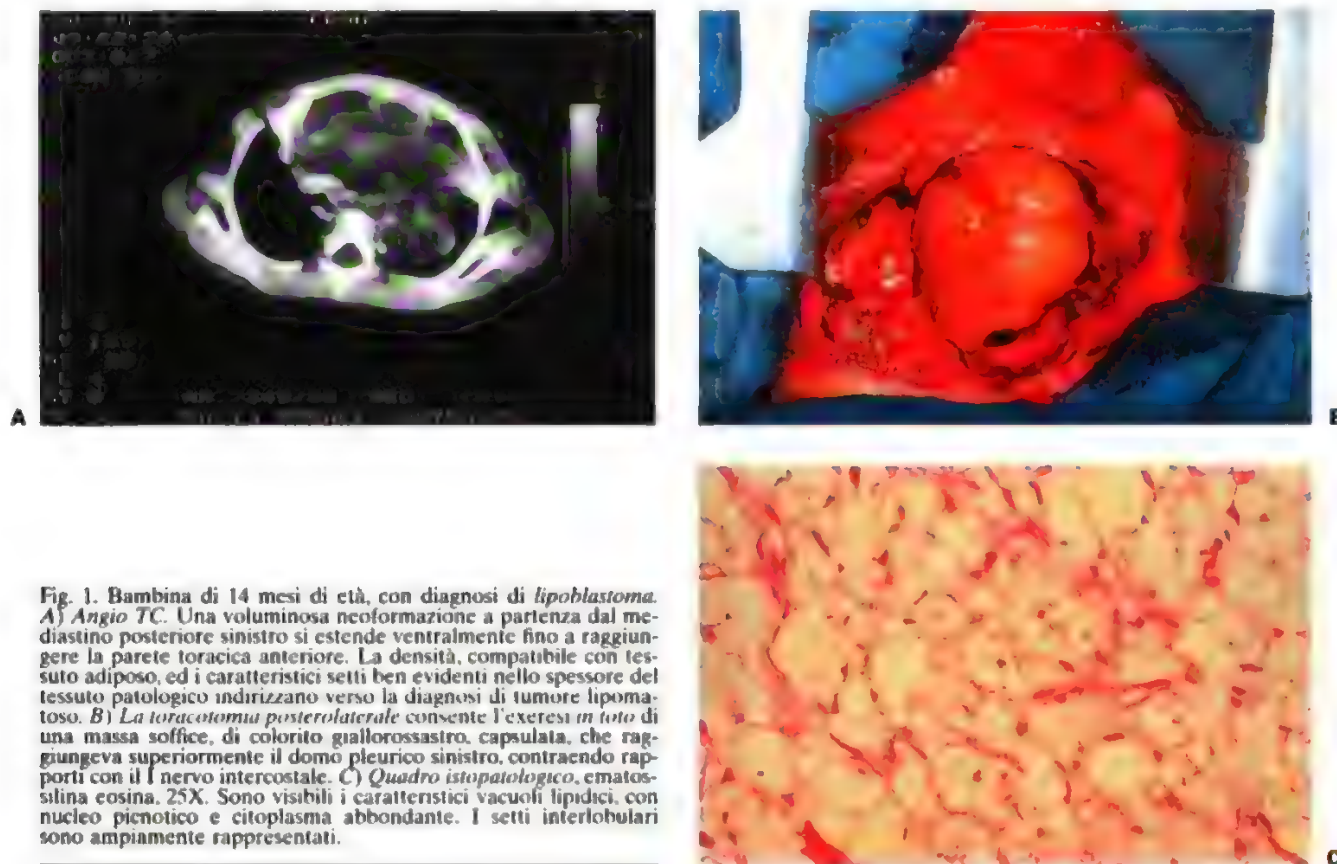


Fig. 1. Bambina di 14 mesi di età, con diagnosi di *lipoblastoma*. A) Angio TC. Una voluminosa neof ormazione a partenza dal mediastino posteriore sinistro si estende ventralmente fino a raggiungere la parete toracica anteriore. La densità, compatibile con tessuto adiposo, ed i caratteristici setti ben evidenti nello spessore del tessuto patologico indirizzano verso la diagnosi di tumore lipomatoso. B) La toracotomia posterolaterale consente l'exeresi in toto di una massa soffice, di colorito giallorossastro, capsulata, che raggiungeva superiormente il domo pleurico sinistro, contraendo rapporti con il I nervo intercostale. C) Quadro istopatologico, ematosilina eosina, 25X. Sono visibili i caratteristici vacuoli lipidici, con nucleo picnotico e citoplasma abbondante. I setti interlobulari sono ampiamente rappresentati.

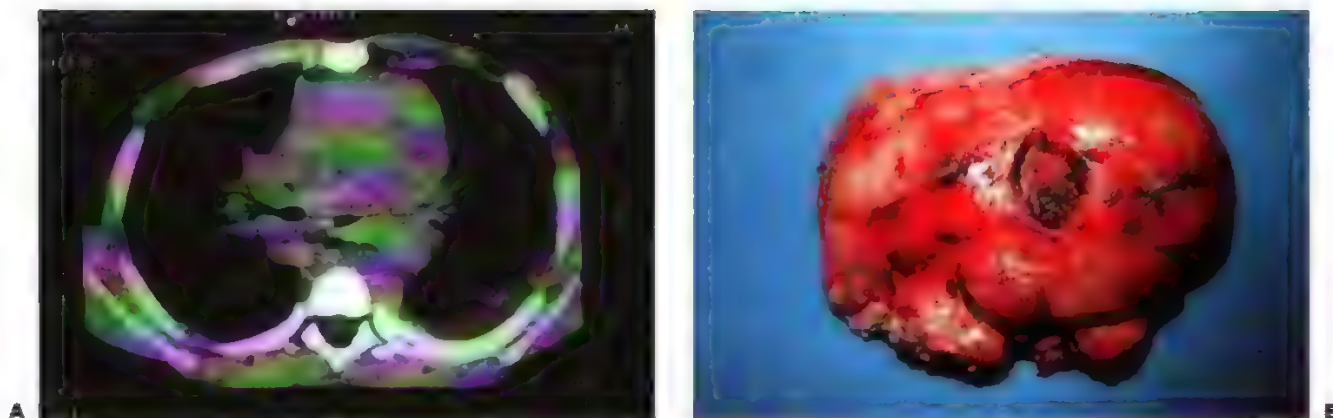


Fig. 2. Bambino di 8 anni di età, con diagnosi di *linfoma non-Hodgkin*, associato a sindrome della vena cava superiore. A) L'angio TC mostra un *enhancement* del mediastino medio ad opera di una voluminosa neoformazione che ingloba per intero i grossi vasi della base del cuore, disloca e stiria anteriormente la vena cava superiore; nel contesto della massa sono evidenti i bronchi principali, parzialmente compressi. B) *Pezzo operatorio*. Asportazione, previa chemioterapia citoriduttrice, di una voluminosa massa mediastinica isolata del peso di 320 g.



Fig. 3. Bambina di 7 anni di età, con diagnosi di *neurofibroma localizzato*. A) Radiografia del torace in proiezione anteroposteriore. L'indagine radiografica, eseguita occasionalmente quale indagine preoperatoria per adenoidectomia, evidenzia una neoformazione del mediastino superiore destro, che raggiunge l'apice della cavità toracica. B) *Pezzo operatorio*, dopo asportazione radicale. Si tratta di un raro neurofibroma mediastinico del diametro longitudinale di 8 cm, ben capsulato e clivato dalle strutture circostanti.

ghausen, sono rispettivamente le neoplasie maligne e benigne più frequenti nel MP del bambino.

In età pediatrica il tumore del mediastino è di raro riscontro, ne sono descritti solo 60 casi nella letteratura internazionale degli ultimi 25 anni, mentre frequenti sono le iperplasie e le cisti del timo e talora anche le localizzazioni ectopiche media-

stinocervicali o unicamente cervicali. Pressoché assenti risultano inoltre nel bambino sia carcinomi del m. che le cisti pleuropericardiche: queste ultime sono di riscontro occasionale nell'adulto e sono più spesso localizzate nell'angolo cardiofrenico (MA).

Non esistono invece differenze di incidenza nell'infanzia

e nelle età successive relative ai teratomi e ai tumori mesenchimali in genere. Tuttavia questi istotipi, quando sono diagnosticati nell'adulto, sono quasi esclusivamente di pertinenza del secondo e del terzo decennio di vita.

Nel bambino, il gruppo principale delle lesioni cistiche è costituito dalle malformazioni dell'intestino anteriore primitivo (figg. 4, 5 e 6), che a seconda dell'epitelio di rivestimento si distinguono in cisti broncogene (epitelio cilindrico ciliato) ed enterogene (epitelio pavimentoso, spesso stratificato, talora con zolle di mucosa gastrica [fig. 5] e pancreatica incluse). Esse costituiscono il 9-15% circa di tutta la patologia mediastinica. Più spesso si tratta di cisti broncogene (50% dei casi [fig. 6]), a sede nel m. medio o posteriore, che si dispongono in sede subcarenale oppure lungo la doccia paravertebrale. Frequenti sono anche le cisti enterogene (4%-6,4% contro l'1% circa nell'età adulta). Rare sono invece le cisti isolate del timo e le cisti pleuropericardiche (0,2%-2% delle lesioni cistiche mediastiniche), che in età adulta costituiscono invece il 40% di tutte le cisti del m. Le cisti dell'intestino anteriore primitivo possono anche appartenere a due compartimenti, lesioni cervico mediastiniche e toracoaddominali e di rado sono esclusivamente cervicali, intradiaframmatiche o sottodiaframmatiche oppure intrapolmonari.

Un cenno a parte meritano i tumori endocrini, neoplasie o semplici ectopie tissutali: nel bambino infatti sono pressoché assenti, mentre nell'adulto rappresentano circa il 10% di tutte le masse mediastiniche. Per concludere, in età pediatrica non sussistono problemi di diagnosi differenziale con alcune patologie tipiche dell'adulto, tra cui gli aneurismi dell'aorta e/o dei suoi rami principali, i carcinomi dell'esofago, gli ascessi paravertebrali, i mesoteliomi localizzati, le metastasi da carcinomi variamente localizzati.

Sedi particolari e rare

Nel bambino, anche se raramente, possono essere diagnosticate delle tumefazioni che, originando dal m. si sviluppano in direzione cervicale (lesioni cervico-mediastiniche) oppure transdiaframmatica (lesioni toraco-addominali). In entrambi i casi si tratta di patologie del tutto atipiche per sede, che appartengono soprattutto alla categoria dei tumori neurogeni e dei tumori linfoangiomatosi, alle duplicazioni dell'intestino anteriore primitivo (figg. 1-3) e ad alcune lesioni timiche.

Sia Pellerin che Mills hanno descritto emolinfangiomi del neonato e dell'infanzia a sviluppo cervicomediatinico, mentre Park riporta l'osservazione di una cisti broncogene che dal m. antero-superiore si portava nella regione cervicale

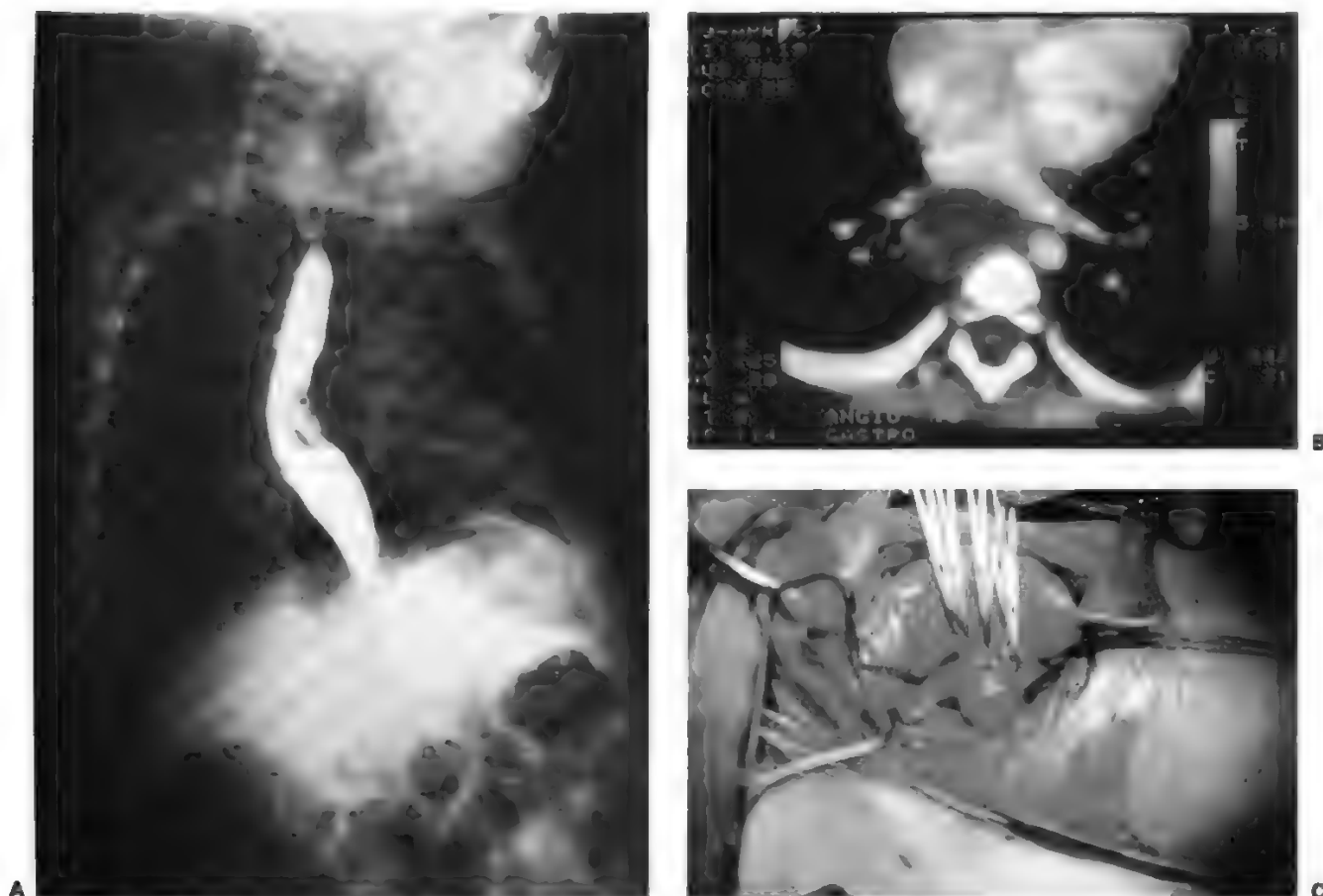


Fig. 4. Bambino di 2 anni di età, con diagnosi di duplicazione dell'intestino anteriore primitivo indovata nello spessore della tonaca muscolare dell'esofago medio-toracico. A) Esófagogramma in proiezione obliqua. Si evidenzia un'impronta a livello della parete anteriore del terzo medio dell'esofago, il cui calibro è solo lievemente ridotto. B) L'angio-TC dello stesso paziente dimostra una tumefazione a carico del m. posteriore, anteriore rispetto ai corpi vertebrali, di forma ovalare e contenuto liquido; l'esofago, improntato, è dislocato posterolateralmente. C) L'aspetto intraoperatorio è quello di una duplicazione cistica, intramurale dell'esofago, senza rapporti con il lume dell'organo. In base al tipo di rivestimento mucoso si classifica come cisti enterogena.

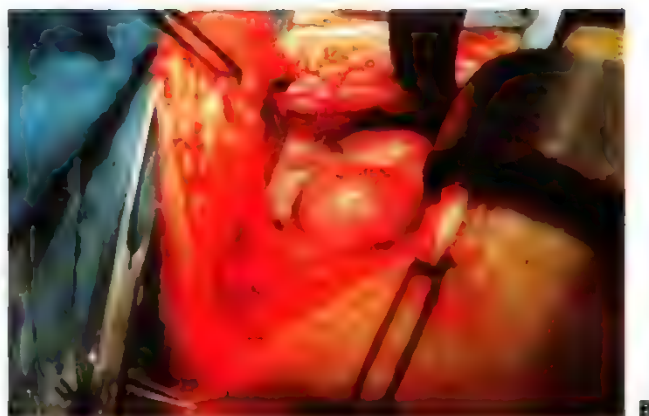
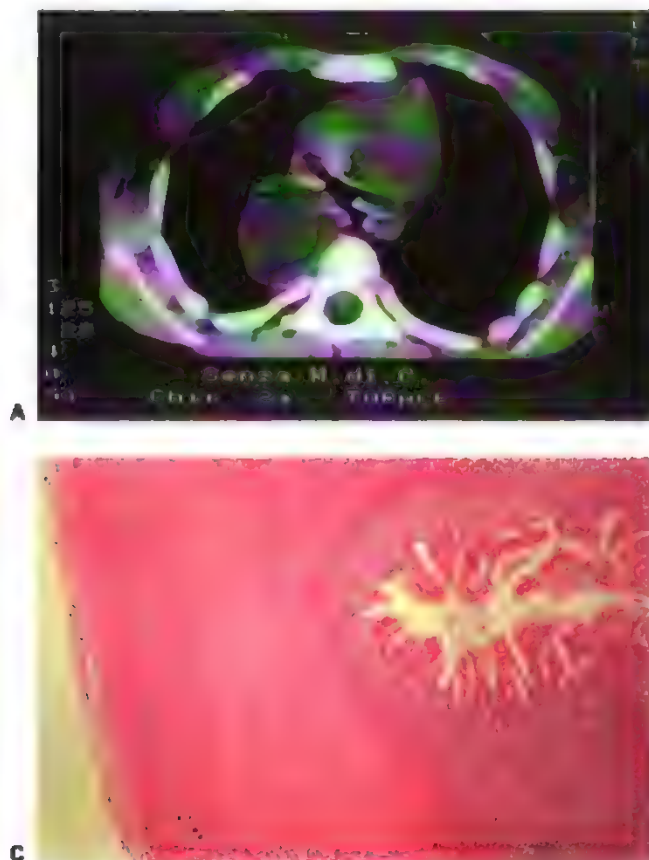


Fig. 5. Bambino di 3 anni di età, con diagnosi di duplicazione dell'intestino anteriore primitivo, localizzata nel m. postero-inferiore. A) Esame TC senza m.d.c. A carico del m. posteriore destro è evidente una lesione cistica, a contenuto liquido, che mantiene un piano di clivaggio con il corpo vertebrale e anteriormente con la vena cava superiore. B) L'aspetto intraoperatorio è quello di una cisti mediastinica ovalare, completamente separata dalle strutture circostanti, la cui parete, sotto tensione, appare ispessita e con alcune soffiusioni pseudo-emorragiche. C) Quadro istopatologico, ematossilina-eosina, 25X. Dall'esterno verso la superficie endoluminale sono evidenti una tonaca muscolare spessa, una *muscularis mucosae* e una mucosa sollevata in cripte e ricca di ghiandole calcificanti mucipare. Si trattava di una cisti a rivestimento gastrico.

anteriore. Amendola *et al.* (1982) e Pokorny (1983) descrivono rispettivamente alcuni casi di cisti enterogene e di duplicazioni gastroenteriche a sede toracoaddominale: in quest'ultima situazione si trattava di due duplicazioni che comunicavano con l'esofago cervicale, si sviluppavano nel MP e, dopo avere perforato l'emidiaframma destro, terminavano in addome a fondo cieco, con una parete in comune con lo stomaco (solo altre 25 osservazioni analoghe sono state descritte in letteratura). Nella nostra esperienza è presente una cisti broncogena a localizzazione intradiaframmatica (cosiddetta *dumbbell*, cioè aspetto a clessidra) ed è possibile ancora ricordare un bambino affetto contemporaneamente da tre duplicazioni dell'intestino anteriore primitivo, a carico rispettivamente del MM, dello stomaco e dell'ileo.

In altri casi sono state riscontrate localizzazioni anomale dovute all'ectopia di un tessuto la cui sede di origine o di migrazione embrionale abituale è il mediastino. Pertanto, anche se assai rare, troviamo cisti del timo e cisti broncogene in sede cervicale pura nel neonato. Touloukian (1982) riporta il caso di un neonato con una cisti broncogena a sede sopraclaveare profonda, aderente alla trachea, ma senza una reale comunicazione con essa. In questa stessa sede ma più superficialmente, lungo il margine mediale del muscolo sternocleidomastoideo sono assai più comuni le cisti cervicali derivanti dai residui del secondo solco branchiale. Nella nostra casistica compare una cisti ad epitelio broncogeno localizzata in sede cervicale anteriore, a contenuto liquido ecograficamente non corpuscolato, diagnosticata preoperatoriamente come cisti di presumibile origine dal corno timico superiore. Infine, da tutto ciò non si aprono le neoplasie multiple del m. Pontius descrive il

caso di un bambino di 12 anni affetto contemporaneamente da un teratoma benigno del MA e da un ganglioneuroma del MP.

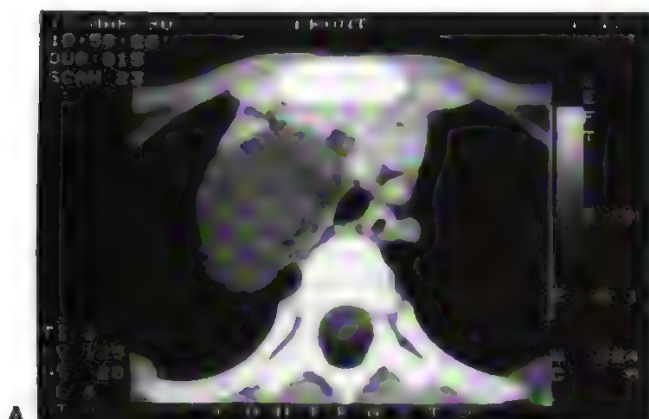
Sintomatologia e quadri clinici: caratteri generali

La diagnosi di una tumefazione mediastinica in età pediatrica può costituire una *scoperta* radiologica, evento quindi occasionale, oppure rappresentare la risposta diagnostica a un quadro clinico talora imponente. In quest'ultimo caso, più spesso si osservano i segni di una compressione bronco-vascolare che inizia con tosse, dispnea e può culminare nel *distress* respiratorio acuto o nella sindrome della vena cava superiore (SVCS). In altri pazienti sono invece evidenti i segni di una compressione osteo-midollare vertebrale, che si manifestano con iperreflessia, radicolalgie dorsali ingravescenti fino alla paraplegia parziale o totale.

I pazienti compresi nell'arco dell'età pediatrica (*infants*: 0-2 anni; *children*: 3-12 anni; *adolescents*: 13-19 anni) e affetti da una patologia del mediastino, più frequentemente degli adulti tendono ad avere una sintomatologia spiccata. Ciò è la conseguenza di motivazioni differenti: i bambini, infatti, più spesso degli adulti presentano lesioni maligne e inoltre hanno una capacità toracica limitata, cosicché ogni lesione del mediastino ha poco spazio disponibile per estendersi e tende quindi a comprimere, dislocandoli, gli organi circostanti.

Nel complesso, i piccoli pazienti affetti da neoplasie maligne sono più frequentemente sintomatici e manifestano una estesa varietà di segni locali e sistemici. Tuttavia, l'assenza di sintomi clinici non indica necessariamente il carattere benigno di una lesione mediastinica.

La sintomatologia che accompagna le lesioni benigne è



A

Fig. 6. Bambina di 6 anni di età, con diagnosi di *duplicazione dell'intestino anteriore primitivo*, localizzata nel m. medio superiore. A) Angio TC. Si osserva una lesione cistica a contenuto liquido sita nel m. superiore, che si estrinseca verso destra, dislocando anteriormente la vena cava superiore. B) Intraoperatoriamente, dopo avere scostato il polmone destro, si evidenzia una cisti rivestita dalla pleura parietale, traslucida, a contenuto fluido filante, rivestita internamente da epitelio respiratorio comprendente cellule mucipare e ciglia vibratili: diagnosi di cisti broncogena.



B

soprattutto di tipo respiratorio ed è dovuta alla grandezza o alla sede peculiare della lesione oppure alle sovrainfezioni (polmonite, empiema, piopneumotorace) che essa stessa determina a motivo della compressione polmonare associata. Tuttavia, responsabili dei sintomi respiratori, oltre alla compressione diretta delle vie aeree, possono essere le lesioni delle fibre nervose respiratorie (cervicali e/o mediastiniche), i riflessi paradossi del respiro secondari alle compressioni esofagee, le turbe deglutitorie e, talora, l'invasione dei muscoli costrittori del faringe. Secondo l'esperienza di King *et al.* (1982), il 50% delle lesioni benigne dà sintomi da compressione tracheale: in questa classe di pazienti, il 90% ha meno di due anni di età; questo periodo è quindi più a rischio poiché le strutture cartilaginee delle vie aeree di conduzione sono ancora immature e possono divenire malaciche per effetto di una compressione *ab extrinseco* protratta nel tempo. Esiste quindi una correlazione tra età e sintomatologia nei pazienti affetti da lesioni benigne. I piccoli di età compresa tra 0-2 anni hanno un *distress* respiratorio precoce, che spesso compare subito dopo la nascita e i loro sintomi respiratori sono quindi più gravi che nelle successive età pediatriche. Questa sintomatologia respiratoria dipende anche dalla densità del tessuto patologico: alcuni tessuti particolarmente ipodensi e soffici [timo iperplastico, tessuto adiposo (lipomi e lipoblastomi)] non hanno infatti la capacità, neppure quando sono presenti come masse voluminose, di comprimere o dislocare le strutture assiali del mediastino. In queste situazioni, anche bam-

bini di età inferiore ai due anni risultano quasi sempre asintomatici.

Per quanto riguarda le tumefazioni maligne del mediastino, esse determinano in oltre il 70% dei casi l'insorgenza di febbre, tosse e dispnea. Inoltre, nel 40% di questi bambini sono presenti adenopatie laterocervicali, nell'8% compare una SVCS e nel 5% si rileva una sindrome di Bernard-Horner.

Nel 1862 Claude Bernard ha dimostrato che il I ramo comunicante dorsale contiene fibre motorie destinate all'iride. Normalmente queste fibre originano dal midollo spinale (D1) passano nel I nervo toracico e quindi attraverso il ramo comunicante raggiungono il ganglio cervicale inferiore: questo è situato anteriormente alla I articolazione costo-vertebrale, all'interno del torace. La lesione delle fibre suddette determina una ptosi della palpebra superiore (da paralisi del muscolo di Muller), miopia (da lesione del muscolo dilatatore della pupilla) e lieve enoftalmo (dovuto alla riduzione della rima palpebrale). Più raramente sono presenti ipotonia oculare, eterocromia iridea e lieve ipertermia dell'emifaccia omolaterale con diminuzione dell'attività sudoripara e delle secrezioni lacrimali.

Differentemente che in età pediatrica, ove la sindrome di Bernard-Horner può essere presente già alla nascita ed è quasi sempre isolata, nell'adulto essa è più frequentemente parte della sindrome di Ciuffini-Pancoast: in questi casi un tumore del solco polmonare superiore infiltra la cupola pleurica fino ad interessare le radici del plesso brachiale ed il simpatico cervicale. In entrambe le età, la sindrome di

MEDIASTINO

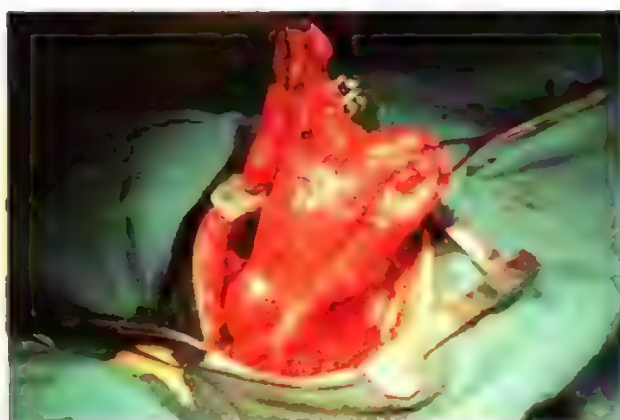
Bernard-Horner può essere preceduta da segni di semplice irritazione del simpatico, tra cui midriasi, aumento della rima palpebrale e lieve esoftalmo.

Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino anteriore

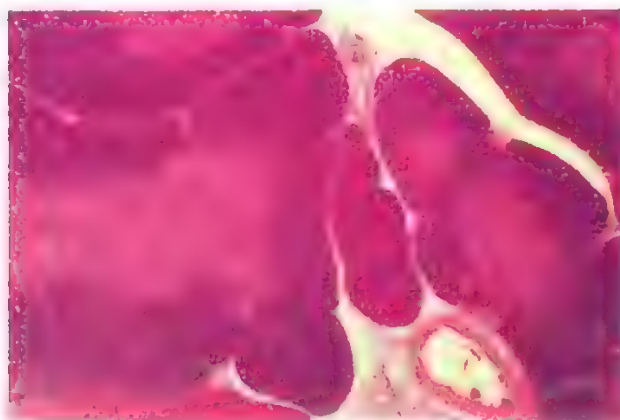
Queste lesioni determinano una sintomatologia respiratoria da compressione tracheobronchiale o da sovrainfezione, con tosse, dispnea e *distress* respiratorio severo fino alla compromissione delle funzioni vitali. Come testimoniato da Hope (*there has never been a proved case of tracheal obstruction due to an enlarged thymus gland in our Hospital*) raramente un'iperplasia del timo (fig. 7) provoca una sintomatologia respiratoria da collasso delle vie aeree: al contrario, le cisti timiche ed i timomi sono spesso alla base del cosiddetto stridore timico, soprattutto nei neonati. Tuttavia, l'iperplasia timica cosiddetta «gigante» può determinare nelle primissime età della vita una scoliosi tracheale, con dislocamento delle vie aeree principali e conseguente *distress* respiratorio severo. Raro è il binomio miastenia-timoma: nei due gruppi, rispettivamente di 10 ed 8 pazienti operati di timectomia per miastenia grave da Campbell *et al.* (1983) e Youssef (1983), nessuno era affetto da timoma.

I *teratomi* danno sintomi respiratori soprattutto in età

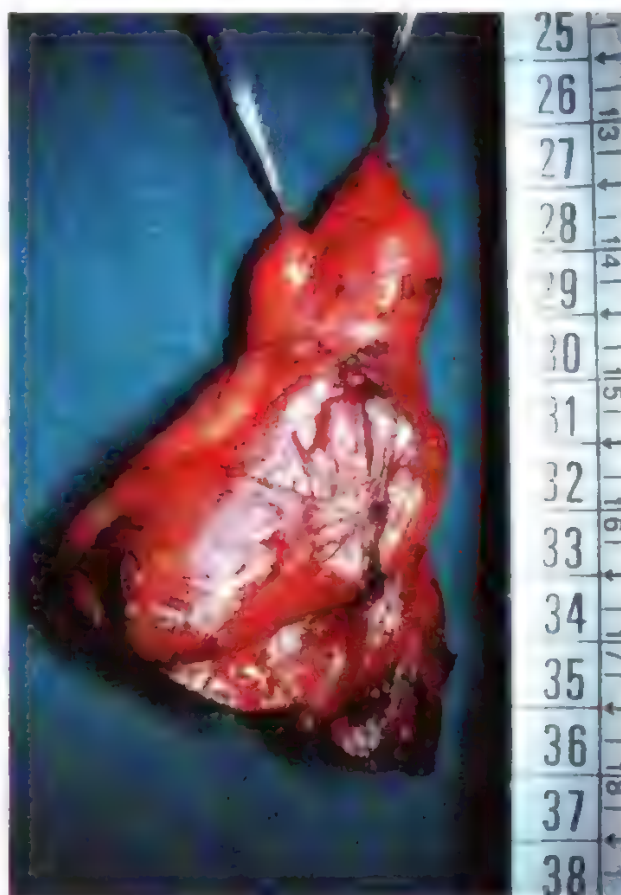
neonatale, mentre al di sopra dei due anni sono spesso asintomatici. Meno frequentemente sono causa di compressione vascolare. Quando questo accade, bisogna ricordarlo con accortezza nel corso dell'intervento di exeresi della massa poiché la malacia di un tratto di parete vascolare è spesso associata alla compressione esercitata per lungo tempo dalla massa stessa in fase di accrescimento: per tale motivo si possono verificare lesioni vascolari con emorragie durante o nell'immediato postoperatorio, oppure a distanza, dopo la rottura di uno pseudoaneurisma o di un aneurisma iatrogeno postoperatorio. Ancora, i teratomi possono essere sintomatici per l'infezione del loro contenuto (infezione per via ematogena o più spesso per una comunicazione bronchiale diretta) o in seguito a rottura della capsula tumorale e spandimento dello stesso in pieno parenchima polmonare, nelle vie aeree, nel cavo pleurico, nel sacco pericardico, provocando polmoniti, tracheobronchiti recidivanti, pleuriti, empiemi, pericarditi. Le infezioni sono causate soprattutto dal materiale sebaceo liquido-filante e dagli annessi cutanei (peli, capelli). Infine, alcuni teratomi sono secernenti e possono rivelarsi poiché causa di una pubertà precoce o di un ipoglicemia. Heimburger e Battersby (1965) riportano il caso di un teratoma maligno in un



A



C



B

Fig. 7. Bambino di 10 anni con diagnosi di *iperplasia timica vera*. A) Timectomia per via transcervicale ampliata mediante *split* del manubrio sternale. B) Vista intraoperatoria in via di completamento di un voluminoso timo. La pinza di Duval trazona il corno inferiore sinistro dell'organo. C) Timoma iperplastico. Voluminoso timo iperplastico (diametro massimo 10 cm, peso 215 g), responsabile di tosse e stridore espiratorio. C) Timoma iperplastico. Emetossilina eosina 4X. La struttura, la differenziazione corticomedullare, la lobulazione e il tessuto stromale presentano caratteristiche del tutto sovrapponibili a quelle del timo normale. Corpuscoli di Hassall sono ben visibili nel contesto della midollare.

bambino di due anni, i cui segni rivelatori furono raucedine e dislalia, per effetto della paresi di una corda vocale da infiltrazione del nervo laringeo ricorrente di sinistra. Quest'ultima è un'evenienza eccezionale.

Differentemente, i tumori angiomatosi non determinano mai compressione delle vie aeree: tuttavia possono causare emotorace, chilotorace, emottisi recidivanti (se si associano localizzazioni endotracheobronchiali) ed estendersi all'interno del canale spinale, provocando compressione endorachidea. Più frequentemente questi tumori sono un reperto occasionale dell'accurata ispezione cui i genitori sottopongono i propri bambini: nella maggior parte dei casi essi stessi hanno osservato una tumefazione soffice, talora bluastra, sita alla base del collo, più evidente con il pianto (a motivo ovvio dell'aumento della pressione intratoracica). Talora sono dei piccoli emangiomi della cute e delle mucose cervicofacciali e toraciche a indirizzare verso l'ipotesi che una massa del MA possa essere un emangioma. Le patologie linfatiche neoplastiche del MA possono determinare un *distress* respiratorio, tanto più grave quanto rapido è l'accrescimento della neoplasia.

Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino medio

Queste causano una sintomatologia o quando comprimono le vie aeree e digestive o quando sono l'espressione di una patologia sistemica. Tra le neoplasie linfatiche, i linfomi danno raramente sintomi respiratori mentre sono costantemente associati a febbre, anemie, astenia, senso di malessere e frequenti sono le adenopatie (laterocervicali, sovraclaveari, ascellari, inguinali) e le epatosplenomegalie. I linfosarcomi del MM danno luogo invece a una sintomatologia ricca e rapidamente evolutiva: in pochi giorni o settimane si instaura una dispnea ingravescente, con disфонia, tosse, SVCS, versamento pleurico (mono o bilaterale) e o pericardico e talora singhiozzo da paresi del nervo frenico. Assai frequente è il dolore, rare le epatosplenomegalie. Nei casi in cui questi linfosarcomi evolvono in leucemie, prevale una sintomatologia di tipo sistemico.

Nel 50% dei casi le più frequenti lesioni linfonodali non neoplastiche sono causa di una severa ostruzione delle vie respiratorie (TBC, istoplasmosi); l'istoplasmosi è anche descritta quale causa di SVCS. Quando presenti, uveite, noduli cutanei, adenopatie cervicali sono espressione e completamento dei rari quadri di sarcoidosi dell'infanzia. Una patologia compressiva respiratoria più rara e, ove presente, tipica dell'adolescenza è la linfadenite iperplastica di Castelman.

Contrariamente all'adulto in cui sono asintomatiche, le malformazioni dell'intestino anteriore primitivo (ad epitelio respiratorio, digestivo o misto) del piccolo bambino sono spesso motivo di grave *distress* respiratorio, con crisi asmatiformi ed episodi di cianosi; più raramente si associano a disfagia e/o dolore retrosternale. Solitamente, le cisti broncogene a sede mediana, che si sviluppano tra la trachea e l'esofago, si accrescono in uno spazio inestensibile e soprattutto nel neonato, anche se piccole, danno sintomi respiratori precoci, drammatici, con crisi dispnoiche ricorrenti che si intensificano fino all'*exitus*.

Contrariamente, le cisti broncogene a sede laterale (laterotracheali, ilari) danno una sintomatologia modesta. Haller *et al.* (1969) parlano di *treachery of the bronchogenic cyst* per definire meglio il carattere bizzarro di questa patologia che, seppure assolutamente benigna, in alcune situazioni e localizzazioni peculiari può causare il decesso dei pazienti più piccoli. Michelson (1969) descrive il caso di una cisti broncogena dal sottile peduncolo adeso al bronco principale sinistro, il cui movimento pendolare conseguente agli

atti respiratori provocava la compressione dell'uno o dell'altro bronco principale ed in grado minore dell'esofago.

Sintomatologia delle tumefazioni del mediastino posteriore

Queste originano più spesso dai gangli della catena paravertebrale del simpatico o dai nervi intercostali e avendo a disposizione l'ampio spazio costituito dalle docce paravertebrali possono raggiungere dimensioni cospicue e dar luogo a *distress* respiratorio severo, anche se tardivo, a motivo della densità del tessuto che le costituisce. Le neoplasie neurogene ad atteggiamento *dumbbell*, in cui un prolungamento tumorale penetra nel canale rachideo attraverso un forame di coniugazione, provocano una compressione extradurale: in questi casi una paraplegia più o meno completa può inaugurare il quadro clinico. Nelle forme cervico-dorsali, sono frequenti le anomalie oculari della sindrome di Bernard-Horner oppure i sintomi neurologici di ipotonia e debolezza degli arti superiori. Le forme localizzate al MP inferiore possono determinare ipotonia degli arti inferiori, paralisi dei muscoli addominali, turbe sfinteriali: va inoltre ricordato che la sede metamerica del tumore neurogeno non corrisponde sempre al livello dell'invasione midollare e quindi la sintomatologia può variare ed essere diversa da quella del segmento vertebrale corrispondente alla massa neoplastica. Tutti i tumori neurogeni sono spesso associati a radicolalgie, dovute all'allargamento degli spazi intercostali e alle erosioni e deformità degli archi costali posteriori. Alcuni tumori neurogeni sono responsabili della produzione di catecolamine, i cui effetti determinano ipertensione, diarrea, sudorazione, pallore, tachicardia e flushing cutaneo facciale. I tumori maligni, tra cui i neuroblastomi, danno manifestazioni sistemiche con febbre, anoressia, anemia ed alcuni segni extratoracici: adenopatie ascellari e/o sovraclaveari, esoftalmo e *facies* tipica (*Panda eyes*; caratteristica dovuta ad ecchimosi circumoculari da metastasi orbitarie).

I neurofibromi possono essere multipli e dar luogo al quadro di una malattia di von Recklinghausen (di I o II tipo): in questo caso sono talora presenti le lesioni ben descritte dagli AA. francesi *taches café au lait et molluscum cutanés*. Queste chiazze caffelatte non risparmiano alcuna sede cutanea e sono di solito più estese sul dorso.

Dispnea e stridore respiratorio grave sono presenti già alla nascita nei neonati affetti da duplicazioni e cisti enterogene ad estensione secondaria o localizzazione primitiva nel MP. Queste ultime, tuttavia, producono meno frequentemente delle cisti broncogene una sintomatologia respiratoria: probabilmente ciò è dovuto alle rare localizzazioni intertracheoesofagiche e subcarenali o carenali che le cisti enterogene presentano. Una perforazione di queste peculiari malformazioni dell'intestino anteriore primitivo può riversare il contenuto nel cavo pleurico con susseguenti empiemi e polmoniti recidivanti: le suppurazioni, spesso estese e di difficile risoluzione possono causare deformità costali, vertebrali e scoliosi indirette. Alcuni AA. hanno descritto anche delle scoliosi dirette, causate dalle erosioni dei corpi vertebrali ad opera delle cisti stesse. Talora, le secrezioni acide prodotte da isolotti di mucosa gastrica erodono la parete della cisti, provocando ematemesi o emorragie intrapolmonari. Jackson riporta l'osservazione di una cisti neuroenterica connessa con la dura madre, la cui infezione causava una meningite.

Nel complesso quindi, la sintomatologia causata da una tumefazione del mediastino in età pediatrica si può riassumere in due quadri clinici più frequenti: segni di compressione delle vie aeree oppure segni di compressione osteomidollare vertebrale. Più raramente si osservano: segni di sovrainfezione, miastenia grave, sindromi da iperinnervazione

ormonale, lesioni cutanee rivelatrici, sindrome di Bernard-Horner.

Un cenno a parte merita la già citata Sindrome della vena cava superiore (SVCS). Nel bambino, più spesso si presenta secondariamente a una lesione iatrogena da complessi interventi cardiocirurgici o dopo cateterismi della VCS per nutrizione parenterale totale (v.; NPT) o per monitoraggio associato a fluidoterapia. Meno frequenti sono le SVCS primitive, da tumori cisti e granulomi del mediastino: queste lesioni si localizzano in una zona del m. anterosuperiore destro in intima vicinanza del bronco principale omolaterale; tuttavia, la sintomatologia caratteristica di questa sindrome non è dovuta solamente alla sede della massa ma anche alle pareti sottili e alle basse pressioni idrostatiche proprie della vena cava superiore soprattutto in età neonatale. Cefalea, nausea, vertigini, letargismo mentale, alterazioni del visus, sincope e distress respiratorio costituiscono la sintomatologia minore. I segni più manifesti comprendono la dilatazione e il turgore dei reticoli venosi del volto, del collo, degli arti superiori e della parte alta del torace. La cute appare talora cianotica, arrossata da vampate improvvise, e le congiuntive sono iniettate ed edematose. Inoltre, nel bambino tutta questa ricca sintomatologia viene accentuata dai movimenti di flessione anteriore del tronco e dal clinostatismo.

Metodiche diagnostiche

La *radiografia tradizionale* (v. MEDIASTINO, IX, 563-574; MEDIASTINO*, coll. *4903-4917) in due proiezioni rappresenta a tutt'oggi la metodica ottimale e di più rapida esecuzione per localizzare topograficamente una lesione mediastinica: ad essa inoltre può essere successivamente associata una stratigrafia delle sezioni prescelte. In questi casi, l'evidenza di calcificazioni in una massa del MA suggerisce l'ipotesi diagnostica di teratoma, mentre calcificazioni proprie di una lesione del MP fanno propendere per una lesione neurogena.

Anomalie vertebrali svelate radiograficamente (soprattutto a carico dei segmenti cervicali o delle prime vertebre dorsali) sono spesso associate a duplicazioni gastroenteriche o cisti neuroenteriche mentre l'iperdiafania di un lobo o talora di un intero polmone indicano sovente una compressione bronchiale: non sono rare le osservazioni di un enfisema ostruttivo neonatale provocato da cisti broncogene comprimenti l'albero tracheobronchiale. L'*esofagogramma* è particolarmente utile nella diagnosi differenziale tra i tumori del MP e le duplicazioni gastroenteriche: ciò è reso possibile dalle impronte e/o dalle dislocazioni che le lesioni mediastiniche producono sui contorni dell'esofago stesso.

Inoltre, uno studio completo dell'apparato digerente, in caso di una sospetta duplicazione gastroenterica, oltre ad evidenziare lesioni intraparietali dell'esofago stesso, può svelare la sede di una eventuale comunicazione: questa appare più frequentemente a livello digiunale, ma talora può essere duodenale, ileale o esofagea.

In alcuni casi la *scintigrafia* con ^{99m}Tc pertecnato è stata utilizzata per evidenziare mucosa gastrica intracistica: secondo Ferguson mucosa ectopica in questa sede sarebbe presente in circa il 50% delle duplicazioni gastroenteriche.

La *broncografia* e le *metodiche endoscopiche* (esofago-scopia, broncoscopia, mediastinoscopia) sono invece più raramente utilizzate. Una tumefazione del mediastino assai poco frequentemente costituisce un'indicazione alla broncoscopia nel piccolo paziente. Tuttavia, quest'esame deve necessariamente far parte integrante di un protocollo diagnostico delle lesioni del MM (tumori adenopatici subcarenali, intratracheobronchiali, ilari) che hanno provocato una rapida compressione sulle vie aeree del bambino. Fitzpatrick

et al. (1985) hanno eseguito una biopsia transbronchiale in 5 pazienti (età media 17,5 anni) affetti da linfadenopatia ilomediastinica ottenendo nel 100% dei casi una risposta diagnostica al quesito radiologico: 3 adolescenti erano affetti da sarcoidosi e 2 da granuloma eosinofilo. Dyon e Sarrazin (1978), hanno limitato le indicazioni della mediastinoscopia (v. MEDIASTINOSCOPIA*) in età pediatrica a quelle adenopatie proprie del MM (mediastinoscopia secondo Carlsens) e ad alcune tumefazioni del MA (mediastinoscopia anteriore, timica).

Ruge e Koch (1981) e Tischer con l'ausilio del mediastinoscopio hanno raggiunto una diagnosi altrimenti difficile in alcune patologie pediatriche inusuali, quali sarcomi delle parti molli o lesioni metastatiche. Non mancano tuttavia pareri discordi: Filler (1979), riguardo alla tipizzazione ed alla stadiazione dei linfomi mediastinici conclude con le seguenti parole: *the mass is usually so large and so intimately associated with the innominate vein or vena cava that biopsy could result in uncontrollable hemorrhage.*

La toracoscopia (v. sotto) è stata eseguita 23 volte da Ryckman e Rodgers (1982) e nel 44% dei casi la sua indicazione era legata a una tumefazione mediastinica: la metodica rese sempre possibile l'esplorazione visiva di un intero emitorace e talora l'esecuzione di una concomitante biopsia epatica transdiaframmatica. L'accuratezza diagnostica è stata del 91%. Una controindicazione relativa consisteva nell'esplorazione, difficoltosa, della regione del legamento polmonare e della vena polmonare inferiore.

Le *metodiche angiografiche* (e talora l'angiocardigrafia) sono essenzialmente utili per lo studio accurato della vascolarizzazione di un tumore ad ampia estensione, dato essenziale per la successiva exeresi, o per localizzare il peduncolo vascolare di un sospetto emangioma oppure nella diagnosi differenziale tra una tumefazione del m. ed eventuali possibili anomalie cardiovascolari congenite.

Poiché i tumori linfatici e neurogeni coinvolgono spesso le ossa scheletriche, la *scintigrafia ossea* e le *biopsie midollari* permettono l'identificazione di eventuali localizzazioni metastatiche. Similmente alti dosaggi urinari di *acido vanililmandelico* (VMA) e dei metaboliti derivati, in caso di lesioni del mediastino posteriore sono fortemente indicatori di un tumore neurogeno. Ed ancora, a seconda della sede e delle caratteristiche della lesione mediastinica, sono utili alcuni test diagnostici: intradermoreazione alla tubercolina e *skin tests* specifici (TBC, sarcoidosi, istoplasmosi). Infine, un breve ciclo con corticosteroidi (1,5-2 mg/kg di prednisone al giorno per 5 giorni) può determinare una regressione volumetrica del timo, se si tratta di una semplice iperplasia dell'organo: questo schema terapeutico/diagnostico non deve mai effettuarsi in bambini con età superiore ai due anni, quando inizia a delinearsi il rischio di una patologia linfomatosa.

Recentemente è stato proposto l'*approccio ultrasonografico* alle lesioni pediatriche del MM, ove si è facilitati soprattutto dall'incompleta ossificazione dello sterno: ivi l'esame può essere dirimente nei confronti di una lesione cistica o solida e può ancora consentire uno studio dei rapporti vascolari. La sonda ecografica può indagare il mediastino anche attraverso la finestra costale.

Attualmente, la tomografia computerizzata (TC) del m. nel bambino è utile per un'esatta definizione dell'estensione e dei limiti di una lesione ai fini di un successivo intervento di exeresi e nella stadiazione dei linfomi.

Se negli adulti è raro osservare una compressione tracheobronchiale poiché il tessuto linfatico neoplastico appare soffice rispetto allo scheletro fibrocartilagineo delle vie aeree principali, nei bambini l'impalcatura della trachea e dei bronchi extrapolmonari è duttile e più facilmente de-

formabile. In questi casi la TC consente di valutare con precisione l'area di sezione trasversa dei condotti tracheo-bronchiali o di misurare l'estensione di un eventuale restringimento, consentendo di individuare una categoria di piccoli pazienti a rischio potenziale di compromissione respiratoria grave. Un restringimento superiore a 1/3 del diametro tracheale determina sintomi respiratori costanti, difficoltà di intubazione e alterata funzione polmonare.

L'incremento delle cisti e dei tumori del m. in età pediatrica (attualmente pari al 13-14% delle neoformazioni osservate in ogni fascia di età) testimonia da un lato il crescente interesse per una patologia assai eterogenea e multiforme e dall'altro il risultato dei progressi dell'assistenza, della diagnostica e delle metodiche anestesilogiche più recenti applicate al neonato ed ai pazienti pediatrici in assoluto. Meno frequenti che nell'adulto (1:7), queste tumefazioni manifestano le stesse predilezioni anatomiche per il compartimento mediastinico di origine (anche se con percentuali diverse) e in alcune situazioni possono coinvolgere, accrescendosi o dislocandosi, più comparti.

L'osservazione di una massa mediastinica nel piccolo paziente rappresenta una sfida diagnostica e un problema di trattamento quasi esclusivamente chirurgico, ove si eccettuano i tumori linfomatosi. Tuttavia anche queste forme vengono affidate al chirurgo per una biopsia linfonodale, una mediastinoscopia, una mediastinotomia anteriore o una toracoscopia con prelievo biptico.

V. MEDIASTINO (IX, 559-590); MEDIASTINO*, *diagnostica per immagini* (coll. *4902-4931); MEDIASTINOSCOPIA*, *la mediastinoscopia in età pediatrica* (coll. *4932-4934).

Conclusioni e indirizzo terapeutico

In conclusione, quasi il 50% delle neoformazioni mediastiniche nel bambino occupa il compartimento posteriore, mentre il m. anteriore è la sede preferita nell'adulto (45,4%) (tab. III).

Circa il 40% dei tumori del m. in età pediatrica sono maligni e tra di essi prevalgono i linfomi e i tumori neurogeni (neuroblastoma e ganglioneuroblastoma), mentre meno frequentemente si osservano disgerminomi, sarcomi e timomi. Nel MA si osservano più frequentemente lesioni del timo, disgerminomi e tumori mesenchimali mentre nel MM assai comuni sono le linfoadenopatie (benigne e maligne). I tumori neurogeni costituiscono oltre il 90% delle neoformazioni del m. posteriore (ivi comprendendo anche le docce paravertebrali); tra di essi i neuroblastomi e i ganglioneuroblastomi assommano al 65% del totale, meno frequenti sono le forme mature (ganglioneuromi) e rari i tumori delle guaine nervose (schwannomi e neurilemmomi) e i neurofibromi.

Mentre nell'adulto sono pressoché assenti le duplicazioni gastroenteriche (meno dell'1% delle cisti dell'intestino anteriore primitivo) e le iperplasie timiche pure, nel bambino appaiono di raro riscontro i tumori endocrini, le cisti pericardiche (pleuropericardiche e celomatiche) e i timomi.

Se 1/3 dei piccoli pazienti è asintomatico, occorre puntualizzare tuttavia che i 2/3 di ogni categoria d'età considerata manifesta una sintomatologia evidente, più drammatica nelle primissime età della vita. I sintomi a carico di un organo od apparato (più spesso respiratorio e nervoso) indicano di frequente il carattere benigno di una lesione mentre al contrario una sintomatologia sistemica (febbre, dolore, astenia) focalizza l'attenzione su una manifestazione maligna.

Le radiografie del torace, la tomografia convenzionale, la TC e la Risonanza Magnetica Nucleare sono l'ausilio più prezioso per la diagnosi. La possibilità di procedere a un'exeresi radicale in un ampio numero di casi (circa il 90%) la più elevata percentuale di lesioni maligne nel bam-

bino rispetto all'adulto, la possibilità di risolvere un quadro sintomatico da compressione spesso drammatico e capace di mettere in pericolo la vita del paziente, la bassa mortalità intraoperatoria attuale (2-2,5%) ed i favorevoli risultati a distanza paragonati a quelli che si hanno in altre neoplasie del torace, motivano ampiamente le terapie chirurgiche attuali ad indirizzo aggressivo e, ove possibile, radicale.

La toracoscopia nello studio del mediastino in età pediatrica

La toracoscopia (v.), introdotta da Jacobaeus nel 1910 e successivamente sviluppata quale filiazione naturale e parallela della laparoscopia, solo nell'ultimo decennio è stata applicata con successo all'età pediatrica, comprendendo interventi diagnostici ma anche terapeutici. Grazie all'introduzione di minitelecamere, di tecniche videoassistite e di ottiche miniaturizzate ad ampia angolatura, con visualizzazione eccellente anche in prematuri di basso peso (inferiore ai 2 kg), un'intera *équipe* chirurgica può partecipare attivamente all'intervento endoscopico videoassistito. Un insufflatore sofisticato permette di introdurre in cavità toracica minime quote di CO₂ e di aumentare la pressione di collasso gradualmente. *Port* (dispositivo endoscopico per l'introduzione dello strumentario all'intervento toracoscopico) di 4-5 mm dotati di valvola sono riservati ai neonati e ai lattanti, mentre per gli adolescenti sono disponibili diametri più appropriati (10-12 mm), che consentono l'uso di *stapler*.

Nei pazienti al di sotto dei 30 kg di peso, in cui piccole cavità toraciche devono essere indagate, è essenziale condurre l'esame previo collasso subtotale o totale del polmone omolaterale. Se nelle età pediatriche avanzate ciò è possibile mediante l'ausilio di un tubo di Carlens tradizionale per l'intubazione selettiva e la contemporanea ventilazione, nei pazienti di basso peso un analogo risultato può essere ottenuto mediante un bloccatore endobronchiale, di cui tuttavia il più piccolo esistente è pari a 6,0 French; pertanto, in questi casi, l'intubazione selettiva del bronco principale viene eseguita con un tubo standard non cufiato, con i limiti di un collasso polmonare parziale e talora di un'iperinsufflazione del polmone controlaterale, poiché il tubo utilizzato non è totalmente occludente. Per aiutare il polmone a collassare *in toto*, evitando contemporaneamente problemi di instabilità emodinamica, si procede a un infusione di CO₂ a basso-flusso (1 l/min) e a bassa pressione (4 mmHg).

Con tali tecniche anestesilogiche, biopsie polmonari vengono eseguite quasi di routine per patologie dell'interstizio polmonare (infiltrati cronici o ad etiologia sconosciuta in ospiti immunocompromessi) o per noduli sospetti o neoplasie metastatiche. La toracoscopia pediatrica consente inoltre di realizzare pleurodesi, exeresi di bolle, decorticazioni, resezioni polmonari per patologie infiammatorie, ascessi cavitari, neoplasie primitive, sequestri, enfisema lobare congenito, malformazione adenomatoide cistica congenita polmonare. Altre indicazioni sono costituite dalla miotomia esofagea per acalasia, dalla chiusura di un dotto arterioso persistente, dal trattamento del pneumotorace recidivante e dalla pericardiotomia limitata (a scopo biptico o di drenaggio).

Ma la toracoscopia è soprattutto un'eccellente tecnica utile a realizzare biopsie o exeresi di tumefazioni del mediastino, indipendentemente dal compartimento affetto: sono descritte biopsie/asportazioni di tessuto linfatico, di tumefazioni dell'intestino anteriore primitivo (cisti broncogene, duplicazioni esofagee), di timomi localizzati e ben capsulati, igromi cistici, ganglioneuromi. Un'ulteriore ausilio alle procedure di asportazione tessutale per via endoscopica potrà essere assicurato dalle tecniche combinate che utilizzano il laser (in questo caso Nd:YAG laser).

Quando non è possibile un'agobiopsia, sia per la sede difficile che per i caratteri propri della lesione (piccola lesione del MM, tumefazione circondata da organi vitali a stretto contatto, tessuto molto vascolarizzato o quasi interamente sostituito da ampie zone di necrosi, tumefazioni timiche o linfonodali) questa metodica appare essenziale, soprattutto ove l'alternativa è rappresentata da una mediastinotomia anteriore, che consente però solo una limitata esposizione del campo operatorio.

L'accuratezza diagnostica in caso di biopsie tessutali mediastiniche è pari all'84-92% nelle varie esperienze e pertanto sia la conversione della toracoscopia in intervento tradizionale sia l'adozione di una seconda successiva procedura a cielo aperto sono rare. Kern *et al.*, 1993, hanno inoltre osservato che nel 31% dei loro casi erano presenti aree di coinvolgimento tumorale che non erano

MEDIASTINO

state individuate preoperatoriamente. Nei confronti di una chirurgia maggiore i vantaggi della toracosopia sono costituiti da un'ottima analgesia postoperatoria, da una quota minima di complicanze e da una mortalità assente. Inoltre, l'ospedalizzazione può essere ridotta al minimo necessario (talora si tratta di una 24 hours procedure), con concomitante diminuzione dei costi globali di gestione del paziente.

Tuttavia, questi vantaggi sono reali solo quando le indicazioni alla toracosopia non vengono disattese: similmente a quanto era accaduto per gli adulti, anche in età pediatrica l'entusiasmo per una tecnica innovativa ha infatti determinato un incremento talora ingiustificato delle indicazioni possibili. A questo proposito è soprattutto per quanto attiene alle lesioni francamente neoplastiche, devono sempre esistere dei dettami severi che controindichino la videotoracosopia: in particolare, i tumori neurogeni, che sono la maggior parte delle lesioni mediastiniche dell'infanzia, devono essere trattati secondo la chirurgia tradizionale laddove si tratti di una lesione ampia, con estensione intraspinale e/o localizzazione combinata (cervicomedastinica, toracoaddominale), o in quelle situazioni a rischio di ledere strutture delicate (nervo frenico, laringeo ricorrente, arteria radicolare magna di Adamkiewitz). Solo ponendo delle limitazioni precise alle indicazioni si potrà infatti valutare con follow-up a medio e lungo termine la bontà delle metodiche toracoscopiche e videonassiste e confrontarle con le analoghe procedure chirurgiche più tradizionali.

Bibliografia

- Amendola M. A., Shirazi K. K. et al., *A.J.R.*, 1982, **138**, 1165.
 Azarow K. S., Pearl R. H., Zurcher R. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1993, **106**, 67.
 Benjamin S. P. et al., *Chest*, 1972, **62**, 297.
 Boglino C., Inserra A., Ciprandi G., *Apparatus Respiratorius: defectones congenitales*, in Cavallotti C., D'Andrea V., Ciprandi G. eds., *Anatomia Analitica dell'Apparato Respiratorio e degli Organi Mediastinici*, 1989, Universo, Roma, pp. 15-25.
 Boglino C., Viviano G., Inserra A., Ciprandi G. eds., *Anatomia ed Embriologia dell'Apparato Respiratorio*, 1989, Il Ventaglio Editore, Roma - Ospedale Bambino Gesù.
 Boglino C., Inserra A., Ciprandi G., *Mediastinoscopia*, in *Enciclopedia Medica Italiana*, 1991, USES, Firenze, Aggiornamento I, III volume, 4932-4934.
 Boglino C., Ciprandi G., Inserra A., Silvano A., Serventi P., *Neuroblastoma*, in *Enciclopedia Medica Italiana*, 1991, USES, Firenze, Aggiornamento I, III volume, 5375-5388.
 Bower R. J., Kieseewetter W. B., *Arch. Surg.*, 1977, **112**, 1003.
 Campbell J. R., Bisio J. M., Harrison M. W., Campbell T. J., *J. Pediatr. Surg.*, 1983, **18**, 857.
 Ciprandi G., *Tesi di Specializzazione in Chirurgia Toracica*, I Scuola di Specializzazione in Chirurgia Toracica (Direttore C. Ricci), Università di Roma «La Sapienza», AA 1986/87.
 Davis R. D. Jr., Oldham H. N. Jr., Sabiston D. C. Jr., *The mediastinum*, in Sabiston D. C. Jr., Spencer F. C. eds., *Surgery of the chest*, 1990, Saunders, Philadelphia, pp. 498-534.
 Dyon J. F., Sarrazin R., *Chir. Pédiatr.*, 1978, **19**, 61.
 Filler R. M., *Ped. Clin. North Am.*, 1979, **26**, 677.
 Fitzpatrick S. B. et al., *AIDS*, 1985, **139**, 46.
 Fontenelle L. J. et al., *Arch. Surg.*, 1971, **102**, 98.
 Grosfeld J. R., Weinburger M., Kilman J. W., Clatworthy H. V., *Ann. Thor. Surg.*, 1971, **12**, 179.
 Haller J. A. Jr., Mazur D. O., Morgan W. W. Jr., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1969, **58**, 385.
 Heimbürger J. L., Battersby J. S., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1965, **50**, 92.
 Hope J. W., Borns P. A., Koop C. E., *Radiol. Clin. North Am.*, 1963, **1**, 17.
 Kern J. A., Daniel T. M., Tribble C. G., Silen M. L., Rodgers B. M., *Ann. Thorac. Surg.*, 1993, **56**, 92.
 King R. M. et al., *J. Pediatr. Surg.*, 1982, **17**, 512.
 Landreneau R. J., Herlan D. B., Johnson J. A. et al., *Ann. Thorac. Surg.*, 1991, **52**, 1176.
 Lewis R. J., Caccavale R. J., Sisler G. E., *Ann. Thorac. Surg.*, 1992, **53**, 318.
 Luisto R., Koukalainen K., Jyrälä A., Franssila K., *Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg.*, 1978, **12**, 253.
 Merten D. J., *A.J.R.*, 1992, **158**, 825.
 Michelson E. in Gibson Haller J. A., Mazur D. O., Morgan W. W., *J. Thor. Cardiovasc. Surg.*, 1969, **58**, 385.
 Mills N. L., Grosfeld J. R., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1973, **65**, 608.
 Ovrum E., Birkeland S., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1979, **13**, 161.
 Pellerin D., *Ann. Chir. Plast.*, 1962, **7**, 175.
 Pokorny W. J., *Mediastinal tumors*, in Horder, Ashar eds., *Pediatric Surgery*, 1983, Saunders, Philadelphia, pp. 85-97.

- Robie D. K., Gursoy M. H., Pokorny W. J., *Sem. Pediatr. Surg.*, 1994, **3**, 259.
 Ribet M. E., Cardot G. R., *Ann. Thorac. Surg.*, 1994, **58**, 1091.
 Riquet M., Mouroux J., Pons F. et al., *Ann. Thorac. Surg.*, 1995, **60**, 943.
 Rothenberg S. S., *Sem. Pediatr. Surg.*, 1994, **3**, 277.
 Rubush J. L. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1973, **65**, 216.
 Ruge U., Koch H., *Mediastinoscopy in infancy and childhood*, in *Mediastinoscopy*, 1981, Odense University Press, pp. 135-137.
 Ryckman F. C., Rodgers B. M., *J. Pediatr. Surg.*, 1982, **17**, 521.
 Saenz N. C., Schnitzer J. J., Eraklis A. E. et al., *J. Pediatr. Surg.*, 1993, **28**, 172.
 Shamberger R. C., Grier H. E., *Sem. Pediatr. Surg.*, 1994, **3**, 267.
 Tarver R. D., *Interventional radiology of the chest*, in Newell J. D., Tarver R. D. eds., *Thoracic Radiology*, 1993, chap 10, Raven, New York, pp. 147-167.
 Touloukian R. J., *J. Pediatr. Surg.*, 1982, **17**, 311.
 Welch K. J., Randolph J. G., Ravitch M. M. et al. eds., *Pediatric Surgery*, 4 ed. 1986, Year Book, Chicago, pp. 602-618.
 Whittaker L. D., Lynn H. B., *Surg. Clin. North Am.*, 1973, **53**, 893.
 Youssef S., *J. Pediatr. Surg.*, 1983, **18**, 537.
 Yu C. J., Yang P. C., Chang D. B. et al., *Chest*, 1991, **100**, 399-405.

GUIDO CIPRANDI, PAOLO SERVENTI,
ALESSANDRO INSERRA E CAMILLO BOGLINO

MEDICINA DELLE PROVE DI EFFICACIA

1. Evidence-based Medicine.

SOMMARIO

Premessa (col. 3604). - **I nomi di battesimo** (col. 3604) - **Date di nascita e parentele: Me.P.E. ed epidemiologia clinica** (col. 3604). - **Il cambio di paradigma** (col. 3606). - **Entusiasmi e critiche attorno alla Me.P.E.** (col. 3607). - **Approcci alla produzione e diffusione della Me.P.E.** (col. 3609). - **La Cochrane Collaboration**. - **Le riviste di pubblicazione secondaria**. - **Linee-guida basate su prove di efficacia** (col. 3610).

Premessa

Per presentare una delle più importanti novità culturali e operative per la pratica della medicina, quale la Medicina delle Prove di Efficacia [Me.P.E.] si propone di essere, non si può che partire con alcuni chiarimenti di fondo relativamente a nomi di battesimo, date di nascita e parentele e definizioni. Verranno inoltre presentate alcune delle iniziative attraverso le quali ci si sta organizzando per produrre e diffondere le informazioni scientifiche secondo i principi della Me.P.E.

I nomi di battesimo

Il termine Me.P.E. è l'adattamento italiano di *Evidence-based Medicine*. La traduzione volutamente non letterale deriva dalla consapevolezza che il termine *evidence* («evidenza») sarebbe stato in italiano fuorviante. È «evidente» qualcosa che si giustifica di per sé, che non ha bisogno di prove. Se usassimo il termine «medicina delle evidenze», tutto finirebbe per assumere una connotazione molto autoritaria, che è esattamente il contrario di quello che Me.P.E. vuole essere. È apparso pertanto preferibile tradurre *evidence* in «prova», un termine che rimanda assai meglio all'assioma di fondo della Me.P.E. che consiste nell'auspicio di una pratica della medicina dove gli atti assistenziali siano tanto più appropriati quanto più legittimati dall'onere della prova. *Onere della prova* da intendersi in un senso complessivo, che va oltre il concetto di efficacia clinica espresso in senso stretto, abbracciando l'orizzonte di un impatto complessivo sulla qualità della vita e della salute dei pazienti.

Date di nascita e parentele: Me.P.E. ed epidemiologia clinica

Il termine Me.P.E. venne usato per la prima volta nel 1992 in un articolo pubblicato sul *Journal of American Medical*

Association (JAMA). L'articolo affermava, in modo esplicito, che tutte le azioni cliniche sul piano diagnostico, della valutazione prognostica e delle scelte terapeutiche dovevano essere basate su solide prove quantitative derivate da una ricerca epidemiologico-clinica di buona qualità.

La Me.P.E. si poneva così prepotentemente come momento di svalutazione della intuizione, della valutazione non sistematica delle informazioni cliniche e dell'utilizzo del razionale fisiopatologico come base sufficiente per la decisione clinica, dando invece forte rilievo all'importanza dell'analisi sistematica della qualità e consistenza delle informazioni derivabili dalla ricerca clinica. Oltre alla competenza ed abilità clinica, quindi, la Me.P.E. pone come elementi necessari per la pratica di una buona assistenza sanitaria il possesso di nuove capacità quale — prima tra tutte — quella di saper consultare efficientemente ed interpretare validamente la letteratura scientifica.

Ma la Me.P.E. non nasceva dal nulla. Due decenni prima, circa, nasceva l'*Epidemiologia Clinica* (EC). Al di là delle specifiche definizioni tecniche, anche i propositi della EC erano quanto mai ambiziosi: «... mettere ordine nella metodologia clinica e negli approcci alla interpretazione dei risultati della ricerca e, più in generale, nello studio dei determinanti e degli effetti delle decisioni cliniche sulla salute dei pazienti».

La EC venne agli inizi trattata con molta sufficienza. Da parte dal mondo clinico che nella sua componente «meno sofisticata» non ne capiva le potenzialità innovative e nella componente più «preziosa» riteneva di non averne bisogno. Ma resistenze venivano anche dal mondo della epidemiologia tradizionale e della «sanità pubblica vecchia maniera» che vedevano nella EC una bastardizzazione metodologica da combattere in quanto destinata a creare la pericolosa illusione che la metodologia epidemiologica potesse diluire il proprio rigore per adattarsi allo studio della complessità dei problemi assistenziali.

È difficilmente contestabile che la EC abbia dato un importante contributo epistemologico e metodologico alla ricerca clinica. Questo contributo è chiaramente espresso nella diffusione di approcci espliciti alla valutazione della credibilità e rilevanza di una produzione scientifica sempre più abbondante, sempre meno facilmente accessibile e sempre meno riconducibile ad una ordinata definizione di prassi assistenziali accettabili e consolidate.

Ma detto delle parentele è importante cogliere alcuni fatti che marcano la differenza tra EC e Me.P.E. Anzitutto il contesto temporale nel quale esse si sono, rispettivamente, affacciate sulla scena della sanità. L'irruzione della Me.P.E. avviene in un'epoca nella quale il peso delle discussioni legate alla «spesa sanitaria fuori controllo» ed alla necessità di interventi di contenimento e riduzione delle risorse da destinare alla sanità è divenuto preponderante.

È cresciuta d'altronde, anche se non quanto sarebbe auspicabile, la consapevolezza sulla utilità ed importanza pratica e sulla irrinunciabilità etica di una partecipazione informata degli utenti alle scelte sanitarie.

È cambiato il modo di pensare sui sistemi sanitari. Da una parte, infatti, essi sono diventati, in modo più evidente, indicatori del grado di maturità democratica della società e della sua capacità/volontà di tenere conto dei bisogni e, quindi, banco di prova importante per l'acquisizione del consenso politico. L'assistenza sanitaria, peraltro, è diventata un fin troppo facile oggetto da sacrificare sull'altare delle compatibilità economiche e quindi da affidare alle cure di libero mercato, di cui peraltro, nel settore specifico, ci si guarda bene dal sentirsi in dovere di discutere se dav-

vero esistano non dico prove ma quantomeno indizi di efficacia.

Riconosciuta implicitamente la difficile praticabilità di una razionalizzazione basata solo su criteri di efficacia e di scelta esplicite delle priorità, è cresciuta soprattutto da parte dei politici e degli amministratori la sfiducia nella praticabilità di soluzioni che vengano dall'interno della professione.

In questo senso il movimento Me.P.E. rappresenta un tentativo di risveglio di una parte della professione medica che riconosce il proprio dovere sociale, prima ancora che professionale, di render conto alla società costruendosi una legittimità in quanto capace di agire «... non sulla base di criteri personalistici e soggettivi, ma come rappresentante di una comunità con criteri comuni fondati sulla indagine razionale e l'evidenza empirica...».

Il filosofo della scienza Thomas Kuhn ha descritto i paradigmi scientifici come «... modi di analizzare la realtà che definiscono sia la legittimità o meno dei problemi da analizzare sia la natura delle evidenze che possono essere utilizzate per risolvere questi stessi problemi». È solo quando si accumulano sufficienti prove sui difetti concettuali e pratici di un certo paradigma che esso viene rimpiazzato con un nuovo modo di vedere la realtà ed un nuovo *range* di possibili soluzioni.

Non vi è dubbio che la natura dell'assistenza sanitaria stia cambiando, che il modo di praticare la medicina stia anch'esso cambiando e che, nel quadro di questi cambiamenti, l'enfasi specifica che viene data al ruolo che le informazioni derivate dalla letteratura scientifica devono avere nell'indirizzare la pratica clinica rappresenti un vero e proprio cambio di paradigma.

Il legame tra EC e Me.P.E. è manifesto in molti aspetti. Basti pensare a quanto eccezionale era lo studio controllato e randomizzato negli anni '60 ed a come esso, invece, sia oggi il requisito essenziale per la introduzione sul mercato dei nuovi farmaci.

Il metodo delle revisioni sistematiche e le combinazioni quantitative formali dei risultati dei singoli studi, note con il termine di metanalisi, rappresentano un approccio ormai fortemente accreditato per sintetizzare le informazioni provenienti da studi diversi.

Notevoli avanzamenti, concettuali e metodologici, sono peraltro stati fatti anche nel campo della valutazione dei test diagnostici e della validazione dei modelli prognostici.

Tutte queste modifiche hanno avuto un tangibile effetto sia sul mondo della editoria scientifica che sugli atteggiamenti degli amministratori sanitari.

Un'enorme quantità di articoli è stata dedicata a cercare di spiegare ed insegnare al clinico come accedere, valutare ed interpretare la letteratura scientifica. Le principali riviste scientifiche hanno cercato di adottare standard sempre più rigorosi e soluzioni, come ad es. i «riassunti strutturati», per la presentazione degli aspetti salienti della metodologia e dei risultati degli studi primari; sono altresì comparse riviste *ad hoc* (cosiddette di «pubblicazione secondaria») per la sintesi ed il commento critico dei principali articoli comparsi sulle riviste scientifiche. Infine, viene sempre più sentita ed affermata la necessità di produrre linee-guida basate su solide revisioni di letteratura.

Tutto questo movimento costituisce ciò che va legittimamente sotto il nome di Me.P.E.

Il cambio di paradigma

Vediamo brevemente quali erano gli elementi principali del vecchio e quali sono le caratteristiche essenziali del nuovo paradigma. Il vecchio si basava sull'assunzione secondo cui

elementi sufficienti per un buon esercizio professionale erano: a) un bagaglio di esperienze ed osservazioni derivanti dalla propria esperienza personale relativamente alla utilità di un test diagnostico o di una terapia; b) la comprensione e conoscenza dei meccanismi fisiopatologici come guida alla pratica clinica; c) la padronanza delle capacità di valutazione critica fornite dal tradizionale curriculum formativo quale fattore abilitante alla capacità di valutazione critica dei nuovi test o dei nuovi trattamenti; d) il possesso di un'esperienza specifica di settore per poter generare delle valide linee-guida di comportamento clinico.

Conseguenza di questo modello è che il medico è in grado di affrontare i problemi che via via possono presentarsi basandosi sulla propria esperienza personale, ragionando rispetto al razionale biologico, facendo ricorso ad un libro di testo o consultandosi con un esperto locale. Coerentemente, introduzione e discussione rappresentano le sezioni più interessanti di un articolo scientifico e quelle sufficienti a derivare le informazioni necessarie ad un proficuo aggiornamento scientifico.

È evidente che questo modello attribuisce un notevole valore all'autorità (al nome!) scientifica e all'aderenza ai principi tradizionali di comportamento.

Le assunzioni di fondo della Me.P.E., alla base del nuovo paradigma, sono invece: a) sebbene l'esperienza e lo sviluppo di un «istinto clinico» siano un requisito essenziale per una buona pratica della medicina, lo sforzo di standardizzare e rendere riproducibili e valide le proprie osservazioni rappresenta un momento fondamentale per accrescere la credibilità delle deduzioni sull'utilità di un test o la efficacia di una terapia; b) lo studio delle basi fisiopatologiche rappresenta una guida necessaria ma non sufficiente per derivare linee di condotta clinica in quanto le deduzioni compiute a partire dalla valutazione dei meccanismi di base possono non essere corrette; c) la comprensione di regole metodologiche di base è fondamentale per poter interpretare la letteratura scientifica per quanto riguarda etiologia, diagnosi, prognosi ed efficacia di un intervento.

Da tutto questo consegue: a) che si deve accettare di dover prendere determinate decisioni in condizioni di incertezza per mancanza assoluta di informazioni rilevanti o per cattiva qualità di quelle esistenti; b) che il rispetto dell'autorità ha un peso molto inferiore rispetto alla valutazione critica rigorosa della qualità delle conoscenze disponibili.

Il singolo operatore deve infatti essere capace, secondo questo modello, di valutare criticamente e in modo autonomo la qualità e consistenza delle evidenze divenendo assai meno dipendente dal giudizio degli esperti autorevoli. Di nuovo, questo non significa sottovalutare l'importanza di quel tipo di capacità (quali la manualità e l'intuito clinico, che non si imparano certo attraverso una ricerca clinica formale) che si possono apprendere dai colleghi più esperti. Piuttosto si sottolinea un percorso che porta a porre queste capacità (*skills*) sotto una nuova luce ispirata alla capacità di interpretazione critica delle informazioni che sono disponibili.

Entusiasmi e critiche attorno alla Me.P.E.

La recente pubblicazione del giornale *Evidence-Based Medicine* ha catalizzato un dibattito che covava da un po' sotto le ceneri e che è stato, via via, surriscaldato da una serie di discussioni che ruotano su tappe fondamentali: a) l'era della battaglia sulla necessità dei trials clinici randomizzati quale metodo standard per valutare la reale efficacia di un intervento; b) l'era della progressiva presa d'atto dell'insufficienza, epistemologica prima ancora che tecnica, del modello rigido delle sperimentazioni cliniche controllate e

della transizione verso il modello dei grandi trials pragmatici di popolazione quale unico strumento adeguato a cogliere, in modo affidabile, vantaggi terapeutici modesti ma rilevanti in termini di sanità pubblica; c) l'era dell'entusiasmo per le revisioni sistematiche come metodo scientificamente rigoroso per valutare, nel loro complesso, le evidenze sull'efficacia di un determinato intervento; d) l'era del ripensamento critico circa i limiti dei trials clinici (indipendentemente dal loro approccio e dalla loro filosofia) ed anche circa i limiti delle revisioni sistematiche troppo influenzate dalla spesso scadente qualità delle ricerche primarie e poco capaci di rispettare la eterogeneità di pazienti, delle condizioni di contesto e degli interventi valutati nei singoli studi i cui risultati vengono combinati; e) l'era del confronto/scontro tra sostenitori dell'uno o dell'altro approccio e della battaglia contro i sostenitori della Me.P.E. in quanto capaci soltanto di danneggiare la credibilità sociale, prima ancora che scientifica, della medicina.

Due recenti editoriali su *Annals of Internal Medicine* e *Lancet* testimoniano di quanto possa essere alta o bassa la temperatura di questo dibattito a seconda dei rispettivi punti di vista e della percezione del «conflitto di interessi» da negare o amplificare, a seconda dei punti di vista. Nell'editoriale degli *Annals of Internal Medicine* l'A. si dichiara, retoricamente, stupito di tanta meraviglia rispetto all'entusiasmo ed al senso di novità generato dal termine Me.P.E. Con l'esplicito titolo «Evidence-based Medicine, why all this fuss?» («Me.P.E., perché tutto questo schiamazzo?»), egli dichiara che, in fin dei conti, la Me.P.E. è, ed al tempo stesso non è, una novità. Non lo è nella misura in cui, da sempre, la medicina scientifica si è basata sulla acquisizione di dati obiettivi e verificabili. Lo è, invece, nella misura in cui negli ultimi decenni è cambiata profondamente la natura stessa dell'evidenza scientifica in almeno tre componenti: a) gli standard metodologici per la raccolta delle informazioni; b) i metodi e gli strumenti per la loro analisi; c) il contesto sociale nel quale le informazioni vengono calate ed utilizzate.

Per quanto riguarda gli standard metodologici, si è passati da un tempo nel quale il singolo *case report* rappresentava il modo più elegante e raffinato di raccogliere evidenze ad una fase nella quale il ragionamento probabilistico ritiene necessario raccogliere informazioni su casistiche più ampie prima di poter parlare di associazioni, e assume come necessario lo studio clinico randomizzato prima di poter dichiarare la esistenza dell'efficacia terapeutica di un trattamento.

Anche la necessità e il rigore dei metodi e strumenti di analisi sono cambiati. Fino a qualche tempo fa bastavano alcuni semplici strumenti statistici. A parte la disponibilità dell'uso di più flessibili tecniche di analisi, è ampiamente accettata l'idea che un singolo studio, per quanto elegante e ben raffinato, non può essere sufficiente a risolvere una controversia.

Infine, anche il contesto sociale nel quale la conoscenza scientifica e la pratica della medicina si calano è anch'esso profondamente cambiato. Fino a qualche tempo fa, il parere di un esperto aveva un peso eguale, se non superiore, a quello della prova empirica. Certamente ancor oggi il parere degli esperti ha un peso importante. Sempre più, tuttavia, gli operatori cercano, a conforto delle proprie decisioni, il suffragio delle prove più che l'autorità dei singoli esperti. Ne è un esempio sintomatico il fatto che nelle diverse «scale» per ordinare l'importanza delle evidenze scientifiche a favore o contro una certa decisione, le informazioni derivate da studi clinici controllati di buona qualità siano al primo posto ed il parere degli esperti senza suffragio di studi empirici all'ultimo. Sempre più quindi ci si sta allontanando dall'autoritarismo per andare incontro all'autorevolezza. Sono tutti questi cambiamenti, e non la superiorità astratta di un metodo, che sono al centro della novità introdotta con la Me.P.E.

Il sospetto che dietro a molte delle diffidenze verso la Me.P.E. ci sia essenzialmente del conservatorismo è invece rinfocolato proprio dall'editoriale di *Lancet*. In esso (significativamente intitolato «Evidence-based Medicine, in its place!»), accanto ad alcune considerazioni condivisibili sui possibili rischi di dogmatismo della Me.P.E., emerge un chiaro fastidio per l'interesse che la Me.P.E. suscita.

Non è difficile infatti capire che tutta la polemica potrebbe tranquillamente stemperarsi se si ascoltasse davvero ciò che anche i più tenaci assertori della Me.P.E. dicono e cioè che essa: «... non ignora o trascura, ma anzi ha come punto di partenza, le evidenze derivate dalla osservazione intelligente della pratica clinica...».

C'è comunque un punto essenziale sul quale bisogna essere molto fermi: la Me.P.E. deve essere un approccio culturale complessivo che valuta la rilevanza clinico/epidemiologica di un risultato come almeno altrettanto importante rispetto alle garanzie formali di metodo. Per le stesse ragioni per cui sappiamo che non saranno certo le «good clinical practice» a produrre automaticamente *trials* di maggiore rilevanza clinica.

Non vi è dubbio che ispirarsi alla Me.P.E., per quanto grandi siano comunque le aree di pratica clinica per le quali non sono disponibili indicazioni chiare, è una scelta di fondo. Non si tratta di trasformare, come dicono alcuni, la pratica della medicina in una serie di ricette di cucina. Si tratta di integrare le migliori informazioni derivabili dagli studi disponibili con la pratica clinica, definita alla luce della esperienza personale del singolo clinico, e la valutazione più attenta possibile delle preferenze del paziente. In un certo senso, il vantaggio che la Me.P.E. fornisce è quello di rendere esplicite le alternative e le motivazioni del comportamento clinico: da una certa linea di comportamento raccomandato si può sempre dissentire, e con ragione, qualora non si ritenga appropriato un determinato intervento per un determinato paziente. Rispetto alla pratica corrente l'esistenza di raccomandazioni basate su prove di efficacia garantisce che un tale dissenso sia informato e motivato, piuttosto che casuale, perché dovuto ad implicite convinzioni del singolo operatore.

Approcci alla produzione e diffusione della Me.P.E.

La Cochrane Collaboration

La *Cochrane Collaboration* (CC) è nata nel 1993 a seguito della formazione del primo *Centro Cochrane* ad Oxford. Fondata da Iain Chalmers a partire dall'esperienza-pilota condotta nell'area dell'assistenza alla gravidanza ed al parto, la CC è nata con l'obiettivo esplicito di preparare e mantenere continuamente aggiornate revisioni sistematiche sull'impatto degli interventi sanitari.

L'opportunità di costituire un *network* internazionale (tale infatti può essere fondamentalmente definita la CC) per raggiungere tale obiettivo rispondeva alla necessità che: a) tali revisioni venissero condotte con una metodologia comune che ne garantisse qualità e validità; b) si evitasse la duplicazione non necessaria facendo in modo di favorire la collaborazione tra operatori con interessi comuni; c) si fornisse un adeguato supporto metodologico ed organizzativo a tutti gli interessati a realizzare tali revisioni attraverso una rete di centri sparsi nel mondo; d) si realizzasse un insieme di strumenti di diffusione e di aggiornamento continuo delle revisioni *Cochrane* che superasse i limiti delle tradizionali pubblicazioni cartacee privilegiando il formato di pubblicazioni elettroniche.

Nell'arco di soli tre anni (1993-1996) sono stati attivati 15 *Centri Cochrane* nel mondo (di cui 7 in Europa — Danimarca, Francia, Germania, Inghilterra, Italia, Olanda e Spagna — 5 in Nord America — 1 in Canada e 4 in USA — ed 1 ciascuno in Australia, Brasile e Sud Africa) ed hanno iniziato a produrre revisioni sistematiche oltre 25 Gruppi Collaborativi di Revisione (GCR).

I GCR rappresentano la vera unità funzionale della CC e sono organizzati come veri e propri gruppi collaborativi di ricerca internazionale, coordinati da un gruppo editoriale

internazionale formato da un numero variabile tra quattro e otto membri, e sono responsabili della preparazione e del mantenimento dei relativi registri di studi per la realizzazione di revisioni sistematiche.

I prodotti dei GCR sono raccolti nella *Cochrane Library*, il giornale elettronico della CC, pubblicato con frequenza trimestrale, che nel secondo numero del 1998 contiene quasi 700 tra revisioni sistematiche complete e protocolli di revisioni attualmente in fase di realizzazione, oltre a diverse altre informazioni relative a revisioni sistematiche «non Cochrane» pubblicate nella letteratura internazionale e alle referenze di oltre 165.000 studi clinici controllati recuperati attraverso l'attività di ricerca manuale delle riviste mediche nazionali ed internazionali che i diversi GCR compiono nelle relative aree di interesse, per identificare tutti quegli studi la cui identificazione è pregiudicata dalla incompleta indicizzazione nella banca-dati MEDLINE.

Le riviste di pubblicazione secondaria

La prima rivista in ordine di tempo a proporsi esplicitamente come veicolo di raccolta, valutazione critica e diffusione dei risultati della ricerca clinica è stata *ACP Journal Club*, supplemento della rivista *Annals of Internal Medicine*. In ogni numero di *ACP Journal Club* vengono così presentati i riassunti dei diversi lavori selezionati accompagnati dal breve commento dell'esperto.

A partire dalla fine del 1995 ad *ACP Journal Club* si è affiancata *Evidence-Based Medicine* che offre un tipo di rassegna analoga coprendo però anche altre riviste non considerate da *ACP J.C.* Nel corso del 1997 è stata avviata la pubblicazione di una serie di riviste di settore che riguardano aree quali la cardiovascolare, l'ostetricia e ginecologia, la chirurgia, l'amministrazione ed il *management* sanitario («Evidence-based Health Policy and Management»). In Italia, nel maggio 1997, è stata avviata la versione italiana di *Effective Health Care*, curata dal *Centro Cochrane* italiano. Si tratta di una rivista che, con cadenza bimestrale, presenta una sintesi delle conoscenze sull'efficacia di specifiche tecnologie ed interventi sanitari. Finora sono stati pubblicati numeri relativi a: a) chirurgia della cataratta, b) tumori del seno, c) prevenzione e trattamento dell'obesità, d) protesi d'anca, e) interventi per la tutela della salute mentale nei gruppi ad alto rischio; f) rapporto tra qualità dell'assistenza e volumi di attività.

Linee-guida basate su prove di efficacia

Il crescente interesse generatosi attorno alle linee-guida ha certamente contribuito a stimolare la ricerca per migliorarne sia la validità scientifica, al momento della loro produzione, sia la qualità e completezza della presentazione delle raccomandazioni in esse contenute. Nel contesto di un recente progetto collaborativo tra *Network Cochrane* italiano e alcune Aziende Sanitarie Italiane si è iniziato a costruire una «banca-dati» di linee-guida prodotte a livello internazionale ed a mettere a punto strumenti per la valutazione della loro qualità.

Si tratta ancora di un approccio iniziale che cerca di esplorare la bontà delle linee-guida soprattutto in funzione del rispetto di alcune regole metodologiche nel loro processo di produzione e, successivamente, di presentazione. Pur essendo un prerequisito essenziale, peraltro, la qualità delle linee-guida non è necessariamente predittiva dell'impatto che esse avranno sulla pratica clinica e sulla qualità dell'assistenza. Che resta, in ultima analisi, legato ad un complesso intreccio di fattori, tra i quali la qualità dell'evidenza scientifica può giocare a seconda delle situazioni ruoli più o meno importanti o marginali.

Bibliografia

- Davidoff F., Case K., Fried P. W., *Ann. Int. Med.*, 1995, **122** (9), 727.
 Editoriale, *The Lancet*, 1995, **346**, 785.
 Evidence-based Medicine Working Group, *JAMA*, 1992, **268**, 2420-2425.
 Grilli R., Penna A., Liberati A., *Migliorare la pratica clinica: come promuovere ed implementare linee-guida*, 1995, Pensiero Scientifico Editore, Roma.
 Liberati A., *Valutazione del bisogno sanitario e allocazione delle risorse: il difficile ruolo dell'epidemiologia*, in Costa G., Faggiano F., *Equità nella salute: lo scenario italiano*, Atti Seminario dei Laghi, 1992, Fondazione Smith & Kline, 1993, Franco Angeli, Milano.
 Liberati A., *Stat. Med.*, 1994, **13**, 1485-1491.
 Liberati A., *Nuovi Argomenti in Medicina*, 1996, **12**, 94-98.
 Liberati A. (a cura di), *La medicina delle prove di efficacia: potenzialità e limiti della Evidence-based Medicine*, 1997, Pensiero Scientifico Editore, Roma.
 Network Cochrane Italiano (AA. VV.), *Trasferire i risultati della ricerca nella pratica dei servizi sanitari: il progetto T.R.P.S.S., Agenzia Sanitaria Italiana (ASI)*, 14 febbraio 1997, pp. 48-51.
 Sackett D. L., Haynes R. B., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, 1985, Little Brown & Co., Boston.
 Sackett D. L., Rosenberg W., Gray M. et al., *Br. Med. J.*, 1996, **312**, 71-72.
 Starr P., *The Social Transformation of American Medicine*, 1982, Basic Books, Boston.
 Yusuf S., Collins R., Peto R., *Stat. Med.*, 1984, **3**, 409-415.

ALESSANDRO LIBERATI

MEGACOLON [v. vol. IX, col. 695-720; Agg. I, coll. *4945-4950]

MEGACOLON CONGENITO (IX, 695-716; *4945-4950)

Aspetti molecolari e genetici

Il megacolon agangliare (1/5000 nati vivi), altrimenti noto come malattia di Hirschsprung [MH], è una patologia caratterizzata da un'ostruzione intestinale congenita conseguente all'assenza di cellule gangliari del sistema nervoso autonomo per tratti più o meno estesi di parete intestinale. Da lungo tempo si riconosce un carattere di familiarità a questa patologia pediatrica ma è sempre stato molto difficile delucidare il tipo di ereditarietà e le modalità ad essa connesse. A tutt'oggi si stima che solo il 20% dei casi di MH sia legato ad un meccanismo autosomico dominante. Tra i casi «genetici», occorre sottolineare due caratteristiche: la bassa penetranza e un rapporto di incidenza 2:1 maschi-femmine. Inoltre, la MH ha una significativa associazione con altre patologie come la trisomia-21 (v. DOWN, SINDROME DI [v.; v.*]) o la sindrome di Waardenburg (v. WAARDENBURG, SINDROME DI**).

Solo in tempi recenti la patogenesi biomolecolare ha fatto passi avanti, con la scoperta di mutazioni che coinvolgono due diversi geni codificanti per alcuni recettori di membrana cellulare: il protooncogene *Ret* (*RET*) e il recettore dell'endotelina B. Questi sono stati descritti in casi di MH a trasmissione ereditaria (forme familiari di MH), di tipo autosomico dominante con penetranza rispettivamente incompleta e recessiva. Tuttavia, queste acquisizioni solo in parte soddisfano i dati clinici ed etiologici in nostro possesso e poiché la scoperta di queste mutazioni è presente solo in una parte dei pazienti studiati appare naturale presupporre che altri fattori ancora sconosciuti possano intervenire nella patogenesi della MH.

In particolare, analizzando sia casi familiari che sporadici, alcuni AA. hanno scoperto delle mutazioni nel gene codificante un recettore di membrana glicoproteico con attività tirosinchinasica (*Ret*), nella regione centromerica del cromosoma 10. Successivamente la sede esatta veniva codificata in 10q11.1 (delezione del tratto prossimale del braccio lungo del cromosoma 10). Questo gene è espresso da tessuti nervosi embrionali e da apparati escretori. Nel-

l'adulto, una sua espressione si osserva nei neuroni, ghiandole salivari, timo, fegato, milza, linfonodi e nel sistema endocrino. Nella clinica pratica, mutazioni in questo stesso gene sono state trovate in alcune sindromi ereditarie poliendocrine (v. NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE**), come la MEN 2A e la MEN 2B (almeno 5 famiglie affette da MEN 2 e MH sono descritte in letteratura), e nella forma familiare di carcinoma midollare della tiroide (v.**). Nel caso specifico della MH, le mutazioni del recettore (se ne conoscono 50 differenti tipi), portano a una diminuzione dell'attività tirosinchinasica che si esprime come una perdita di funzione, forse attraverso la formazione di omodimeri inattivi del recettore stesso. È sufficiente che la mutazione sia presente allo stato di eterozigosi per conferire l'acquisizione o la perdita della funzione dell'omodimero. Mutazioni del *Ret* sono state descritte nel 50% delle forme familiari e nel 15-20% delle forme sporadiche di MH. Inoltre è interessante segnalare che più del 75% delle mutazioni-*Ret* avvengono nelle forme di megacolon a segmento lungo. Tuttavia, poiché le mutazioni-*Ret* sono presenti sia nelle forme a segmento corto che in quelle a segmento lungo di MH familiare, è stato suggerito che le due forme possano essere considerate quale espressione variabile della mutazione che avviene in un singolo locus. Dal punto di vista dell'espressione clinica, le anomalie di sviluppo e differenziazione osservate nella MH potrebbero essere classificate come il risultato di un'inattivazione o di un'assenza dei prodotti codificati dal protooncogene-*Ret* (mutazione inibitrice); al contrario, la predisposizione ad alcune forme tumorali come osservato nella MEN 2A e nel carcinoma midollare familiare della tiroide, sarebbe invece il risultato di mutazioni-*Ret* iperattivanti (mutazione attivante). Il gene *Ret* è interessante come esempio di gene in cui mutazioni differenti causano differenti fenotipi. V. ONCOGENI E PROTONCOGENI**.

Accanto a questi dati biologici ed alle relative espressioni cliniche, anche l'evidenza sperimentale ci segnala l'importanza del *Ret* nello sviluppo della componente neurale enterica.

L'espressione *Ret* si riscontra nelle cellule neuroepiteliali del tratto ventrale del tubo neurale primitivo e in una piccola popolazione cellulare dei gangli nervosi dorsali. Nel sistema escretore invece, l'espressione del protooncogene *Ret* si osserva sia nei dotti mesonefrici (12 giorni di età gestazionale, nel topo) che nella gemma ureterale (14 giorni di età gestazionale, nel topo). Nello stesso modello animale l'espressione del protooncogene *Ret* si riscontra nel sistema nervoso periferico, ivi compresi il plesso di Auerbach, i gangli del sistema nervoso autonomo, alcuni gangli dei nervi cranici e la neuroretina. Questi dati morfologici indicano che il proto-*Ret* svolge un ruolo importante sia nello sviluppo del sistema nervoso periferico, che del rene. Nel modello topo in cui viene indotta una mutazione selettiva con distruzione-*Ret* (animali omozigoti per una mutazione *Ret* che induce perdita di funzione nella tirosinchinasi codificata appunto da *Ret*), si sviluppa un fenotipo autosomico recessivo caratterizzato dall'assenza totale del sistema nervoso enterico e da disgenesia o agenesia renale. Le indagini istologiche ed immunoistochimiche dimostrano un assente sviluppo a carico sia dei neuroni che delle cellule gliali dei gangli neuroenterici e dei gangli simpatici cervicali.

Dal punto di vista biomolecolare, i recettori della tirosinchinasi utilizzano proteine peculiari per trasdurre i segnali dalla superficie all'interno della cellula, permettendo così ai *growth factors* di determinare sia la proliferazione che la differenziazione cellulare. Attualmente, l'identificazione di proteine specifiche usate dal *Ret* per trasdurre i segnali dalla superficie (membrana) al centro (nucleo) dei gangli enterici non è stata ancora possibile. Tuttavia il *Ret* è coinvolto direttamente nella differenziazione dei gangli in-

testinali, così che la MH deve essere definita come un deficit nella capacità di differenziazione cellulare.

Il secondo locus codificante per il megacolon agangliare è il gene per il recettore B dell'endotelina (*EDNR-B*). Storicamente, l'evidenza sul cromosoma 13 di un secondo locus per la MH in un gruppo di Mennoniti, una ristretta popolazione con alta incidenza di MH trasmessa apparentemente con modalità autosomica recessiva, ha consentito di identificare una mutazione in omozigosi nell'*EDNR-B* in una significativa percentuale di casi. A livello sperimentale, i topi nei quali è stata introdotta un'interruzione del gene del recettore dell'endotelina, presentano un fenotipo identico a quello dei topi con mutazioni spontanee per megacolon, associato o meno a modifiche nella pigmentazione del pelo. I melanociti, tra parentesi, così come i neuroni intestinali, derivano dalle creste neurali e le loro alterazioni fenotipiche rientrano nelle manifestazioni delle *neurocristopatie*. In sostanza, tali evidenze dimostrano un ruolo specifico dell'*EDNR-B* nel processo di differenziazione e di migrazione di neuroni e melanociti durante l'embriogenesi. In particolare, l'omozigosi mostra una penetranza del 74% a paragone del 21% dell'eterozigosi; inoltre l'omozigosi è altamente associata a fenotipi non-enterici quali ipopigmentazione, iride bicolore e sordità. Pertanto, la MH appare come una patologia con implicazioni multigeniche, che richiede l'interazione di numerosi geni non imparentati tra di loro. Per ciò che attiene all'*EDNR-B*, sono descritte 12 diverse mutazioni, di cui le due più note sono W276C e A183G, entrambe presenti nelle forme omozigotiche (tab. I). Per quanto attiene alla prima mutazione, la più frequentemente osservata, i caratteri specifici sono i seguenti: a) la mutazione da sola non è necessaria né sufficiente a produrre MH; b) lo stato di omozigote ha una penetranza del 74%, l'eterozigote del 21%, se comparate all'incidenza osservata nell'intera popolazione, che è dello 0,02%; c) l'omozigosi si associa a un quadro fenotipico extraintestinale in misura elevata.

In conclusione, nella patogenesi della MH è coinvolto un numero tuttora imprecisato di geni, poiché né le mutazioni descritte per *Ret* né quelle per *EDNR-B* possono spiegare per intero il meccanismo molecolare e genetico che determina l'espressione clinica fenotipica. L'identificazione dell'intero corredo genico mutato e quindi capace di determinare l'espressione clinica delle varie forme di MH, è assai importante sia per ciò che concerne la diagnosi pre- e post-natale, che per una corretta consulenza genetica (raccomandazioni alle coppie in attesa) e per le possibili terapie

geniche che si svilupperanno. Gli studi futuri dovranno quindi chiarire, tra le altre, la frequenza di mutazioni *Ret* e *EDNR-B*, l'eventuale coinvolgimento di geni presenti su altri cromosomi ed il ruolo di quei fattori (ambientali, nutrizionali, etc.) che potrebbero contribuire alla manifestazione del fenotipo MH.

Bibliografia

- Angrist M. et al., *Nature Genetics*, 1994, 4, 351-356.
Angrist M. et al., *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4, 821-830.
Cass D. T. et al., *J. Pediatr. Surg.*, 1992, 27, 351-356.
Chakravarti A., *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, 303-307.
Edery P. et al., *Nature*, 1994, 367, 378-380.
Hofstra R. M. W. et al., *Nature*, 1994, 367, 375-376.
Martucciello G. et al., *Pediatr. Surg. Int.*, 1992, 7, 308-310.
Pachnis V. et al., *Development*, 1993, 119, 1005-1017.
Pasini B. et al., *Nature Genetics*, 1995, 10, 35-40.
Puffenberger E. G. et al., *Cell*, 1994, 79, 1257-1266.
Romeo G. et al., *Nature*, 1994, 367, 377-378.
Schuchardt A. et al., *Nature*, 1994, 367, 380-383.

GUIDO CIPRANDI, ALESSANDRO INSERRA
E CAMILLO BUGLINO

MELANOMA [v. vol. IX, coll. 743-753; Agg. I, coll. *4951-4965]

SOMMARIO

Genetica del melanoma familiare (col. 3614). - **Aggiornamenti di terapia** (col. 3614): *Chirurgia delle metastasi linfonodali*. - *Terapia genica*. - *Terapia adiuvante del melanoma metastatico*. - *Agenti citotossici*.

Genetica del melanoma familiare

È recentemente emerso (Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994; Wainwright, 1994) che molti casi di melanoma [m.] familiare presentano una delezione omozigote del gene *p16* localizzato nella regione cromosomica 9p21. Poiché il gene *p16* (*CDKN2*) è considerato un possibile candidato al ruolo funzionale di regolatore del ciclo cellulare, si può ipotizzare che la comparsa del m. familiare, così come quella di numerose altre neoplasie, dipenda dalla mancanza di una molecola codificata in 9p21 ad azione soppressoria sulla crescita tumorale. In tal senso il gene *p16* (*CDKN2*) coinciderebbe con il gene del m. familiare (MLM).

Alcuni pazienti con m. primati multipli, ma senza anamnesi familiare positiva per la malattia, possono presentare mutazioni germinali nel gene *CDKN2A* (Monzon et al., 1998).

Aggiornamenti di terapia

Diversi interessanti sviluppi si sono recentemente osservati nell'ambito dei trattamenti medico-chirurgici del m. cutaneo.

Questi riguardano particolarmente: 1) l'adozione di tecniche chirurgiche selettive per l'individuazione precoce di metastasi linfonodali; 2) l'introduzione di modalità avanzate di terapia genica nel tentativo di controllare lo sviluppo di metastasi a distanza e 3) l'uso di modificatori della risposta biologica nel trattamento complementare dei pazienti a rischio di ripresa o di quelli con malattia avanzata.

Chirurgia delle metastasi linfonodali

La chirurgia è senza dubbio la terapia di prima scelta nel trattamento delle metastasi linfonodali da m.; la controversia ancora aperta riguarda il momento in cui si deve eseguire la dissezione «radicale» di una stazione linfonodale colpita anche in uno solo dei suoi elementi linfonodali. Si discute attualmente se sia preferibile eseguire una dissezione linfonodale al momento della prima diagnosi con linfonodi clinicamente indenni (elettiva) ovvero differire la

TAB. I. CARATTERISTICHE DELLE DUE FORME DI MALATTIA DI HIRSCHSPRUNG (MH) DERIVANTI DA MUTAZIONE GENICA *RET* O *EDNR-B*

Locus	MH-1	MH-2
Gene	<i>Ret</i> (<i>RET</i>)	<i>EDNR-B</i>
Ereditarietà	dominante	pseudo-dominante
— fenotipo omozigote	non-osservato	sordità, anomalie pigmentarie, MH
— fenotipo eterozigote	MH	MH
Sede cromosomica	10q11.1	13q22
Percentuale di MH	circa 50%	circa 5%
Penetranza	50-70%	30-80%
Numero di mutazioni	48	12 (tra cui W276C e A183G)
Nuove mutazioni	15%	ignote

dissezione al momento della comparsa di linfonodi clinicamente metastatici (terapeutica).

Esistono molte indicazioni, derivate da studi randomizzati, che la prognosi di questi pazienti non sia sostanzialmente modificata dall'esecuzione di una dissezione profilattica (Veronesi *et al.*, 1977; Veronesi *et al.*, 1980). Tuttavia, se non esiste una chiara evidenza che la dissezione linfonodale profilattica sia determinante sulla sopravvivenza dei pazienti, è altrettanto evidente che un intervento sempre più precoce sulle localizzazioni metastatiche è lo scopo principale delle terapie dei pazienti affetti da tumore. Una diagnosi precoce di metastasi linfonodali potrebbe permettere un immediato inizio dei trattamenti adiuvanti dopo chirurgia con la finalità di controllare lo sviluppo e l'impianto di gruppi di cellule metastatiche a livello locale e a distanza. A tale scopo, alcuni AA. (Morton *et al.*, 1992a; Morton *et al.*, 1992b; Cochran *et al.*, 1992) hanno sviluppato una tecnica operatoria mininvasiva finalizzata all'identificazione della prima sede di drenaggio linfatico di un m. cutaneo: questo ha permesso di effettuare in maniera precisa una stadiazione intraoperatoria della malattia e, di conseguenza, di decidere in tale sede ed in assenza di linfonodi palpabili riguardo a una dissezione linfonodale radicale. L'uso di questa procedura diagnostica ci permette di identificare pazienti con metastasi linfonodali clinicamente occulte. La linfoadenectomia radicale viene quindi riservata solo a un gruppo ben identificato di pazienti in assenza di segni clinici di metastatizzazione linfonodale.

La tecnica di mappatura del drenaggio linfatico utilizza un colorante blu in grado di visualizzare la via preferenziale della linfa dal m. primitivo al linfonodo più vicino. Il linfonodo «sentinella» è usualmente il primo linfonodo colorato dal tracciante che viene inoculato intradermicamente a livello del m. primitivo. In questo modo è possibile eseguire una linfoadenectomia che viene opportunamente definita «selettiva» per distinguerla da quella «elettiva» o da quella «terapeutica» delle passate esperienze.

Vengono qui di seguito illustrati i principi di tecnica chirurgica della ricerca del linfonodo sentinella. Dopo l'induzione dell'anestesia generale, vengono iniettati 0,5-1,0 ml di *Patent blu-V* a livello intradermico, utilizzando un ago da 25-G; gli inoculi, in numero di 2-4, vengono eseguiti intorno alla sede del m. primitivo se presente, oppure intorno alla cicatrice esito di recente exeresi (fig. 1). Dopo l'inoculo, viene eseguita un'incisione cutanea lineare sopra la stazione di drenaggio linfatico regionale; viene isolato il lembo di cute



Fig. 1 M. cutaneo: sede di inoculo del *Patent blu-V*

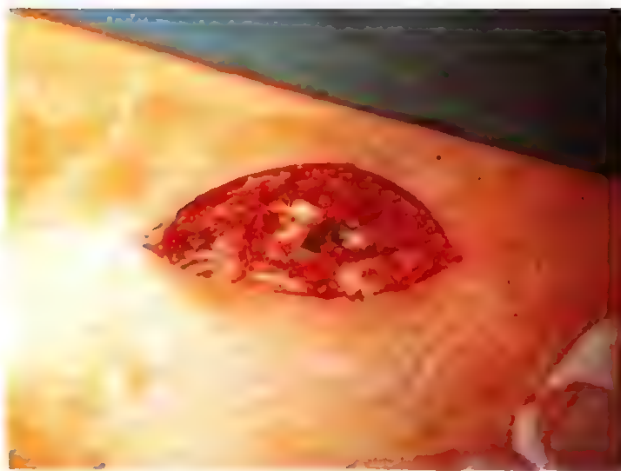


Fig. 2. Identificazione del linfonodo sentinella.

sopra l'incisione e vengono ricercati i vasi linfatici mediante manovre di scollamento molto delicate. Quando i vasi linfatici colorati sono identificati, vengono seguiti mediante una meticolosa dissezione fino al primo linfonodo di drenaggio (linfonodo sentinella) che viene facilmente individuato grazie al colorante iniettato (fig. 2).

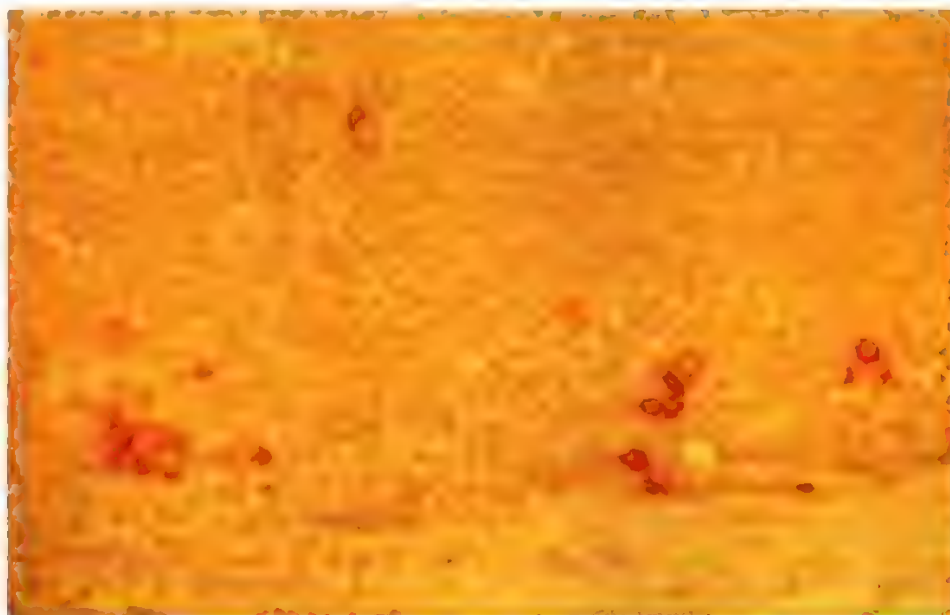
Il linfonodo sentinella (che può anche essere più di uno) viene asportato ed inviato al laboratorio di anatomia patologica per esame estemporaneo al congelatore e viene immediatamente sezionato in due parti: metà viene esaminata dopo colorazione con ematossilina ed eosina; l'altra metà viene esaminata utilizzando una rapida colorazione con immunoperoxidasi. Entrambe le sezioni vengono esaminate utilizzando anticorpi contro la proteina S-100 e anticorpi monoclonali specifici per il m. come l'*NK1/C3* e l'*HMB45* (Morton *et al.*, 1992c) (fig. 3).

Se l'esame estemporaneo documenta la presenza di cellule metastatiche all'interno del linfonodo, viene eseguita immediatamente una dissezione linfonodale secondo le ormai consolidate tecniche chirurgiche specifiche per ogni stazione linfonodale (Cascinelli *et al.*, 1988).

Nel loro studio Morton *et al.* (1992a) hanno identificato il linfonodo «sentinella» in 194 (82%) su 237 pazienti studiati e sottoposti a biopsia. Metastasi sono state evidenziate in 40 (21%) dei casi in cui il linfonodo è stato identificato. Di queste metastasi, 23 sono state diagnosticate in sezioni di linfonodi durante l'esame estemporaneo intraoperatorio, convenzionalmente colorate con ematossilina-eosina e confermate istologicamente sui preparati definitivi. Negli altri 17 casi cellule tumorali metastatiche sono state scoperte solo in sezioni trattate con tecniche immunohistochimiche. Questo conferma i dati precedentemente pubblicati (Cochran *et al.*, 1984; Cochran *et al.*, 1988) che pongono in evidenza la maggiore frequenza di identificazione di metastasi linfonodali utilizzando i metodi immunohistochimici piuttosto che i tradizionali metodi istochimici.

L'incidenza di micrometastasi nei linfonodi regionali aumenta in modo direttamente proporzionale al livello ed allo spessore del m. primitivo. Morton nel suo studio afferma che la percentuale di incidenza di metastasi in pazienti con tumore di spessore inferiore a 1,5 mm (9,8%) è significativamente molto inferiore rispetto a lesioni di spessore maggiore di 1,5 mm (36,9%). Metastasi sono state trovate in una ogni 4,85 procedure dell'intera serie; l'incidenza delle metastasi è stata documentata in una ogni 2,73 procedure se la lesione primaria era superiore a 1,5 mm di spessore, mentre è stata evidenziata una sola metastasi con le tecniche utilizzate per m. di spessore inferiore a 1,5 mm.

Fig. 3. Reattività immunoistochimica con siero anti proteina S-100 che dimostra la presenza di cellule di m. nel seno di un linfonodo (200×, colorazione ematossilina-eosina).



Terapia genica

L'uso della terapia genica, sotto varie forme, costituisce attualmente uno stimolante e promettente aspetto di ricerca nell'ambito delle terapie oncologiche avanzate e rappresenta una realtà anche per il m. cutaneo.

I progressi della ricerca immunologica hanno recentemente dimostrato: a) la presenza di antigeni tumore-specifici nel m., i geni di alcuni dei quali (MAGE-1, tirosinasi) sono stati clonati (Van der Bruggen *et al.*, 1991; Brichard *et al.*, 1993); b) la cross-reazione tra antigeni di m. e antigeni di melanociti normali riconosciuti dai linfociti T (Anichini *et al.*, 1993); c) l'accumulo nel m. di linfociti T (TIL) con recettore identico a quello di cloni T m.-specifici (Ferradini *et al.*, 1993; Sensi *et al.*, 1993). Simultaneamente, lo sviluppo delle tecniche di trasferimento genico utilizzando vettori retrovirali ha creato la possibilità di trasferire e fare esprimere nelle cellule tumorali geni di diverse citochine (Colombo *et al.*, 1992b; Foà *et al.*, 1993). L'espressione di questi geni può migliorare le proprietà immunogeniche della cellula neoplastica che riesce ad attivare una efficace risposta antitumorale nell'ospite (Colombo *et al.*, 1992b; Blankstein *et al.*, 1991; Colombo *et al.*, 1992a). L'espressione del gene dell'IL-2 si è rivelata una delle manipolazioni più efficaci nell'inibire la crescita di tumori murini e umani xenotrapantati (Fearon *et al.*, 1990; Gansbacher *et al.*, 1990; Gansbacher *et al.*, 1992a; Gansbacher *et al.*, 1992b; Gastl *et al.*, 1992) e nell'indurre una risposta T specifica e una memoria anti-tumorale nei modelli animali. Inoltre, la produzione di IL-2 da parte di cellule di m. umano geneticamente «ingegnerizzate» non altera il profilo antigenico, ma sembra talora aumentare l'immunogenicità del m. trasfettato nei confronti dei linfociti T (Melani *et al.*, 1994; Uchiyama *et al.*, 1993). Tuttavia anche la produzione di IL-4, G-CSF e di GM-CSF in seguito a trasferimento genico, almeno nei tumori murini, può determinare, con meccanismi diversi da quelli attivati dall'IL-2, l'arresto della crescita e/o il rigetto del tumore con conseguente sviluppo di immunità sistemica anche nei confronti del tumore parentale che non produce le citochine (Tepper *et al.*, 1989; Colombo *et al.*, 1991; Pardoll *et al.*, 1992; Dranoff *et al.*, 1993).

Quindi i modelli animali e gli studi *in vitro* offrono le basi razionali per affrontare la sperimentazione nell'uomo, perché le cellule tumorali geneticamente «ingegnerizzate» a produrre citochine sono in grado, quando opportunamente inoculate, di indurre una risposta T-specifica e una memoria immunologica nei confronti del tumore che, se reiniettato, viene rigettato dall'animale; questa immunità sistemica si manifesta anche nei confronti del tumore parentale che non produce citochine. Le suddette cellule sono anche in grado di indurre una regressione, o un significativo rallentamento, nello sviluppo di metastasi già presenti al momento dell'immunizzazione. Questi risultati soddisfano i requisiti per un'immunoterapia attiva dei tumori nell'uomo.

Terapia adiuvante del melanoma metastatico

La comparsa di metastasi linfonodali da m. cutaneo, nonostante la possibilità di una terapia chirurgica apparentemente «radicale», è un'evenienza prognostica molto negativa: infatti solo il 35% dei pazienti sopravvive 5 anni dopo il trattamento chirurgico.

L'unica terapia complementare provvista di una reale efficacia, fra le nuove sperimentate negli ultimi anni, è rappresentata dall'uso dell'interferone- α (IFN- α_{2a}) somministrato tre volte alla settimana per tre anni. Questo risultato è il frutto di un *trial* clinico randomizzato (chirurgia + IFN- α contro chirurgia da sola) ideato e realizzato dal WHO Melanoma Programme con la partecipazione di 23 centri ed il reclutamento di 426 pazienti (Cascinelli, 1994).

I risultati preliminari dello studio sull'uso dell'IFN- α , come adiuvante nei pazienti operati per metastasi regionali da m., sembrerebbero indicare la capacità di questa molecola di controllare e modulare l'evoluzione e la crescita di focolai occulti di malattia dopo linfadenectomia radicale in alcuni sottogruppi di pazienti, riducendo così l'incidenza postoperatoria delle riprese locali e/o a distanza.

In considerazione della molteplicità delle azioni biologiche legate all'IFN- α è difficile capire se gli effetti clinici ottenuti siano dovuti, come si riteneva inizialmente, ad una azione di stimolo sul sistema immunitario o piuttosto ad una attività più diretta sul tumore. In realtà, alcune indicazioni derivate dallo studio del WHO Melanoma Programme

MELANOMA

suggerirebbero che il beneficio terapeutico riscontrato nel gruppo trattato con IFN- α sia dovuto ad un'azione diretta di controllo e di modulazione della crescita delle cellule tumorali.

Si sta attualmente valutando la possibilità di potenziare l'azione dell'IFN- α con la combinazione di altri modificatori della risposta biologica con effetti potenzialmente sinergici.

Vogliamo infine segnalare i risultati preliminari di uno studio condotto presso l'Istituto Nazionale Tumori di Milano su un gruppo di pazienti pesantemente pretrattati per metastasi diffuse da m., mediante l'uso di timopentina ad alte dosi (200 mg-2 g) somministrata per via endovenosa per alcune settimane. La risposta ottenuta in termini di remissione o di stabilizzazione persistente della malattia e le documentate regressioni istologiche invitano a valutare anche questa possibilità nella terapia di pazienti con malattia avanzata e non altrimenti trattabili (Clemente *et al.*, 1995).

Agenti citotossici

Merita di essere da ultimo menzionata la recente identificazione (Pisha *et al.*, 1995) di un nuovo agente citotossico dotato di una specifica attività nei confronti delle cellule del m. Tale agente, contenuto in notevole quantità nella corteccia di alcune varietà di betulla, è un composto pentaciclico triterpenico, denominato *acido betulinico*, capace di inibire *in vivo* (nei topi atimici) la crescita delle cellule del m. umano, senza rilevanti effetti tossici generali. Il meccanismo d'azione dell'ac. betulinico sembra mediato dall'induzione dell'apoptosi. La possibilità di un impiego clinico della sostanza è attualmente in corso di valutazione.

Bibliografia

- Anichini A., Mortarini R., Alberti S. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1993, **53**, 994-1001.
 Blankenstein T., Rawly D. A., Schreiber H., *Current Op. Immunol.*, 1991, **3**, 694-698.
 Brichard V., Van Pel A., Wolfel C. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1993, **178**, 489-495.
 Cascinelli N., *The Lancet*, 1994, **343**, 1498-1499.
 Cascinelli N., Belli F. *et al.*, Nodal dissection for cutaneous melanoma (videotape), *WHO Melanoma Programme. European School of Oncology*, 1988.
 Clemente C., Belli F., Mascheroni L. *et al.*, *Melanoma Research*, 1995, in press.
 Cochran A. J., Wen D. R. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1984, **34**, 159-163.
 Cochran A. J., Wen D. R. *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, **12**, 612-618.
 Cochran A. J., Wen D. R. *et al.*, *World J. Surg.*, 1992, **16**, 214-221.
 Colombo M. P., Ferrari G., Stoppacciaro A. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1991, **173**, 889-897.
 Colombo M. P., Lombardi L., Stoppacciaro A. *et al.*, *J. Immunol.*, 1992a, **149**, 113-119.
 Colombo M. P., Mattesi S., Parmiani G., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 1992b, **21**, 278-282.
 Dranoff G., Jaffu E., Lazenby A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 3539-3543.
 Dreiling L. *et al.*, *Melanoma*, in Schrier R. W. *et al.*, *Advances in Internal Medicine*, 1996, Mosby-Year Book, St. Louis, pp. 553-604.
 Fearon E. R., Pardoll D. M., Itaya T. *et al.*, *Cell*, 1990, **60**, 397-403.
 Ferradini L., Mackensen A., Gemvee C. *et al.*, *J. Clin. Inv.*, 1993, **91**, 1183-1190.
 Foa R., Guarini A., *Forum Trends Exp. Clin. Med.*, 1993, **34**, 399-410.
 Gansbacher B., Houghton A. N., Livingston P. *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1993, **4**, 67-70.
 Gansbacher B., Zier K., Cronin K. *et al.*, *Blood*, 1992b, **80**, 2817-2829.
 Gansbacher B., Zier K., Datoch B. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1990, **172**, 1217-1224.
 Gail G., Finstad C., Guarini A. *et al.*, *Cancer Res.*, 1992, **52**, 6229-6236.
 Housman C. J. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8**, 15-21.
 Kamb A. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8**, 22-26.

- Melani C., Chiodoni C., Arienti F. *et al.*, *Nat. Imm.*, 1994, **13**, 76-84.
 Morton D. L., Wen D. R. *et al.*, *Arch. Surg.*, 1992a, **127**, 392-399.
 Morton D. L., Wen D. R. *et al.*, *The melanoma letter*, 1992b, **10**, 1-4.
 Morton D. L., Wen D. R. *et al.*, *Surg. Onc. Clin. North Am.*, 1992c, **1** (2), 247-259.
 Monzon J., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (13), 879-887.
 Pardoll D., *Curr. Op. Immunol.*, 1992, **4**, 619-623.
 Pisha E. *et al.*, *Nature Medicine*, 1995, **1**, 1046.
 Sensi M. L., Salvi S., Castelli C. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1993, **178**, 1231-1246.
 Tepper R. J., Pattengale P. K., Leder P., *Cell*, 1989, **57**, 503-512.
 Uchiyama A., Hoon D. S. B., Morisaki T. *et al.*, *Cancer Research*, 1993, **53**, 949-952.
 Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez C. *et al.*, *Science*, 1991, **254**, 1643-1646.
 Veronesi U., Adamus J. *et al.*, *Tumori*, 1980, **66**, 373-396.
 Veronesi U., Adamus J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1977, **297**, 627-630.
 Wainwright B., *Nature Genetics*, 1994, **8**, 3-5.

NATALE CASCINELLI

MELATONINA

F. melatonine. - I. melatonin. - T. Melatonin. - S. melatonina.

SOMMARIO

Biosintesi e metabolismo (col. 3620). - **Ruolo funzionale** (col. 3621): *Recettori della melatonina. - Melatonina e ritmi circadiani. - Melatonina e funzioni riproduttive. - Melatonina e sistema immunitario. - Melatonina e invecchiamento. - Melatonina e disturbi dell'affettività.*

Biosintesi e metabolismo

La melatonina [m.] (N-Acetil-5-metossitriptamina) è un ormone prodotto dall'epifisi (v.; v.*). Poiché la sua sintesi dipende dal ciclo giorno/notte, la m. è in grado di svolgere un importante ruolo nella regolazione circadiana di numerosi processi fisiologici e neuroendocrini. Nei vertebrati rappresenta, infatti, il trasduttore dell'informazione fotoperiodica ottenuta dall'organismo attraverso i recettori retinici; in questo senso essa fornisce a tutti gli organi preziose informazioni riguardanti sia l'ora del giorno sia — attraverso la misurazione della durata reciproca del giorno e della notte — il periodo dell'anno, comportandosi quindi come l'«orologio» e il «calendario» dell'organismo.

La m. è sintetizzata a partire dal triptofano (v.; v.*) e ha come importante metabolita intermedio la serotonina (v. XV, 496; *7269). La tappa limitante nella sua sintesi è rappresentata dalla acetilazione della serotonina da parte dell'enzima arilalchilamina N-acetiltransferasi (NAT) (fig. 1), che svolge quindi un ruolo fondamentale nel determinare le variazioni circadiane reciproche delle concentrazioni epifisarie di serotonina e di m. e di conseguenza della secrezione di quest'ultima nel torrente circolatorio. L'informazione per le variazioni cicliche dell'attività della NAT è fornita all'epifisi dal nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo (che funziona come un oscillatore ed è quindi considerato l'«orologio interno» dell'organismo), attraverso una via multisinaptica che interessa il nucleo paraventricolare, le cellule della colonna intermediolaterale del midollo spinale e i gangli simpatici cervicali superiori. La luce, attraverso una proiezione retino-ipotalamica, regola la funzione oscillatoria del nucleo soprachiasmatico e la sincronizza con il ciclo giorno/notte. A sua volta, il nucleo soprachiasmatico modula l'attività della NAT epifisaria stimolando il rilascio di noradrenalina dalle terminazioni post-gangliari simpatiche presenti a livello epifisario.

La m. plasmatica è quasi esclusivamente di origine pineale e le sue concentrazioni sono pressoché nulle dopo rimozione chirurgica dell'epifisi. Tuttavia, essa viene sintetizzata anche in altri organi, come la retina (probabilmente a livello dei fotorecettori) e l'apparato gastroenterico.

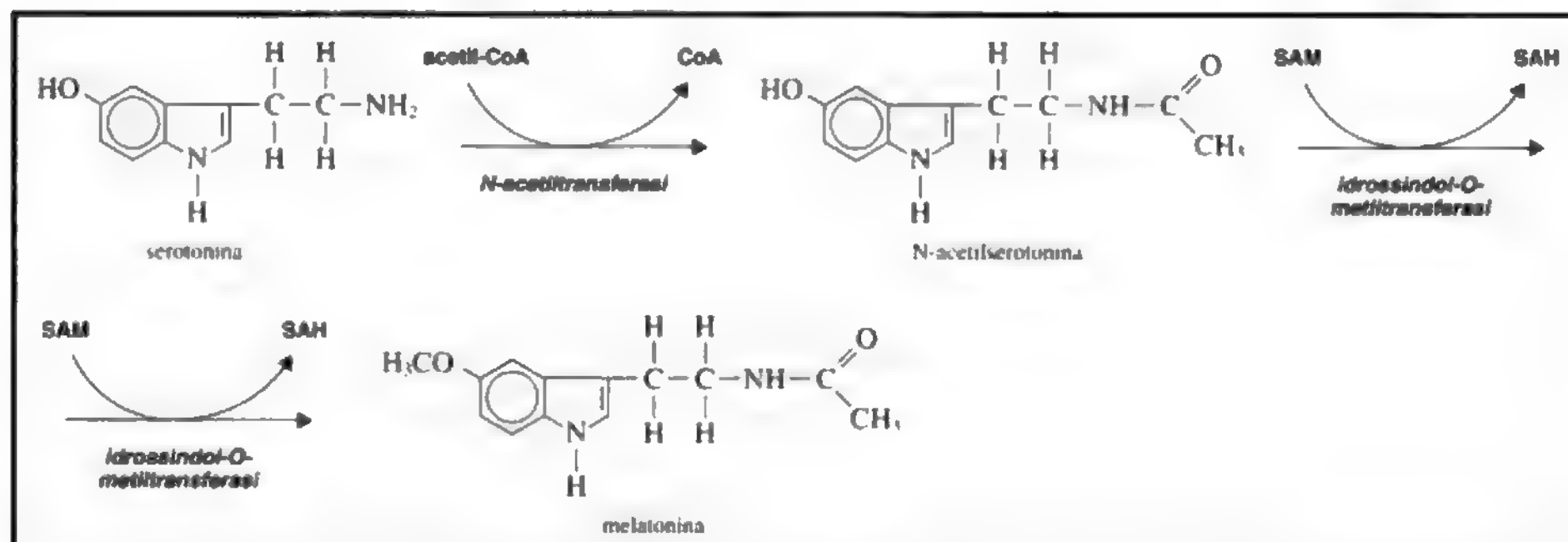


Fig. 1. Formazione della m. a partire dalla serotonina a livello dell'epifisi: CoA) coenzima A; SAM) S-adenosilmetionina; SAH) S-adenosilomocisteina.

Nell'uomo i livelli plasmatici di m. variano ciclicamente da 5-10 pg/ml, durante il giorno, a 50-150 pg/ml di notte, con uno zenit tra le ore 2 e le 4. Le concentrazioni plasmatiche riflettono direttamente le quantità di ormone sintetizzato, poiché per la sua lipofilia esso viene secreto per diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica dei pinealociti. L'emivita plasmatica varia da 20 a 50 min, a seconda che si tratti di m. endogena o esogena. La m. viene metabolizzata a livello epatico ed eliminata nelle urine come 6-metossimelatonina, la cui escrezione giornaliera rappresenta un indice della secrezione epifisaria dell'ormone durante le 24 ore.

Ruolo funzionale

Recettori della melatonina

Specifici recettori di membrana per la m. sono stati identificati in numerose aree del sistema nervoso centrale. A livello cerebrale, anche zone non neuronali possiedono recettori per la m., in particolare la *pars tuberalis* dell'adenipofisi, dove l'ormone regola la funzione riproduttiva negli animali con accoppiamento stagionale. Altri siti di legame sono stati identificati a livello di linfociti, piastrine, apparato gastrointestinale, cuore, polmone, rene. I recettori di membrana per la m. sono stati suddivisi, sulla base della loro affinità di legame (v. XIII, 193), in due gruppi: a) ML1, recettori ad alta affinità ($K_d < 300$ pM); b) ML2, recettori a bassa affinità ($K_d = 0,9-10$ nM). Inoltre è stato evidenziato come la m. sia in grado di interagire anche con siti citosolici (ad es., attraverso il legame con la calmodulina, alterando gli effetti del Ca^{2+} su vari enzimi e proteine strutturali) e nucleari, non solo agendo come «scavenger» di radicali liberi e quindi proteggendo il DNA dai loro effetti tossici, ma anche regolando l'espressione genica.

Melatonina e ritmi circadiani

Come già sottolineato, il ruolo principale della m. consiste nella regolazione dei ritmi circadiani di molte funzioni fisiologiche. In tutti i vertebrati e in molte specie di invertebrati la sua secrezione segue un ritmo circadiano con uno zenit notturno, con un andamento che è indipendente dal tipo di attività propria della specie (diurna, notturna o crepuscolare) e quindi non legato al ciclo sonno/veglia, ma a quello luce/buio. Il ruolo della m. nella regolazione dei vari ritmi circadiani nell'uomo è dimostrato da numerose osser-

vazioni, come ad es. la capacità dell'ormone, somministrato nelle ore serali, di ripristinare un ritmo sonno/veglia normale nei soggetti ciechi o il suo effetto ipnoinducente negli individui che soffrono di insonnia da difficoltà di addormentamento. Nei soggetti normali, la somministrazione di questo ormone, anche nelle ore diurne, si è dimostrata in grado di indurre sonnolenza; tale effetto è comunque sensibilmente maggiore se la m. viene somministrata nelle ore serali. Il possibile impiego farmacologico della m. come agente ipnoinducente, in alternativa alle benzodiazepine o in combinazione con esse, è attualmente allo studio. Un altro possibile impiego suggerito è quello nel trattamento della «jet-lag syndrome» (v. RITMI BIOLOGICI**), per ridurre gli effetti del cambiamento di fuso orario nei viaggiatori: la somministrazione serale di m. sembra infatti in grado di alleviare i sintomi di affaticamento, disorientamento, nausea e perdita di appetito propri di questa sindrome.

Melatonina e funzioni riproduttive

L'effetto della m. sulla regolazione dei ritmi circadiani ha, negli animali, un importante risvolto nella determinazione dei meccanismi fisiologici ad andamento stagionale: infatti, le informazioni riguardanti la durata reciproca del giorno e della notte, variabile con le stagioni dell'anno, sono in grado di indurre fenomeni come il letargo invernale e l'accoppiamento stagionale, quest'ultimo mediato da modificazioni della secrezione del GnRH (v. VIII, 439; *4154). In particolare, l'effetto inibitorio della m. sulla secrezione ipotalamica di GnRH, e quindi sull'estro stagionale, è mediato dai recettori presenti a livello della *pars tuberalis* dell'ipofisi, mentre la relativa scarsità di tali recettori nell'uomo rende ragione del fatto che la nostra specie non presenta una attività riproduttiva stagionale. Ciò non significa, tuttavia, che la m. non abbia influenza sull'asse neuroendocrino-riproduttivo nell'uomo. La m. inizia ad essere prodotta circa al 3 mese di vita, raggiungendo livelli notturni molto elevati all'età di 1-3 anni, che si riducono poi progressivamente dell'80% nel corso degli anni successivi, sino all'adolescenza. Alcuni studi suggeriscono che sia proprio tale riduzione dei livelli notturni di m. a innescare il picco di secrezione di GnRH che induce la pubertà. Tale azione è confermata da vecchie osservazioni sull'induzione di pubertà precoce da parte di neoplasie dell'epifisi (v.; v.*) non parenchimali (ad es., teratomi), che comprimono e distruggono la ghiandola. Al contrario, tumori pineali parenchi-

MELATONINA

mali in grado di secernere eccessive quantità di m. causano un ritardo puberale. Elevate concentrazioni notturne di m. sono state dimostrate in donne con amenorrea indotta da stress, esercizio fisico o anoressia nervosa e in maschi con oligo- o azoospermia; tuttavia, il trattamento sostitutivo con ormoni sessuali è stato in grado di ripristinare normali livelli di m., suggerendo un effetto di modulazione da parte degli steroidi sessuali sulla secrezione di questa sostanza. Sono in corso sperimentazioni volte a determinare la possibile efficacia di elevate dosi di m., combinata con progestinici, come mezzo contraccettivo naturale, scevro dagli effetti collaterali sull'apparato cardiovascolare propri degli estrogeni.

Melatonina e sistema immunitario

Negli ultimi anni è venuta affermandosi con sempre maggiore evidenza la possibilità di una connessione tra *sistema neuroendocrino* (v. PSICONEUROENDOCRINOLOGIA**) e *sistema immunitario* (v. PSICONEUROIMMUNOLOGIA**), ed è stato proposto che la m. svolga un ruolo fondamentale nella complessa rete di interrelazioni tra questi due sistemi. Effettivamente studi condotti *in vitro* e *in vivo*, nell'animale e nell'uomo, hanno dimostrato che la m. ha un importante effetto immunomodulatorio. Essa, infatti, è in grado di stimolare la produzione di anticorpi diretti contro antigeni T-dipendenti nel topo e di ridurre gli effetti immunosoppressivi dello stress acuto o della somministrazione di corticosteroidi sulla produzione di anticorpi, sullo sviluppo del timo e sulla resistenza antivirale. I meccanismi responsabili di tale effetto immunostimolatorio non sono chiari, ma vi sono evidenze che suggeriscono che possano essere coinvolti il rilascio di ormoni oppioidi e di interleuchina-2 da parte dei linfociti T-helper, con induzione di attività *natural killer* e di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. Recettori specifici ad alta affinità per la m. sono stati recentemente dimostrati nei linfociti T umani, in particolare in quelli CD4⁺. Inoltre, la m. è in grado di attivare i monociti, aumentandone la citotossicità e la secrezione di IL-1.

Sulla base di tale effetto immunostimolante e di studi *in vitro* che ne dimostrano la capacità di agire come oncostatico, sono in corso studi clinici per valutare la possibile efficacia della m. come sostanza anti-tumorale naturale. Un dato interessante è che essa sembra in grado di antagonizzare gli effetti mitogeni degli estrogeni, probabilmente attraverso l'inibizione della trascrizione del gene del recettore per gli estrogeni. Un altro possibile effetto antioncogeno della m. è rappresentato dalla sua eccezionale capacità antiossidante, che ne fa il più efficace «scavenger» di radicali liberi, altamente tossici e in grado di determinare alterazioni del DNA. È stato anche ipotizzato che il possibile effetto oncogeno dei campi elettromagnetici possa esplicarsi attraverso una inibizione della secrezione notturna di m.

Melatonina e invecchiamento

Negli ultimi anni si è andata sviluppando l'ipotesi che la riduzione con l'età dei livelli di m. circolante, di cui peraltro non è chiara l'origine, possa avere un ruolo importante nello sviluppo di alcune manifestazioni tipiche dell'*invecchiamento*. Le osservazioni che vengono portate a sostegno di questa ipotesi comprendono l'elevata incidenza di insonnia e di altri disturbi del sonno negli anziani, gli effetti immunomodulatori e oncostatici della m., il suo effetto stimolatorio sulla secrezione di GH, l'azione di «scavenger» dei radicali liberi, l'effetto inibitorio sull'aggregazione piastrinica. Tuttavia, non esistono evidenze sperimentali nell'uomo che la m. possa svolgere effettivamente un ruolo protettivo nei confronti dell'invecchiamento.

Melatonina e disturbi dell'affettività

Infine, è stata descritta una associazione tra ritmicità della secrezione diurna e stagionale della m. e *disturbi dell'affettività*, compresi alcuni tipi di depressione endogena. La depressione ricorrente invernale, nota anche come disordine affettivo stagionale, migliora drasticamente se il paziente viene esposto a luce intensa nelle ore immediatamente precedenti l'alba e successive al tramonto, così da prolungare artificialmente il fotoperiodo naturale. Comunque, in questo tipo di pazienti l'esposizione alla luce si è dimostrata un rimedio efficace indipendentemente dal suo effetto sulla secrezione di m., poiché la soppressione farmacologica della m. in questi pazienti non ha avuto effetto terapeutico. I livelli di m. circolante sono relativamente bassi nei pazienti affetti da depressione primaria, ma possono essere normalizzati con alcuni farmaci antidepressivi. Nei pazienti con disordini affettivi di tipo bipolare è stato riscontrato un significativo aumento dei livelli sierici di m. durante la fase maniacale. Livelli di m. inferiori alla norma sono stati descritti anche in pazienti con anoressia nervosa, bulimia e schizofrenia cronica.

Bibliografia

- Arendt J. et al., *J. Biol. Rhythms*, 1997, **12**, 604.
Dollins A. B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 1824.
Dubocovich M. L., *TIPS*, 1995, **16**, 50.
Grad B. R., Rozencwaig R., *Psychoneuroendocrinology*, 1993, **18**, 283.
Penev P. D., Zee P. C., *Ann. Neurol.*, 1997, **42**, S45.
Reiter R. J., *Endocr. Rev.*, 1991, **12**, 151.
Waldhauser F., Ehrhart B., Förster E., *Experientia*, 1993, **49**, 671.
Webb S. M., Puig-Domingo M., *Clin. Endocrinol.*, 1995, **42**, 221.

FERDINANDO DE NEGRI

MENISCHI E LEGAMENTI [v. Agg. I, coll. *5006-5026]

SOMMARIO

Premessa (col. 3624). - **Ricostruzione artroscopica del legamento crociato anteriore** (col. 3624): Ricostruzione con il tendine rotuleo. - Ricostruzione con i tendini dei muscoli gracile e semitendinoso. - Fase postoperatoria. - **Il trattamento chirurgico della lesione del legamento crociato posteriore** (col. 3630). - **La sindrome da attrito subacromiale della spalla** (col. 3632): Definizione. - Etiopatogenesi. - Anatomia patologica. - Sintomatologia. - Diagnosi. - Principi di trattamento.

Premessa

Il trattamento della patologia legamentosa e tendinea del ginocchio e della spalla costituisce il naturale completamento delle nozioni anatomiche, biomeccaniche e cliniche inerenti queste due articolazioni, così rapidamente evolute negli ultimi anni anche grazie alla diagnostica per immagini e all'artroscopia (v.*) diagnostica e chirurgica.

Per quanto riguarda il ginocchio, va detto che le diverse tecniche di ricostruzione del *legamento crociato anteriore* sono allo stato attuale precise, affidabili e ben collaudate, anche in questo caso grazie al decisivo apporto dell'artroscopia. Le tecniche di ricostruzione del *legamento crociato posteriore* necessitano invece di un più lungo periodo di revisione dei problemi e di valutazione dei risultati conseguiti dal trattamento di questa più complessa patologia.

Ricostruzione artroscopica del legamento crociato anteriore

Per la ricostruzione del legamento crociato anteriore (LCA) vengono utilizzati, a seconda dei casi, il tendine rotuleo o i tendini dei muscoli gracile e semitendinoso.

Ricostruzione con il tendine rotuleo

Attualmente il LCA può essere ricostruito con il terzo medio del tendine rotuleo con due tecniche diverse tra loro, ma eseguite entrambe in artroscopia: a) *Out-In* (da fuori a dentro); b) *In-Out* (da dentro a fuori).

I tempi chirurgici sono:

- l'artroscopia diagnostica;
- il trattamento delle lesioni meniscali;
- la rimozione del residuo del LCA;
- la toilette della gola intercondiloidea con l'eventuale plastica di ampliamento;
- l'esecuzione dei tunnel femorale e tibiale;
- il prelievo e la preparazione del trapianto;
- il passaggio del neolegamento;
- la fissazione.

Trattamento delle lesioni meniscali. - Dopo aver eseguito un'accurata artroscopia diagnostica e dopo aver trattato l'eventuale patologia meniscale si passa ad eseguire la rimozione del residuo del LCA e la toilette della gola intercondiloidea (fig. 1). Il residuo viene rimosso completamente dalla tibia mediante strumento motorizzato. È molto importante eliminare bene i residui fibrosi del fondo della gola per meglio posizionare la guida femorale.

Toilette della gola. - Non viene eseguita di routine. Anzi, nella maggior parte dei casi che vengono operati, essendo lesioni recenti, non ne sussiste la necessità. La gola viene invece ampliata in caso di ristrettezza congenita o, come più frequentemente accade, nelle lesioni inveterate del LCA, quando appare ristretta per osteofitosi o per apposizione di tessuto fibrosclerotico molto duro (fig. 2).

Tunnel femorale e tibiale (tecnica Out-In). - Per quanto concerne il tunnel femorale si esegue una piccola incisione cutanea laterale con il ginocchio a 90°. Si incide longitudinalmente la fascia lata 2 cm anteriormente al suo margine posteriore e si separa il vasto laterale del setto intermuscolare applicando un apposito divaricatore (fig. 3). Per via anteromediale si applica la guida femorale controllando

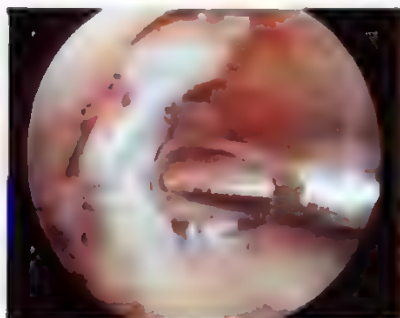


Fig. 1. Toilette della gola intercondiloidea e rimozione del residuo del LCA con strumento motorizzato.

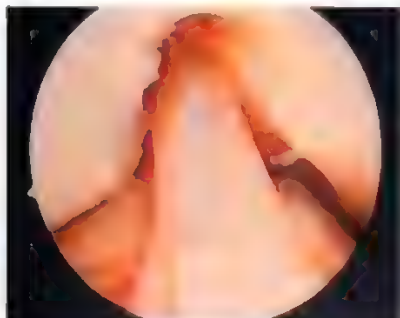


Fig. 2. Gola intercondiloidea congenitamente stretta.



Fig. 3. Esecuzione del tunnel femorale. Il divaricatore da vasto laterale in sede.

con l'artroscopio che la punta si agganci bene dietro il fondo della gola. Si fa passare il filo di Kirschner e si controlla che l'emergenza sia sul punto voluto prima di passare con le frese cannulate. Eseguito il foro, si smussa il margine anteriore all'interno della gola utilizzando una raspa curva che viene fatta passare dall'esterno del foro stesso (fig. 4).

Per quanto concerne il **tunnel tibiale**, si esegue una incisione cutanea longitudinale centrale dall'apice rotuleo alla tuberosità tibiale anteriore e si divarica la cute. Attraverso l'accesso anteromediale si applica la guida tibiale e si passa quindi la stessa fresa cannulata utilizzata per il foro femorale (fig. 5).

Prelievo e preparazione del trapianto. - Si divide con due incisioni il tendine rotuleo centralmente, ottenendo una porzione larga circa 1 cm (la misura può essere aumentata o diminuita a seconda dei casi). Si eseguono 2 piccoli fori (1,5 mm di diametro), uno sull'apice rotuleo, l'altro sulla tuberosità tibiale, e con un'opportuna sega oscillante si procede al prelievo delle pastiche ossee (fig. 6).

Il difetto che si viene a creare nel tendine rotuleo viene chiuso con alcuni punti di sutura riassorbibili (non troppo serrati perché potrebbero abbassare la rotula) o viene lasciato aperto chiudendo il solo peritoneo.

Fissazione. - Le pastiche del trapianto vengono assicurate all'osso dei tunnel con il metodo della vite ad interferenza (fig. 7).

Tecnica In-Out. - Questa tecnica di ricostruzione del LCA per via artroscopica è stata proposta da Rosenberg nel 1992. Tale tecnica prevede l'esecuzione del tunnel femorale dall'interno dell'articolazione (anziché dall'ester-

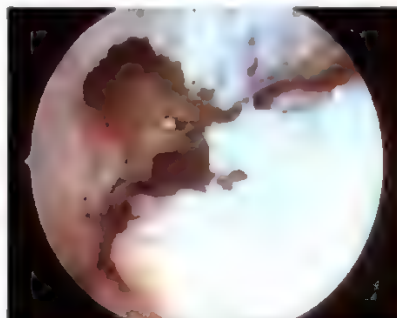


Fig. 4. Esecuzione del tunnel femorale. Il foro femorale dall'interno dell'articolazione.

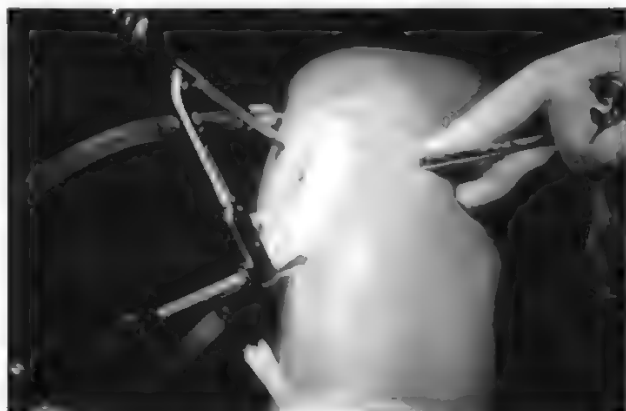


Fig. 5. Esecuzione del tunnel tibiale. La guida tibiale in sede.

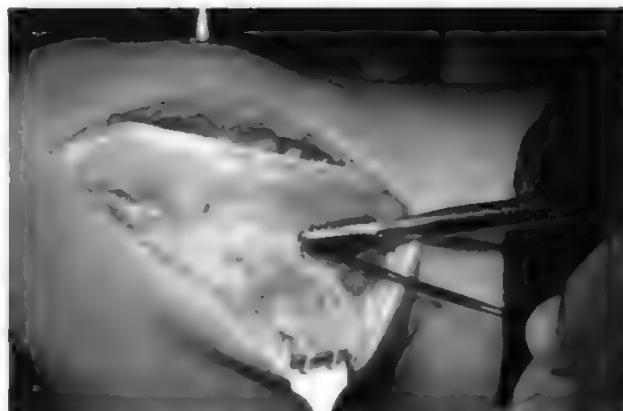


Fig. 7. Fissazione del trapianto con vite ad interferenza.

no), passando con la fresa dal tunnel tibiale, che viene eseguito per primo.

Il tunnel femorale è in realtà un «mezzo tunnel» in quanto ha profondità identica alla lunghezza della bratta ossea tibiale. La sintesi del neolegamento nel mezzo tunnel femorale avviene con una vite ad interferenza (come nella tecnica precedente), ma con direzione dall'interno dell'articolazione verso l'esterno. La testa della vite, quindi, rimane nell'articolazione del ginocchio. La sintesi tibiale avviene come nella tecnica precedente, con una seconda vite ad interferenza.

Questa tecnica, indiscutibilmente affascinante per motivi estetici (una sola incisione) e per la sua apparente semplicità, non è scevra da difficoltà e complicazioni. Il tunnel femorale può facilmente essere troppo anteriore, la vite ad interferenza femorale può danneggiare il tendine e, se non applicata con la tecnica esatta, può sporgere nel cavo popliteo. Inoltre, nel caso in cui si renda necessaria la rimozione della vite dall'articolazione, questa può essere molto difficoltosa, se non impossibile, senza danneggiare il trapianto.

È per questo motivo che da qualche anno sono state proposte delle viti in materiale riassorbibile (acido poliglicolico) ben visibili inizialmente anche in radiografia, che poi scompaiono progressivamente.

Ricostruzione con i tendini dei muscoli gracile e semitendinoso

Per ricostruire il LCA, in alternativa al tendine rotuleo vengono impiegati, in casi selezionati, i tendini dei muscoli gracile e semitendinoso. L'utilizzazione del gracile e del semitendinoso non è una novità, anzi, è una delle metodiche meglio conosciute e più sfruttate.

L'esperienza di chi scrive si riferisce a due tecniche: la prima messa a punto da Perugia e Puddu tra il 1980 e il 1983 e l'altra corrispondente alla descrizione di Cho e di Lipscomb. Anche in questi casi ci si giova dell'assistenza artroscopica. Le differenze di tecnica tra questi due interventi e la ricostruzione con il tendine rotuleo riguardano principalmente la preparazione del trapianto e la sua fissazione.

1. *Intervento di Perugia-Puddu.* — Prevede l'utilizzazione dei tendini disinserendoli distalmente dalla tibia con una bratta ossea (fig. 8).

Il trapianto, rinforzato da una fascetta di polidossanone (PDS) da 7,5 mm, viene passato profondamente al tendine del muscolo sartorio e trasposto nell'articolazione attraverso i tunnel transossei eseguiti nella tibia e nel femore con l'aiuto di un passafili. La fissazione è ottenuta anno-

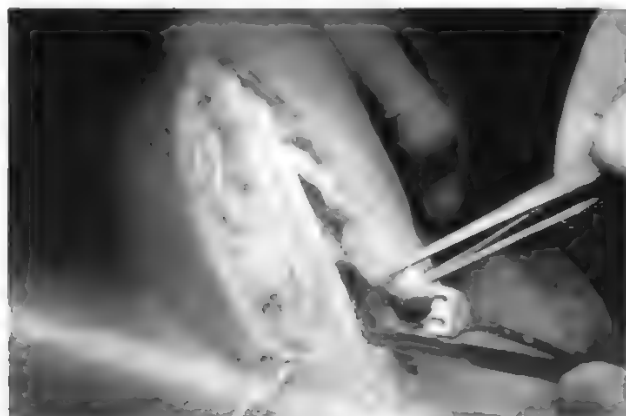


Fig. 6. Prelievo del terzo centrale libero del tendine rotuleo con prelievo delle pastiche ossee.

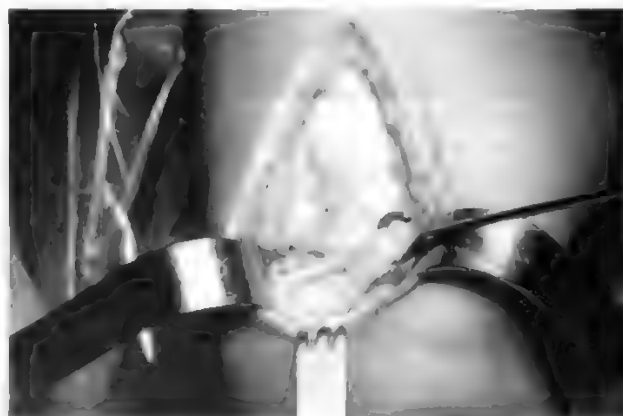


Fig. 8. Prelievo dei tendini del gracile e del semitendinoso secondo Perugia e Puddu.



Fig. 9. Fissazione del trapianto con cambra metallica.

dando la fascetta di PDS ad una cambra posta a cavaliere dell'emergenza del foro femorale (fig. 9).

2. *Ricostruzione secondo Cho-Lipscomb.* - Utilizza gli stessi tendini, ma sezionati alla loro giunzione con il ventre muscolare (fig. 10).

Dopo aver accuratamente disseccato i tendini, questi vengono sezionati alla giunzione muscolotendinea. Anche in questo caso il trapianto è rinforzato con una fascetta di PDS da 7.5 mm. Per la fissazione dei tendini si utilizza lo stesso tipo di cambra dell'intervento precedente.

Attualmente la tecnica più usata è quella proposta da Rosenberg, nella quale il tendine del semitendinoso viene reso libero disinserendolo dalla sua inserzione distale tibiale e disseccandolo con un *tendon stripper* nella sua giunzione muscolotendinea.

Così facendo si ottiene un trapianto libero tendineo della lunghezza di circa 25 cm. A questo punto il tendine viene quadruplicato e fissato prima nel foro femorale e poi nel tibiale. Con tale tecnica, la resistenza meccanica del tendine del semitendinoso quadruplicato sarebbe di molto superiore a quella ottenibile con le tecniche precedentemente descritte.

Fase postoperatoria

Al termine dell'intervento il ginocchio è protetto da un tutore femoromalleolare articolato, bloccato nella massima estensione.



Fig. 10. Prelievo dei tendini del gracile e del semitendinoso secondo Cho e Lipscomb.

Il giorno seguente l'arto, con il tutore sbloccato, viene posto su di un telaio motorizzato, che permette il ripristino dell'articolazione del ginocchio con il movimento passivo.

In seconda giornata vengono rimossi i drenaggi ed il paziente inizia la deambulazione a carico parziale con l'aiuto di due bastoni canadesi.

Ad un mese dall'intervento l'articolazione dovrebbe essere totale ed il paziente in grado di deambulare correttamente senza alcun fastidio, abbandonando tutore e bastoni canadesi.

Bibliografia

De Paulis F., Puddu G., *Ginocchio: diagnostica per immagini e inquadramento clinico*, 1996, Gnocchi Editore, Napoli.
Puddu G., Cerullo G., *La patologia del legamento crociato anteriore: diagnosi e trattamento*, 1994, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma.

GIANCARLO PUDDU,
MASSIMO CIPOLLA E GUGLIELMO CERULLO

Il trattamento chirurgico della lesione del legamento crociato posteriore

La tecnica di ricostruzione del legamento crociato posteriore (LCP) costituisce ancora oggi, una fonte di discussione. Infatti i risultati clinici non sono sempre buoni e spesso l'intervento riesce a ridurre, ma non ad annullare, l'instabilità posteriore. Ciò è dovuto a quattro ragioni:

a) il diametro del LCP è una volta e mezzo quello dell'anteriore (fig. 11) e attualmente non si dispone di un tessuto autologo tanto resistente (fino ad oggi ci si è accontentati di ricostruire il fascio più importante, quello antero laterale e forse per questo motivo non si hanno risultati ottimali);

b) funzionalmente, il LCP è costituito da 4 fasci: antero laterale, posteromediale, menisco femorale anteriore (Humphrey) e menisco femorale posteriore (Wrisberg);

c) la forza di gravità, a cui è continuamente sottoposto il ginocchio operato, è sfavorevole al LCP in quanto ne provoca una progressiva distensione;

d) la ripresa della flessione e l'azione della muscolatura flessoria deve necessariamente essere cauta e molto ritardata nel tempo, pena la distensione del neolegamento.

Proprio per questi motivi si operano solo casi selezionati, che poi dovranno essere seguiti da una riabilitazione postoperatoria cauta, mirata e precisa.



Fig. 11. Il legamento crociato posteriore e la sua inserzione femorale.

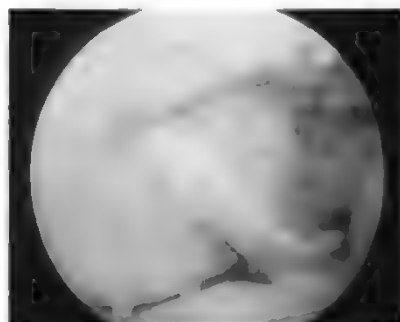


Fig. 12. Ricostruzione artroscopica del legamento crociato posteriore con tendine rotuleo.

1. **Ricostruzione del LCP.** - Viene eseguita a seconda delle preferenze del chirurgo: a) per via artroscopica (fig. 12); b) a cielo aperto; c) a cielo aperto con una via di accesso anteriore ed una seconda via di accesso posteriore.

Il vantaggio di questa ultima tecnica sarebbe quello di non inserire il neolegamento in un tunnel tibiale, ma di «accostarlo» e fissarlo nella sua zona di inserzione senza costringerlo ad una angolazione nel tunnel tibiale. Infatti per alcuni AA. è proprio l'angolo (circa 90°) del tunnel tibiale che favorisce l'usura e quindi la distensione del neolegamento.

2. **Tessuto autologo utilizzato.** - Può essere a seconda delle preferenze del chirurgo:

- il terzo medio del tendine rotuleo libero come per il LCA, ma con una dimensione maggiore (11-12 mm);

- i tendini del gracile e del semitendinoso associati ad un legamento artificiale, che dovrebbe agire come un tutore provvisorio per impedire una eventuale distensione del neolegamento nei primi mesi della riabilitazione.

3. **Fissazione del neolegamento.** - Può variare a seconda del tessuto autologo scelto e delle abitudini dell'operatore.

Le pastiche ossee possono essere fissate con viti ad interferenza metalliche o riassorbibili in acido poliglicolico o con filo metallico annodato su di una vite.

L'estremità tendinea viene fissata con cambre o con fili di sutura particolarmente robusti annodati su di una vite o su di una cambra.

4. **Conclusioni.** - La tecnica chirurgica è comunque difficile e complessa per cui è bene che solo i chirurghi più esperti trattino questa patologia.

Anche se rara, rispetto alle lesioni del crociato anteriore, la rottura del LCP deve essere diagnosticata nello stadio acuto e classificata grazie alla RMN in parziale, interstiziale o totale (fig. 13). Il test del cassetto posteriore (v. MENISCHI E LEGAMENTI*, coll. *5015-5016, fig. 13) e l'aumento della rotazione tibiale esterna permettono la diagnosi di lesione isolata o associata.

Pur se i risultati dell'intervento non sono buoni come quelli delle ricostruzioni del LCA dobbiamo tener presenti le indicazioni all'intervento chirurgico sia nei casi acuti che cronici.

La riabilitazione, sia dei casi trattati conservativamente che di quelli operati, è delicata e deve «lottare» contro la forza di gravità e contro l'azione negativa dei flessori del ginocchio.

Bibliografia

De Paulis F., Puddu G., *Ginocchio: diagnostica per immagini e inquadramento clinico*, 1996, Gnocchi Editore, Napoli.
Spinelli M., *Il legamento crociato posteriore del ginocchio*, 1991, Anto Goggi Editore, Bologna.

GIANCARLO PUDDU,
MASSIMO CIPOLLA E GUGLIELMO CERULLO

La sindrome da attrito subacromiale della spalla

Definizione

La sindrome da attrito subacromiale è una condizione patologica dolorosa della spalla, dovuta all'urto della cuffia dei rotatori contro l'arco acromiale. Tale quadro morboso viene anche comunemente chiamato *sindrome da impingement* (Charles Neer, 1972), ed è la principale patologia tendinea della spalla di competenza artroscopica.

Etiopatogenesi

Le strutture coinvolte in questa sindrome sono: l'arco acromiale, costituito dalla superficie inferiore dell'acromion, dal legamento coracoacromiale e dall'apice della apofisi coracoidea; la cuffia dei rotatori, costituita dai tendini dei muscoli sottoscapolare, capo lungo del bicipite, sovraspinoso, sottospinoso e piccolo rotondo; la borsa sierosa sottoacromiale interposta tra l'arco acromiale e la cuffia dei rotatori (fig. 14).

La sindrome insorge quando lo spazio subacromiale si restringe. Lo spazio si può restringere per l'abbassamento dell'arco acromiale, l'innalzamento della testa omerale o per l'ispessimento della borsa sierosa o della cuffia dei rotatori. Numerose sono le condizioni congenite od acquisite, traumatiche o degenerative che possono portare o contribuire ad uno dei quattro meccanismi patogenetici citati. Tra queste, le più frequenti sono: la forma uncinata del processo acromiale, che abbassa la volta dell'arco, e l'insufficienza dei muscoli della cuffia dei rotatori (sovraspinoso e sottospinoso), che hanno azione di centraggio attivo della testa omerale nella cavità glenoideica quando la spalla viene portata in abduzione. Diminuendo questa azione di centraggio attivo, la testa omerale tende a risalire (fig. 15). L'insufficienza del sovraspinoso e del sottospinoso può dipendere da cause neurologiche (cervicobrachialgie), da ipotrofia da non uso o da lesione della cuffia dei rotatori (in questo caso quindi primaria).

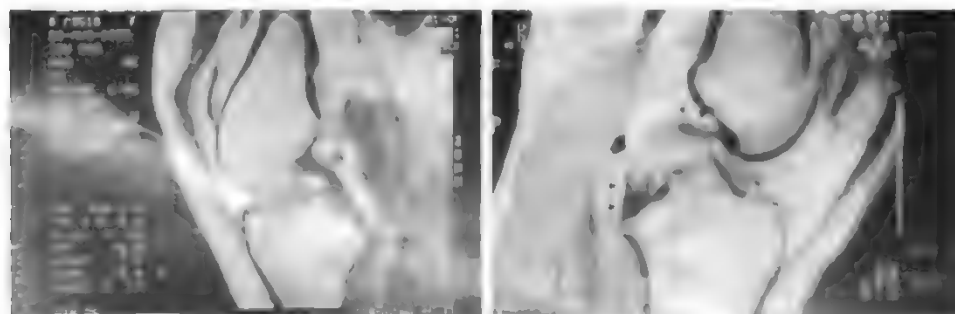


Fig. 13. A sinistra: risonanza magnetica nucleare (RMN) di legamento crociato posteriore integro. A destra: risonanza magnetica nucleare (RMN) di lesione completa del legamento crociato posteriore.



Fig. 14 Spazio sottoacromiale (freccie): 1) apofisi coracoide; 2) legamento coracoacromiale; 3) acromion. In questo spazio, dal davanti al dietro, decorrono i cinque tendini della cuffia dei rotatori: sottoscapolare, capo lungo del bicipite, sovraspinoso, sottospinoso, piccolo rotondo.

Invece, tra le condizioni che possono determinare un ispessimento della cuffia vi è la tendinopatia calcifica del sovraspinoso, caratterizzata dalla deposizione di cristalli di pirofosfato di calcio in corrispondenza della porzione distale di questo tendine. Tale condizione patologica viene spesso impropriamente chiamata periartrite scapoloomerale.

Una volta che lo spazio si è ristretto, quando il braccio, abdotto a 90° , passa dalla posizione di extrarotazione in quella di intrarotazione, si crea un attrito (o conflitto) sottoacromiale che evoca dolore.

Anatomia patologica

La suddivisione della malattia in 3 stadi proposta da Neer nel 1983 può essere ancora oggi ritenuta valida.

I stadio: la borsa sierosa subacromiale è ispessita dall'infiammazione e quindi dall'edema e coesistono microemorragie all'interno di questa. Questo stadio è totalmente reversibile.

II stadio: la borsa è fibrotica, mentre vi è un'iniziale degenerazione tendinea del sovraspinoso (più frequentemente), e/o del sottospinoso e/o del capo lungo del bicipite. Questa degenerazione tendinea (tendinosi) porta ad un ispessimento dei tendini, con il perpetuarsi dei fenomeni di attrito. Questo stadio non è mai totalmente reversibile.

III stadio: è quello delle rotture tendinee parziali o a tutto spessore della cuffia dei rotatori.

Sintomatologia

La malattia si manifesta tipicamente con un dolore avvertito nella regione anterolaterale della spalla. Nello stadio I il dolore insorge nel passaggio della extrarotazione all'intrarotazione, con il braccio abdotto a 90° . Questo movi-

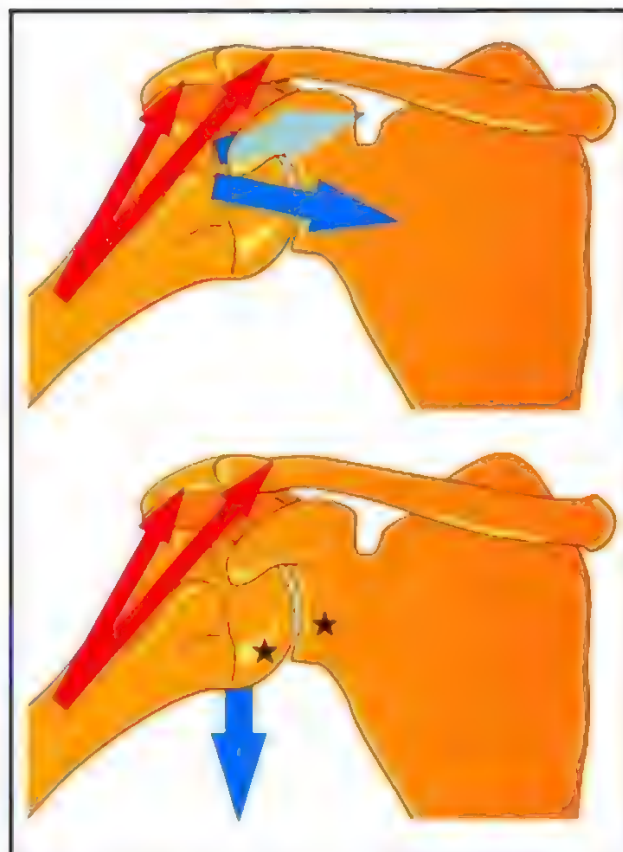


Fig. 15. Centraggio attivo della testa omerale. Durante l'abduzione, la cuffia dei rotatori (freccie azzurre) mantiene la testa al centro della glena. Se la cuffia è ipovalida, l'azione del deltoide (freccie rosse) tende a far risalire la testa omerale determinando una sindrome da attrito sottoacromiale.

mento rappresenta un gesto tecnico di molte discipline sportive, per cui spesso gli sportivi «lanciatori», soprattutto se praticano l'attività da molti anni, vanno incontro ad una sindrome da attrito.

Nello stadio II i dolori insorgono generalmente nelle elevazioni prolungate del braccio e possono irradiarsi lungo la regione laterale del braccio. La sintomatologia scompare con il riposo. Teoricamente lo stadio II affligge più frequentemente soggetti tra i 30 ed i 40 anni di età.

Nello stadio III i dolori sono presenti anche a riposo e spesso sono notturni, impedendo al paziente di dormire sulla spalla malata. È presente inoltre riduzione della forza del muscolo il cui tendine è interessato dal processo degenerativo. Le età più colpite sono quelle oltre i quarantacinque anni.

Diagnosi

La diagnosi si basa sull'anamnesi, sull'esame obiettivo e sulle indagini strumentali. L'anamnesi rivela un dolore anterolaterale di spalla, ad insorgenza subdola, in assenza di trauma, inizialmente evocato da alcuni movimenti (*over-head activities*) e successivamente presente anche a riposo.

L'esame obiettivo rivela una articolarietà passiva pressoché completa. Si valuterà quindi la positività dei segni del conflitto (Neer e Hawkins) (fig. 16) e lo stato dei tendini

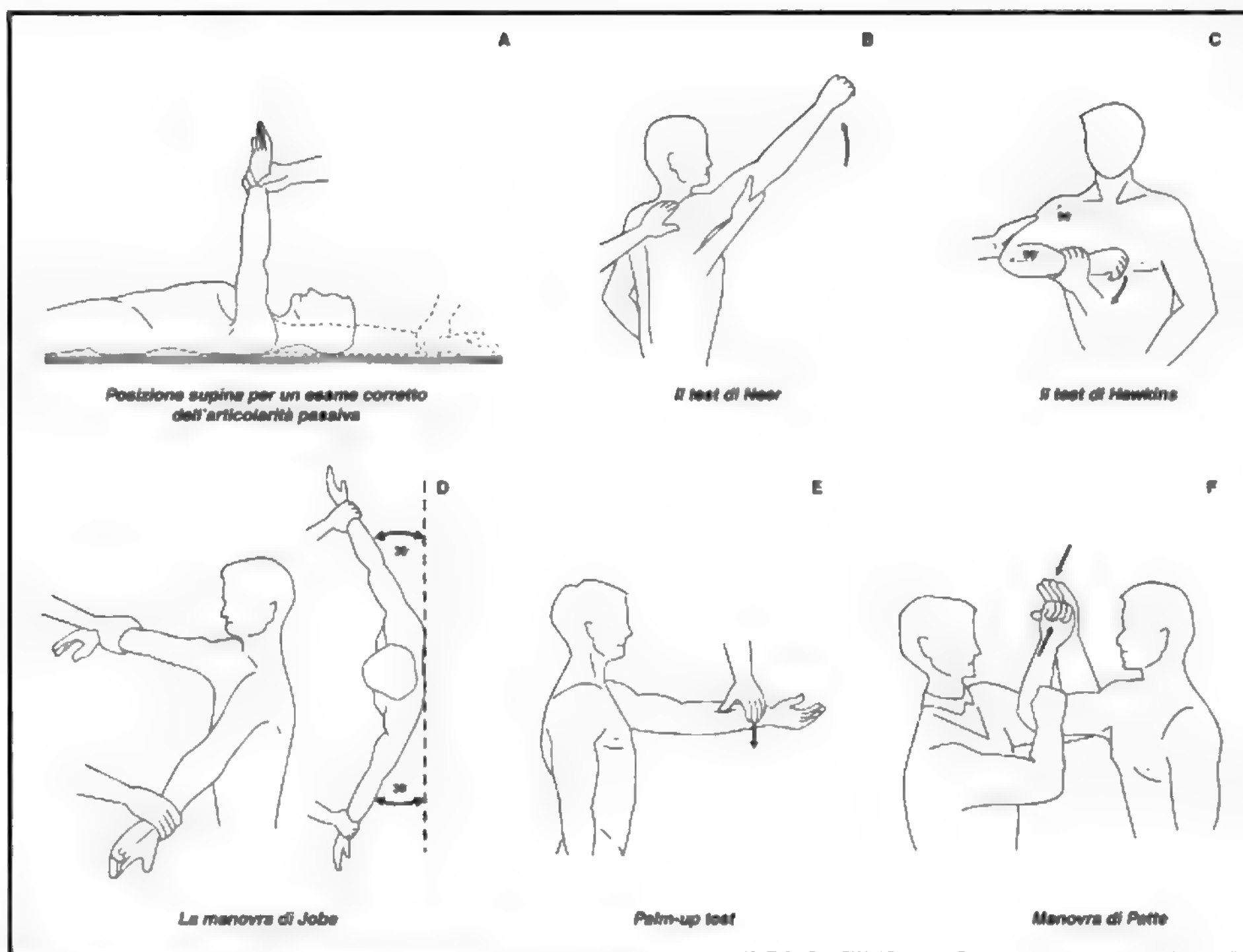


Fig. 16. Esame obiettivo della spalla nella patologia della cuffia dei rotatori.

della cuffia, mediante, rispettivamente, la manovra di Jobe per il sovraspinoso, il *palm-up test* per il capo lungo del bicipite e la manovra di Patte per il sottospinoso.

Le indagini strumentali prevedono un esame radiografico standard in proiezione anteroposteriore ed ascellare ed una proiezione supplementare, la *outlet view*, che meglio evidenzia lo spazio subacromiale e la forma dell'acromion.

L'ecografia è in grado di evidenziare sia l'ampiezza dello spazio sottoacromiale sia l'eventuale presenza di lesione dei tendini della cuffia; inoltre ha il vantaggio di permettere facilmente uno studio dinamico dell'articolazione. Anche la tomografia computerizzata può dare utili indicazioni, ma è la risonanza magnetica che riesce meglio a descrivere il quadro delle lesioni presenti.

La diagnosi differenziale si pone nei confronti di tutte le sindromi dolorose della spalla che insorgono in assenza di conflitto sottoacromiale. Tra queste ricordiamo: le sindromi cervicobrachiali, le tendiniti e le rotture della cuffia, gli stiramenti dei muscoli della cuffia, l'artrosi acromioclavicolare e l'instabilità glenomeroale, quest'ultima frequente negli sportivi lanciatori.

Principi di trattamento

Nelle fasi iniziali della malattia il trattamento di base è sul riposo e sull'assunzione di farmaci antinfiammatori, mentre

nei casi più resistenti, la risoluzione del quadro si dovrebbe avere con l'ausilio di infiltrazioni locali (2/3) nello spazio subacromiale di un corticosteroide, associate alla fisioterapia (laser, ultrasuoni).

La chinesiterapia attiva deve essere rivolta al potenziamento isometrico e successivamente isotonicamente dei muscoli della cuffia, per migliorare il centraggio attivo della testa omerale. Accortezza va usata per evitare esercizi che evocano dolore.

Il fallimento della terapia conservativa fa porre indicazione al trattamento chirurgico, che consiste nell'intervento di decompressione sottoacromiale.

Tale intervento, che può essere eseguito a cielo aperto o con tecnica endoscopica, mira all'ampliamento dello spazio subacromiale mediante asportazione della borsa, del legamento coracoacromiale e del becco dell'acromion.

Bibliografia

- Neer C. S. II, *J. Bone Joint Surg.*, 1972, **54-A**, 41-50.
- Neer C. S. II, *Clin. Orthop.*, 1983, **173**, 70-77.
- Puddu G., Cerullo G., *Traumatologia della spalla nello sport*, Atti della Tavola Rotonda «Traumatologia della spalla nello sport», Roma giugno 1988.

GIANCARLO PUDDU,
MASSIMO CIPOLLA E GUGLIELMO CERULLO

MENOPAUSA [v. vol. IX, coll. 907-918]

TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

SOMMARIO

Introduzione (col. 3637). - **Terapia ormonale sostitutiva e malattie cardiovascolari** (col. 3637). - **Terapia ormonale sostitutiva e osteoporosi** (col. 3638). - **Terapia ormonale sostitutiva e neoplasie** (col. 3639): *Tumore dell'endometrio*. - *Tumore della mammella*. - *Cancro del colon*. - **Terapia ormonale sostitutiva e malattia di Alzheimer** (col. 3640). - **Estrogeni e progestinici per terapia sostitutiva** (col. 3642): *Estrogeni*. - *Progestinici*. - **Regimi terapeutici** (col. 3644). - **Indicazioni e durata del trattamento**. **Controindicazioni** (col. 3646).

Introduzione

Con il termine di terapia ormonale sostitutiva in menopausa [m.] si dovrebbe intendere un ripristino delle condizioni ormonali pre-esistenti all'avvento della m. ottenuto con estrogeni e progestinici naturali capaci di produrre livelli ormonali circolanti equivalenti a quelli esistenti durante il periodo fertile.

In realtà con la terapia ormonale sostitutiva non si riproducono le modificazioni ormonali così come si verificano durante un ciclo normale ma si cerca di ottenere livelli di estrogeni circolanti sufficienti a minimizzare le conseguenze legate all'ipoestrogenemia conseguente alla m.

Gli obiettivi terapeutici, allo stato dell'arte, sono quelli di ridurre i disturbi vasomotori ed ogni conseguenza a *breve termine* della cessata funzione ovarica, di prevenire le conseguenze a *medio termine*, come le turbe del trofismo urogenitale, e quelle a *lungo termine*: l'osteoporosi e le malattie cardiovascolari.

Gli estrogeni si sono rivelati capaci di perseguire tutti questi obiettivi.

A fronte dell'aumentata aspettativa di vita, che per la donna è di circa 80 anni, e dei cambiamenti all'interno della nostra società emerge sempre più la necessità di una diversa cultura medica: non più orientata solo a individuare la malattia, per poi curarla, ma a prevenirla o posticiparla per comprimere la *morbilità* ad un periodo il più breve possibile e il più vicino possibile alla morte, affinché ad una maggiore longevità si associ anche una migliore qualità della vita. In quest'ottica vanno conosciute le patologie che una donna può sviluppare dopo la m., i loro fattori di rischio, e tutte le misure utili, fra cui la terapia ormonale sostitutiva, a ridurre la loro incidenza o i loro effetti negativi.

Le malattie cardiovascolari rimangono la causa principale di morte prematura e disabilità nelle donne occidentali. Dai dati della letteratura, infatti, una donna di 50 anni ha, nel corso della sua vita futura, una probabilità del 46% di sviluppare una coronaropatia e del 31% di morire; ha inoltre una probabilità del 20% di essere colpita da un *ictus* cerebrale e dell'8% di morire.

Le fratture osteoporotiche possono deteriorare notevolmente la qualità della vita a seconda del grado di riduzione d'autonomia che ne conseguirà. La probabilità di incorrere in una frattura di femore è del 15% e quella di morire è dell'1,5%; quella di subire una frattura vertebrale è del 25%.

Riferendosi sempre ad una donna di 50 anni, in postmenopausa, questa ha il 10% di probabilità di sviluppare un carcinoma della mammella e il 3% di morire; il 3% di probabilità di sviluppare un carcinoma dell'endometrio e lo 0,3% di morire.

Terapia ormonale sostitutiva e malattie cardiovascolari

Gli estrogeni proteggono nei confronti delle malattie cardiovascolari, riducendone il rischio di circa il 50%, attra-

verso molteplici azioni. Da anni è dimostrato che essi aumentano i livelli plasmatici di colesterolo HDL e diminuiscono quelli di colesterolo LDL, modificando così il profilo lipidico in senso antiaterogeno. A tali modificazioni dei lipidi, e soprattutto all'aumento dell'HDL, oggi si attribuisce circa il 30% dell'effetto cardioprotettivo degli estrogeni, essendo stati riconosciuti altri loro effetti dovuti all'azione diretta sulla parete vascolare. Le cellule muscolari lisce ed endoteliali dei vasi sono fornite infatti di recettori per il 17- β -estradiolo e per il progesterone. Gli estrogeni inibiscono molti processi coinvolti nello sviluppo della placca aterosclerotica indipendenti dall'assetto lipidico. Essi riducono l'accumulo di LDL e la penetrazione nelle pareti vasali di esteri del colesterolo; inibiscono l'aggregazione piastrinica; riducono la proliferazione delle cellule muscolari lisce indotta dalle lipoproteine; inibiscono la proliferazione miointimale indotta da danni meccanici o da sollecitazioni di parete; diminuiscono la produzione di collagene ed elastina; aumentano la produzione di prostaciclina ed inibiscono la formazione di «cellule schiumose». Gli estrogeni aumentano il flusso sanguigno diminuendo le resistenze vascolari, giacché agiscono come vasodilatatori. Promuovono la liberazione da parte delle cellule endoteliali del *fattore rilasciante la muscolatura della parete vasale*, identificato nell'ossido nitrico (NO), che contrasta a sua volta l'effetto costrittore dell'*endotelina* (v. MONOSSIDO DI AZOTO**; ENDOTELIO**; VASCOLARI VASOATTIVI FATTORI [v.*; v.**]). La terapia sostitutiva è efficace, inoltre, nel restaurare la stabilità vasomotoria controllando il rilascio di catecolamine. Un altro meccanismo attraverso il quale gli estrogeni causano vasodilatazione è dovuto alla loro proprietà di calcio-antagonisti naturali. Viene, inoltre, ad essi riconosciuto un effetto inotropo positivo sul miocardio.

Molte di queste azioni concorrono nella prevenzione della trombosi. Altri effetti ascrivibili agli estrogeni sono la riduzione dell'insulino-resistenza e la prevenzione del deposito di tessuto adiposo a livello addominale.

In contrasto con quanto ritenuto per molto tempo, sulla base di tutte queste acquisizioni e delle osservazioni epidemiologiche, la terapia ormonale sostitutiva non è controindicata in donne con fattori di rischio per malattia cardiovascolare come il diabete, l'ipertensione e il pregresso infarto. In particolare alla terapia estrogenica sostitutiva viene riconosciuto un ruolo protettivo maggiore nella prevenzione secondaria rispetto a quella primaria. Infatti, in pazienti coronaropatiche in terapia con estrogeni è stata osservata una riduzione del rischio di nuovi episodi dell'80% rispetto alle pazienti non trattate. Per quanto riguarda la riduzione del rischio di *ictus* cerebrale i dati non sono unanimi.

I progestinici hanno effetti opposti agli estrogeni sia sul profilo lipidico che sui vasi. D'altra parte, l'aggiunta del progestinico è necessaria nelle pazienti con utero per proteggerle dall'iperplasia e dal carcinoma dell'endometrio. Infatti, il rischio per queste patologie aumenta in relazione alla dose e alla durata dell'assunzione degli estrogeni e viene annullato dall'aggiunta appropriata, in termini di dose e durata, del progestinico. Sebbene ancora non sia noto di quanto i progestinici diminuiscano l'effetto protettivo degli estrogeni sul sistema cardiovascolare, tale effetto rimane significativo anche quando la terapia ormonale sostitutiva necessita dell'aggiunta del progestinico agli estrogeni.

Terapia ormonale sostitutiva e osteoporosi

La donna ha un rischio di frattura più elevato di quello dell'uomo per il concorso di diversi fattori che la fanno arrivare in età avanzata con una minore massa ossea (v. OSTEOPOROSI [v.; v.*; v.**]; MINERALOMETRIA OSSEA*; OSSO*).

La donna infatti raggiunge, attorno ai 30-35 anni, un picco di massa ossea mediamente più basso di quello dell'uomo, quindi entrambi iniziano la perdita di massa ossea, che proseguirà nel corso di tutta la vita, ma con un andamento diverso. Infatti, nella donna questa perdita è accelerata negli anni immediatamente dopo la m. La m. induce un aumento del *rimodellamento osseo* (v.***) associato ad uno squilibrio tra processo di *riassorbimento* (da parte degli osteoclasti) e di *neoformazione* (da parte degli osteoblasti), a favore del processo di riassorbimento. Ne consegue un'accelerata perdita ossea che raggiunge l'acme da 1 a 3 anni dopo l'insorgenza della m. e che è seguita da un progressivo rallentamento nel decennio successivo. Queste modificazioni sono dovute alla carenza estrogenica e sono contrastabili dalla terapia ormonale sostitutiva come dimostrato dalla riduzione dei *marker* di aumentato *turnover* osseo (ad es.: rapporti calcio/creatinina e idrossiprolina/creatinina urinari [v. RIMODELLAMENTO OSSEO***, *marker del turnover osseo*]). Gli estrogeni sono, come la calcitonina, l'ipriflavone e i bifosfonati, *inibitori del riassorbimento osseo*, quindi inibiscono principalmente l'attività degli osteoclasti. È evidente che è difficile ripristinare il patrimonio osseo perduto, ma per la capacità di prevenire la perdita ulteriore di massa ossea gli estrogeni possono essere impiegati oltre che nell'immediata postmenopausa anche in età più avanzata. Recettori per il 17- β -estradiolo sono stati trovati anche sugli osteoblasti. I meccanismi d'azione, con i quali gli estrogeni esplicano l'efficacia preventiva e terapeutica nei confronti dell'osteoporosi, sono molteplici e non ancora tutti conosciuti. Essi riducono la sensibilità degli osteoclasti al paratormone e sopprimono la differenziazione degli stessi dai loro precursori a livello del midollo osseo con conseguente inibizione dei processi di riassorbimento. Stimolano indirettamente la secrezione di calcitonina. Stimolano anche la proliferazione degli osteoblasti, probabilmente mediata dalla produzione di fattori di crescita (v.*; v.***) come l'IGF-1 (*Insulin-like Growth factor 1*) e il TGF- β (*Transforming Growth factor β*). Favoriscono, inoltre, il riassorbimento tubulare renale di calcio.

La letteratura è ormai concorde nel riconoscere una riduzione del rischio di frattura del 25% per il femore e del 50% per le vertebre a seguito del trattamento con estrogeni.

L'aggiunta del progestinico, obbligatoria nelle donne con utero, non diminuisce l'effetto protettivo degli estrogeni nei confronti dell'osso.

Terapia ormonale sostitutiva e neoplasie

Tumore dell'endometrio

È ormai un dato incontrovertibile che la terapia ormonale sostitutiva con soli estrogeni aumenta il rischio di tumore dell'endometrio. Fino alla fine degli anni '70, quando è stato evidenziato tale effetto, infatti non si associava il progestinico agli estrogeni. È stato ben documentato che l'aumento del rischio è dose- e durata-dipendente e permane anche dopo l'interruzione della terapia estrogenica, per circa 5 anni. È stato calcolato che il rischio di sviluppare un cancro dell'endometrio dopo almeno 8 anni di terapia aumenta di circa 8 volte, mentre il rischio di morire di circa 3 volte, poiché il tipo di tumore che si sviluppa è poco aggressivo e ben differenziato tale da permettere, nella maggior parte dei casi, dopo la diagnosi un trattamento chirurgico risolutivo. *Comunque l'aggiunta del progestinico, in dose e soprattutto durata appropriate (almeno 10-12 giorni per ciclo) agli estrogeni annulla totalmente l'aumento del rischio di cancro dell'endometrio.* Per questo motivo oggi la terapia estrogenica

sostitutiva (cioè con soli estrogeni) viene riservata alle pazienti isterectomizzate, mentre nelle pazienti con utero si effettua una terapia estrogenica progestinica sostitutiva. Anche le donne precedentemente operate per tumore dell'endometrio allo stadio I e II possono assumere estrogeni per terapia sostitutiva. Non vi è consenso nei confronti di pazienti operate per cancro dell'endometrio agli stadii III e IV.

Tumore della mammella

Per il tumore della mammella viene riconosciuto un modesto aumento del rischio per terapie con estrogeni superiori ai 5 anni. Numerosi studi epidemiologici e di metanalisi sono stati pubblicati al riguardo. La maggior parte degli AA. concorda nel riconoscere un aumento del rischio di sviluppare un tumore della mammella pari al 30% dopo 10-15 anni di terapia. Colditz *et al.* (1995) hanno recentemente pubblicato uno studio nel quale hanno trovato un rischio aumentato di circa il 40% dopo 5 anni di terapia e, in particolare, il rischio è risultato maggiore per le donne dopo i 60 anni. Al momento non vi sono dati conclusivi riguardo all'entità dell'aumento del rischio in relazione alla dose e tipo di estrogeno e alla durata di assunzione. Un aumento del rischio c'è, e di questo va tenuto conto, soprattutto nelle pazienti che risultino a rischio aumentato già all'anamnesi. A differenza di quanto osservato per il tumore dell'endometrio, l'aggiunta del progestinico non modifica in senso protettivo il rischio per il tumore della mammella. Dopo circa 5 anni dal termine della terapia con estrogeni (da soli o con un progestinico) il rischio di sviluppare un cancro della mammella torna uguale a quello naturale.

Cancro del colon

Un ampio studio prospettico, il *Cancer Prevention Study II*, negli USA, ha dimostrato una sostanziale riduzione del rischio di cancro del colon tra le donne che avevano utilizzato terapia ormonale sostitutiva. Risultati simili sono stati pubblicati dal gruppo di La Vecchia (Fernandez *et al.*, 1997) che, in uno studio caso-controllo condotto nel nord Italia, ha riscontrato un rischio relativo (RR) per cancro coloretale di 0,40 tra le donne che avevano assunto terapia ormonale sostitutiva rispetto a quelle che non ne avevano fatto uso. In entrambi gli studi l'effetto protettivo è risultato correlato positivamente con la durata dell'assunzione. Grodstein *et al.* (1997) hanno trovato una riduzione della mortalità generale tra le utilizzatrici di terapia ormonale sostitutiva pari al 37%, dovuta principalmente alla riduzione di malattia coronarica ma, sebbene in minor misura, anche a quella di alcuni tumori.

Per il cancro coloretale hanno osservato una riduzione dell'incidenza del 35% (RR = 0,65) e della mortalità del 54% (RR = 0,46). A fronte di tali risultati sono evidenti le implicazioni favorevoli che si potrebbero avere nel bilancio rischio-beneficio della terapia ormonale sostitutiva.

Terapia ormonale sostitutiva e malattia di Alzheimer

Malgrado i risultati negativi di studi precedenti, le più recenti indagini hanno evidenziato una ridotta incidenza e una più tardiva comparsa della malattia di Alzheimer nelle donne sottoposte a terapia ormonale sostitutiva (Paganini-Hill e Henderson, 1994; Tang *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998). Mentre restano da chiarire i meccanismi di questa azione protettiva, si ritengono necessari studi prospettici che definiscano le dosi e la durata della terapia ormonale capaci di istituire questa protezione.

TAB. I. ESTROGENI DISPONIBILI IN ITALIA

Principio attivo e nome commerciale (Ditta)	Via di sommi- nistrato	Dosaggio	n. cp/ cerotti/fiale
17-Beta-Estradiolo			
ESTRADERM (Novartis)	transdermica*	25 mcg	6 cerotti
ESTRADERM (Novartis)	transdermica*	50 mcg	6 cerotti
ESTRADERM (Novartis)	transdermica*	100 mcg	6 cerotti
ESTRADERM MX (Novartis)	transdermica†	25 mcg	8 cerotti
ESTRADERM MX (Novartis)	transdermica†	50 mcg	8 cerotti
ESTRADERM MX (Novartis)	transdermica†	100 mcg	8 cerotti
ESTROCLIM (Sigmata)	transdermica*	25 mcg	6 cerotti
ESTROCLIM (Sigmata)	transdermica*	50 mcg	6 cerotti
ESTROCLIM (Sigmata)	transdermica*	100 mcg	6 cerotti
DERMESTRIL (Rottapharm)	transdermica†	25 mcg	8 cerotti
DERMESTRIL (Rottapharm)	transdermica†	50 mcg	8 cerotti
DERMESTRIL (Rottapharm)	transdermica†	100 mcg	8 cerotti
EPIESTROL (Roerig-Pfizer)	transdermica†	25 mcg	8 cerotti
EPIESTROL (Roerig-Pfizer)	transdermica†	50 mcg	8 cerotti
EPIESTROL (Roerig-Pfizer)	transdermica†	100 mcg	8 cerotti
FEMSEVEN (Bracco)	transdermica†	50 mcg	4 cerotti
MENOREST (Rhone-Poulenc- Rorer)	transdermica†	37,5 mcg	8 cerotti
MENOREST (Rhone-Poulenc- Rorer)	transdermica†	50 mcg	8 cerotti
MENOREST (Rhone-Poulenc- Rorer)	transdermica†	75 mcg	8 cerotti
MENOREST (Rhone-Poulenc- Rorer)	transdermica†	100 mcg	8 cerotti
SYSTEM (Jansen-Cilag)	transdermica†	50 mcg	6 cerotti
CLIMARA (Schering)	transdermica†	50 mcg	4 cerotti*
CLIMARA (Schering)	transdermica†	100 mcg	4 cerotti*
ARMONIL (Recordati)	transdermica†	25 mcg	8 cerotti
ARMONIL (Recordati)	transdermica†	50 mcg	8 cerotti
OESTROGEL (Lab. GolazSA)	percutanea	1,5 mg/2,5 g	30 appl.**
SANDRENA (Organon)	percutanea	1 mg	28 bustine
VAGIFEM (Novo Nordisk)	vaginale	25 mcg	15 cp.
Estrogeni Coniugati equini			
PREMARIN (Wyeth)	orale	0,30 mg	36 cp.
PREMARIN (Wyeth)	orale	0,625 mg	36 cp.
PREMARIN (Wyeth)	orale	1,25 mg	20 cp.
PREMARIN (Wyeth)	orale	2,5 mg	20 cp.
PREMARIN (Wyeth)	vaginale	2,5 mg/4 g	6 appl.
Estradiolo valerato			
PROGYNOVA (Schering)	orale	2 mg	20 cp.
PROGYNON (Schering)	i.m.	10 mg	3 f.
Estriolo			
OVESTIN (Organon)	orale	1 mg	20 cp.
COLPOGYN (Angelini)	vaginale	0,5 mg/4 g	6 appl.
COLPOGYN (Angelini)	vaginale	1 mg	20 ovuli
Promestriene			
COLPOTROPHINE (Sche- ring)	vaginale	10 mg	15 capsule vag.
COLPOTROPHINE (Sche- ring)	vaginale	40 mg/4 g	6 appl.
Estradiolo (Benzato)			
ESTRADIOLO AMSA (AM- SA)	i.m.	5 mg	3 f.

* Sistema transdermico a serbatoio. † Sistema transdermico a matrice.

* Il sistema transdermico dura sette giorni.

** Disponibile in Vaticano dietro presentazione di ricetta medica.

Estrogeni e progestinici per terapia sostitutiva

Estrogeni

La tab. I mostra gli estrogeni per terapia sostitutiva disponibili oggi in Italia.

Gli estrogeni vengono distinti in *naturali* e *sintetici*, in base alla composizione chimica (tutti i tipi di estrogeni vengono in realtà ottenuti a livello industriale per sintesi), e in *orali* e *parenterali* (sistemi transdermici, gel percutaneo, fiale i.m., impianti sottocute, preparazioni per via nasale) in base alla via di somministrazione.

Come estrogeni *naturali* vengono indicati: a) quelli *coniugati equini*, che sono una miscela di estrone solfato (45%), equilina solfato (25%) e 17- α -dihidroequilina (15%), così chiamati perché trovati per la prima volta *in natura* nelle urine di giumente gravide, con la caratteristica di essere attivi per via orale nelle donne, e b) quelli uguali agli estrogeni endogeni umani cioè il 17- β -estradiolo (E2), come tale disponibile in gel o in sistemi transdermici e in forma coniugata come estradiolo valerato disponibile per via orale (l'E2 è disponibile anche come emidrato e micronizzato), l'*estrone* (E1) e l'*estriolo* (E3).

Vengono definiti estrogeni *sintetici* il *diethylstilbestrol* (non disponibile in Italia) e l'*etinilestradiolo* (EE) che viene utilizzato nei contraccettivi orali (v. ANTICONSENZIONALI FARMACI [v. v.°, v.°, v.°]) e non per la terapia sostitutiva in m. Esistono ancora il *mestranolo* e il *quinestrol* che nell'organismo agiscono come l'EE.

È importante sottolineare le differenze tra gli estrogeni che si utilizzano in m., detti appunto *naturali*, e i sintetici come l'*etinilestradiolo* utilizzato per la contraccezione. Per la presenza del gruppo etinico, che ne aumenta la biodisponibilità, il dosaggio minimo richiesto per l'effetto terapeutico in m. dell'EE (ad es.: 10 μ g per normalizzare il rapporto calcio/creatinina) è già superiore al dosaggio che comporta una marcata modificazione della sintesi di proteine epatiche. Per la diversa farmacocinetica tali effetti non si verificano con gli estrogeni coniugati equini, con l'*estrone* solfato e con l'*estradiolo* (come tale o valerato o ancora micronizzato). Il rischio di episodi trombotici da estrogeni di tipo dose-dipendente, emerso dall'uso dei contraccettivi orali, è uno dei fattori che ha condizionato l'uso della terapia estrogenica in m. In realtà tale condizionamento non ha ragione d'essere poiché la dose utilizzata oggi di EE nei contraccettivi orali è di 30 μ g/die, equivalenti, in termini di potenza biologica, a circa 3,75 mg di estrogeni coniugati, cioè 6 volte la dose impiegata usualmente in terapia sostitutiva.

Per via *orale* abbiamo: gli estrogeni coniugati naturali equini, che sono quelli maggiormente e da più tempo utilizzati, soprattutto negli U.S.A., e sui quali si è raccolta la più lunga e corposa esperienza (sugli effetti preventivi, terapeutici e collaterali); l'*estradiolo valerato*, utilizzato soprattutto in Europa; e l'*estradiolo* micronizzato, di più recente introduzione ma non ancora disponibile in Italia.

Tutti i composti per via orale comportano un rapporto tra E1 ed E2 circolanti maggiore dell'unità, poiché anche laddove si somministrano estradiolo questo viene metabolizzato dalla mucosa intestinale e dal fegato, durante il primo passaggio epatico, nel meno attivo estrone. Tra gli effetti epato-mediati ve ne sono alcuni significativamente favorevoli sul piano clinico (marcato aumento dell'HDL, diminuzione dell'LDL e del colesterolo totale), altri sfavorevoli sebbene non clinicamente significativi (aumento delle VLDL con relativo aumento dei trigliceridi, aumentata litogenicità della bile, aumento dell'angiotensinogeno che non comporta comunque un aumento della pressione arteriosa, variazione di alcuni fattori della coagulazione che non comportano modificazioni trombotiche). Per evitare, comunque, alcuni di questi effetti (ad es.: aumento dei trigliceridi) sono state ricercate vie di somministrazione alternative a quella orale che peraltro rimane a tutt'oggi sicura ed ampiamente utilizzata.

I preparati *depot* per via *intramuscolare* sono i meno utilizzati per la maggiore maneggevolezza delle altre formulazioni per via orale, transdermica e percutanea. Infatti i livelli estrogenici raggiunti con queste preparazioni *depot* sono incostanti e di conseguenza meno accurato risulta il controllo sui sintomi.

La somministrazione *vaginale* di estriolo e promestriene è efficace a livello locale. Quella di estrogeni coniugati equini, oltre ad essere efficace a livello locale, determina livelli circolanti di estrogeni pari a 1/4 di quelli misurabili dopo somministrazione della stessa dose per via orale. Ma la maturazione dell'epitelio vaginale,

MENOPAUSA

TAB. II. DOSI MINIME EFFICACI PER LA PREVENZIONE E IL TRATTAMENTO DELLA OSTEOPOROSI E PER LA PREVENZIONE DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Estrogeni coniugati equini	0,625 mg/die
Estrone solfato	0,625 mg/die
Estradiolo micronizzato	2 mg/die
Estradiolo valerato	2 mg/die
Estradiolo transdermico	50 µg
Estradiolo percutaneo	1,5-3 mg
Estradiolo impianti	25 mg

indotto da tali farmaci, con il conseguente aumento di spessore, ne condiziona l'assorbimento riducendolo nel tempo, cosicché anche gli estrogeni coniugati equini vaginali non vengono usualmente utilizzati per ottenere gli effetti sistemici della terapia ormonale sostitutiva.

Le pillole cristalline di estradiolo, da impiantare nel tessuto sottocutaneo, non sono disponibili nel nostro Paese. Rilasciano estradiolo per 24 settimane: i livelli circolanti che si osservano nelle prime 24 ore sono elevati e si stabilizzano dopo la 1ª settimana.

L'estradiolo in gel alcolico da applicare sulla cute (via percutanea) è disponibile nel nostro Paese presso lo stato Città del Vaticano. Con esso vengono evitati gli effetti legati al primo passaggio epatico come con i sistemi transdermici, ma non è ugualmente garantita la stabilità delle concentrazioni plasmatiche ottenibili, che dipende sia dall'accuratezza nell'applicazione che dalla traspirazione cutanea.

La via nasale è ancora oggetto di sperimentazione scientifica.

L'estradiolo per via transdermica è la formulazione che sta guadagnando i maggiori consensi nel nostro Paese. Malgrado modificati, in senso antiaterogeno, il profilo lipidico in misura minore delle formulazioni orali, e ancora non vi siano studi di durata sufficientemente lunga per dimostrare la riduzione della mortalità dovuta alle fratture osteoporotiche e alle malattie cardiovascolari, numerose evidenze scientifiche permettono di attribuire all'estradiolo per via transdermica efficacia analoga a quella, ampiamente documentata, degli estrogeni orali sia nella prevenzione dell'osteoporosi che delle malattie cardiovascolari.

La dose minima efficace per la prevenzione e il trattamento dell'osteoporosi e per ridurre il rischio cardiovascolare è di 0,625 mg/die di estrogeni equini coniugati. Questo dosaggio è generalmente valido anche per ottenere il controllo dei classici sintomi del climaterio. La tab. II riporta il dosaggio corrispondente degli altri estrogeni principalmente utilizzati per la terapia sostitutiva in Italia e all'estero.

Progestinici

L'unico progestinico naturale è il *progesterone* disponibile in Italia dal 1994 solo in crema per somministrazione vaginale, gli altri sono tutti *sintetici* e si distinguono in derivati del progesterone e del testosterone.

Sono derivati del progesterone: il *medrossiprogesterone acetato*, il *didrogestone* e il *medrogestone* dotati di scarsa attività androgenica e tutti disponibili per via orale.

Tra i derivati del 19-nortestosterone sono disponibili per terapia ormonale sostitutiva il *noretisterone acetato*, sia per via orale che per via transdermica, e il *nomegestrolo acetato* orale. Il *levonorgestrel* si trova in associazione con l'estradiolo per via orale. I meno androgenici *desogestrel* e *gestodene* sono disponibili solo come contraccettivi orali in associazione all'E.E.

Farmacocinetica dei progestinici e sulla loro bioequivalenza si conosce ancora poco, proprio per la loro varietà e per quella dei metaboliti. Essi, tutti derivano. Gli estrogeni hanno un'alta affinità per i propri recettori mentre molti progestinici sintetici si legano a recettori per glucocorticoidi, androgeni e mineralocorticoidi con un ampio e diverso spettro d'azione. Il progestinico, obbligatorio nelle pazienti con utero in terapia estrogenica per proteggere l'endometrio, riduce gli effetti vantaggiosi sui sistemi

TAB. III. PROGESTINICI DISPONIBILI IN ITALIA (*)

Principio attivo e nome commerciale (Ditta)	Via di somministrazione	Dose/die	N. cp./applicazioni
Progesterone			
ESOLUT (Angelini)	vaginale	1 appl. = 100 mg	6 applicazioni
Didrogestone			
DUFASTON (Solvay Pharma)	orale	10 mg	10 cp.
Medrogestone			
COLPRONE (Wyeth)	orale	5 mg	20 cp.
Medrossiprogesterone acetato			
FARLUTAL (Farmitalia)	orale	10 mg	12 cp.
FARLUTAL (Farmitalia)	orale	20 mg	10 cp.
LUTORAL (Midy)	orale	20 mg	12 cp.
PROVERA G (Upjohn)	orale	5 mg	12 cp.
PROVERA G (Upjohn)	orale	10 mg	12 cp.
Nomegestrolo acetato			
LUTENYL (Schering)	orale	5 mg	30 cp.
Noretisterone (**)			
PRIMOLUT NOR (Schering)	orale	10 mg	30 cp.

(*) In ordine crescente di potenza epatoecellulare dovuta all'androgenicità residua.

(**) Noretisterone acetato transdermico disponibile solo in associazione con 17-β-estradiolo.

cardiovascolare indotti dall'estrogeno, a causa degli effetti opposti prodotti sulle lipoproteine. Gli estrogeni aumentano le HDL e diminuiscono le LDL; i progestinici riducono le prime e innalzano le seconde in misura proporzionale alla loro maggiore androgenicità residua. D'altra parte, sempre in direzione opposta a quanto si verifica con gli estrogeni, i progestinici riducono le VLDL e conseguentemente i trigliceridi. Come per gli estrogeni, a causa del primo passaggio epatico, tali effetti sono maggiori per le formulazioni orali rispetto a quelle parenterali.

I progestinici più utilizzati sono stati finora il *medrossiprogesterone acetato* negli U.S.A. e il *noretisterone acetato* (NETA) in Europa. Il *progesterone* micronizzato per via orale, di più recente introduzione ancora non disponibile in Italia, praticamente non interferisce con gli effetti positivi degli estrogeni sulle lipoproteine; i vantaggi prevedibili con le formulazioni parenterali, transdermica e vaginale, devono essere confermati, essendo al momento il loro uso troppo recente e ridotto. Ulteriori dati sono necessari per comprendere gli effetti vascolari diretti dei progestinici. Rimane, inoltre, controverso il loro ruolo nei confronti del tumore al seno: secondo alcuni Autori il rischio rimane immutato, secondo altri viene aumentato.

Il progestinico va somministrato solo alle pazienti con utero. Nella scelta ci si deve orientare per i meno androgenici al dosaggio minimo capace di proteggere l'endometrio. Il dosaggio e la durata del trattamento progestinico varieranno però a seconda del regime di terapia sostitutiva scelto, di cui si riferisce più avanti.

La tab. III mostra i progestinici disponibili in Italia e la tab. IV mostra i preparati con estrogeni e progestinici associati per terapia sostitutiva.

V. anche: ESTROGENE SOSTANZE, VI, 347; *2949; PROGESTERONE E PROGESTINICI; SESSUALI ORMONI.

Regimi terapeutici

I soli estrogeni vanno riservati alle pazienti isterectomizzate e possono essere dati in maniera continuata (tutti i giorni) o ciclica (21 o 25 giorni al mese). Alle pazienti con utero gli

TAB. IV. ESTROGENI PIÙ PROGESTINICI IN ASSOCIAZIONE DISPONIBILI IN ITALIA

Principio attivo e nome commerciale (Ditta)	Dosaggio	N. cp/cerotti	Schema
Per via orale			
Estrogeni coniugati (EC) + Medrogestone (M)			
PREMPAK (Wyeth)	0,625 mg EC + 5 mg M	28 cp + 12 cp	Seq/cont
PREMPAK (Wyeth)	1,25 mg EC + 5 mg M	28 cp + 12 cp	Seq/cont
Estrogeni coniugati (EC) + Medrossiprogesterone (MAP)			
PREMELLE S (Wyeth)	0,625 mg EC + 0,625 mg EC + 5 mg MAP	14 cp + 14 cp	Seq/cont
PREMELLE C (Wyeth)	0,625 mg EC + 5 mg MAP	28 cp	Comb/cont
PREMELLE C (Wyeth)	0,625 mg EC + 2,5 mg MAP	28 cp	Comb/cont
Estradiolo emulsionato (E2) + NETA			
TRISEQUENS (Novo Nordisk)	2 mg E2 + 2 mg E2 + 1 mg NETA + 1 mg E2	12 cp + 10 cp + 6 cp	Seq/cont
TRISEQUENS FORTE	4 mg E2 + 4 mg E2 + 1 mg NETA + 1 mg E2	12 cp + 10 cp + 6 cp	Seq/cont
KLIOGEST (Novo Nordisk)	2 mg E2 + 1 mg NETA	28 cp	Comb/cont
Estradiolo valerato (E2) + Ciproterone acetato (CA)			
CLIMEN (Schering)	2 mg E2 + 2 mg E2 + 1 mg CA	11 cp + 10 cp	Seq/ciclica
Estradiolo valerato (E2) + Levonorgestrel (L)			
NUVELLE (Farmades)	2 mg E2 + 2 mg E2 + 0,075 mg L	14 cp + 14 cp	Seq/cont
Estradiolo valerato (E2) + Medrossiprogesterone acetato (MAP)			
FILENA (Organon)	2 mg E2 + 2 mg E2 + 10 mg MAP	10 cp + 11 cp	Seq/ciclica
Estradiolo micronizzato (E2) + Diidrogesterone (D)			
FEMOSTON (Solvay Pharma)	2 mg E2 + 2 mg E2 + 10 mg D	14 cp + 14 cp	Seq/cont
Per via transdermica			
17 Beta Estradiolo (E2) + NETA			
ESTRACOMB (Ciba-Geigy)	50 mcg E2 + 50 mcg E2 + 0,25 mg NETA	4 (A) + 4 (B)	Seq/cont

Seq/cont = sequenziale continua (28 gg./28. prima solo estrogeno e poi estrogeno più progestinico)
 Seq/ciclica = sequenziale ciclica (21 gg./28. prima solo estrogeno e poi estrogeno + progestinico con 7 gg. di intervallo)
 Comb/cont = combinata continua (28 gg./28. assunzione tutti i giorni di estrogeno + progestinico)

estrogeni andranno somministrati assieme ai progestinici con diverse modalità che possiamo così schematizzare.

1) Estro-progestinici entrambi ciclici:

Estrogeni dal giorno 1 al giorno 21 (1 settimana di pausa)
Progestinici dal giorno 12 al giorno 21.

2) Estro-progestinici, i primi continuati, i secondi ciclici:
Estrogeni dal giorno 1 al giorno 31 (nessuna pausa)
Progestinici dal giorno 1 al giorno 12.

3) Estro-progestinici entrambi continuati con progestinici a basso dosaggio:

Estrogeni dal giorno 1 al giorno 31 (nessuna pausa)
Progestinici dal giorno 1 al giorno 31 (nessuna pausa).

La somministrazione in modo ciclico (per 21 o 25 giorni al mese) degli estrogeni ricorda quella dei contraccettivi orali. Il razionale di tale schema terapeutico risiedeva nell'evitare per alcuni giorni di esporre l'endometrio agli estrogeni. In realtà non è tale pausa che protegge da un aumento del rischio di cancro dell'endometrio, ma l'aggiunta del progestinico, per cui oggi si preferisce la somministrazione continua di estrogeni sia soli, nelle pazienti isterectomizzate, sia quando si debba aggiungere il progestinico, nelle pazienti con utero. Mantenere un clima estrogenico costante evita, infatti, la possibile ricomparsa dei sintomi durante la pausa e assicura il mantenimento del migliore profilo lipidico.

Nelle pazienti con utero, la somministrazione ciclica del progestinico (dal giorno 1 al giorno 12, se gli estrogeni vengono dati in modo continuo [cioè dal giorno 1 al giorno 31], o negli ultimi 12 giorni, se essi vengono dati in modo ciclico [cioè dal giorno 1 al giorno 21]) ricalca il modello fisiologico inducendo, dopo la proliferazione endometriale stimolata dagli estrogeni, la maturazione e successiva desquamazione. La posologia di riferimento è quella corrispondente a 10 mg/die di medrossiprogesterone acetato. Circa l'80% delle pazienti avranno mensilmente una mestruazione. Il ritorno delle mestruazioni per alcune pazienti rappresenta un disagio e un motivo di scarsa accettabilità della terapia.

La somministrazione continua di progestinici a basse dosi (tipo 2,5 mg/die di medrossiprogesterone acetato o 0,35 mg/die di noretisterone acetato) assieme agli estrogeni evita le ricorrenze mestruali poiché induce atrofia endometriale. Lo svantaggio maggiore di tale regime terapeutico consiste nel verificarsi, nei primi 3-6 mesi di trattamento, di uno *spotting* nella metà delle pazienti, che a causa di tale effetto collaterale potrebbero interrompere la terapia prima di poterne verificare i vantaggi.

Indicazioni e durata del trattamento. Controindicazioni

Sulla base delle conoscenze oggi disponibili possiamo concludere che la terapia ormonale sostitutiva per un periodo inferiore ai 5 anni non comporta rischi. Può essere, quindi, senz'altro considerata al fine di minimizzare i sintomi climaterici che mediamente persistono per ca. 3 anni. Ma per ottenere l'effetto preventivo nei confronti degli effetti a lungo termine da carenza estrogenica postmenopausale, cioè nei confronti delle fratture osteoporotiche e delle malattie cardiovascolari, il trattamento deve essere di almeno 7-8 anni. Va, inoltre, considerato che la protezione è maggiore in fase di trattamento e si riduce quando questo viene sospeso. Per questo motivo non vi è ancora accordo su quando sia meglio iniziare il trattamento per prevenire tali patologie, cioè se prima possibile dopo la m. oppure dopo i 65 anni, quando la donna ha più bisogno di proteggersi dalle fratture e dalle malattie cardiovascolari che si verificano principalmente attorno ai 75 anni.

D'altro canto, l'idea di una terapia ormonale sostitutiva che si protragga da dopo la m. per tutta la vita non è consigliabile per quanto è stato riferito sul rischio di tumore al seno.

La terapia andrà offerta: alle pazienti che lamentano i classici sintomi vasomotori e a quelle a rischio per osteo-

MENOPAUSA

TAB. V. CONTROINDICAZIONI ALLA TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

(Dalla I Conferenza Nazionale di Consenso in Scienze Ginecologiche e Ostetriche, Madonna di Campiglio, 17-24 marzo 1996)

Absolute:	Perdita ematica vaginale atipica ancora da studiare Adenocarcinoma endometriale in atto Carcinoma mammario, in atto o dopo intervento per stadio > T1 M0 N0 Flebiti e tromboflebiti acute o recenti Epatiti ed epatopatie acute, croniche e persistenti Esame pelvico con sospetto di patologia annessiale
Relative:	Carcinoma mammario dopo intervento per stadio < T1 M0 N0 Carcinoma endometriale I stadio dopo chirurgia adeguata Endometriosi intestinale o del setto vagino-rettale, o con residuo dopo terapia Fibromi multipli o fibroma con diametro > 5 cm, anche se asintomatico Ipertensione non studiata ⁽¹⁾ Flebiti gravi pregresse Colelitiasi (anche asintomatica) Tromboembolie pregresse Otosclerosi Ipertrigliceridemia (> 400 mg/dl) limitatamente all'uso di E orali ⁽²⁾

⁽¹⁾ Studi recenti hanno evidenziato un effetto antipertensivo del 17-beta-estradiolo.

⁽²⁾ Per il rischio di pancreatite.

porosi e/o per malattia cardiovascolare. Andrebbe offerta soprattutto alle pazienti coronaropatiche, per il ruolo emergente degli estrogeni nella prevenzione secondaria, e in particolare a quelle isterectomizzate, che avrebbero il vantaggio massimo degli estrogeni non ridotto dall'aggiunta del progestinico. Inoltre, la terapia ormonale sostitutiva non andrebbe negata a chi ne facesse richiesta esplicita, pur non avendo sintomi né rischi particolari.

Nella paziente ad aumentato rischio per tumore della mammella i pericoli della terapia ormonale sostitutiva possono essere maggiori dei suoi benefici.

Il profilo relativo ai rischi di ogni paziente va rivalutato di anno in anno, attraverso la raccolta dei dati delle abitudini di vita (fumo, esercizio fisico, etc.), dell'esame clinico (visita, P.A., peso corporeo, etc.), della lipemia e del controllo endometriale (ecografia transvaginale o isteroscopia) e della mammella (mammografia), potendo così da caso a caso individualizzare il trattamento nel tipo e nella durata.

La tab. V mostra le controindicazioni assolute e relative alla terapia ormonale sostitutiva.

Da questa rapida rassegna si può dedurre che molti sono i farmaci a disposizione del medico e che la scelta per l'uno o per l'altro andrà fatta considerando le caratteristiche clinico-metaboliche della paziente e le sue preferenze, personalizzando la terapia di volta in volta in relazione al dosaggio, alla via di somministrazione e alla durata del trattamento, per ottenere il risultato clinico migliore in termini di rischio-beneficio.

Bibliografia

- Amend D. *et al.*, *Ann. Int. Med.*, 1992, **117**, 1038.
Canadian Menopause Consensus Conference, *J. SOGC*, 1994, **16**, 1.
Colditz G. A., Hankinson S. E., Hunter D. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 1589.
Fernandez E., La Vecchia C., D'Avanzo B. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1997, **350**, 1431.
Grady D., Gebretsadik T., Kerlikowske K. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1995, **85**, 304.

Grady D., Rubin S. M., Petitti D. B. *et al.*, *Ann. Int. Med.*, 1992, **117**, 1016.

Grodstein F., Stampfer M. J., Colditz G. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336**, 1769.

Henderson V. W., *Neurology*, 1997, **48**, 527.

Paganini-Hill A., Henderson W. W., *Am. J. Epidemiol.*, 1994, **140**, 256.

Stanford J. L., Weiss N. S., Voigt I., F. *et al.*, *JAMA*, 1995, **274**, 137.

Tang M., Jacobs D., Stern Y. *et al.*, *Lancet*, 1996, **348**, 429.

Writing Group for the PEPI Trial, *JAMA*, 1995, **273**, 199.

Xu H. *et al.*, *Nature Medicine*, 1998, **4** (4), 447.

STEFANIA RICCI E GIOVAN BATTISTA SERRA

MEROPENEM

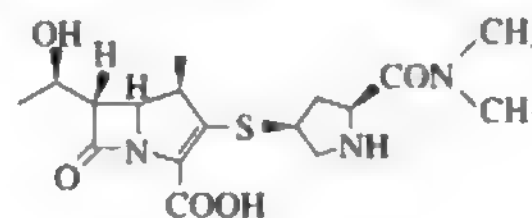
SOMMARIO

Introduzione (col. 3648). - **Meccanismo e spettro d'azione** (col. 3648). - **Farmacocinetica** (col. 3648). - **Indicazioni** (col. 3648). - **Effetti collaterali** (col. 3649). - **Dosaggio e modalità di somministrazione** (col. 3649). - **Vantaggi del meropenem rispetto all'imipenem** (col. 3649).

Introduzione

Il meropenem [m.] (Merrem®) è il secondo degli antibiotici carbapenemici introdotti in terapia; il primo è costituito dall'imipenem, che è un derivato stabile della tienamicina e che viene impiegato in terapia in combinazione con la cilastatina per evitare la sua degradazione a livello renale (v. IMIPENEM-CILASTATINA®).

Il m. si differenzia dall'imipenem per la sua stabilità all'azione della diidropetidasi-I renale: questa peculiarità evita di dover associare al m. la cilastatina che è appunto un inibitore della diidropetidasi-I.



Meropenem

Meccanismo e spettro d'azione

Il m. è un antibiotico ad azione battericida: penetra nella membrana cellulare esterna sia dei gramnegativi che dei grampositivi, legandosi con le PBP (*Penicillin-Binding Proteins*); è meno attivo dell'imipenem verso i grampositivi, ma è più attivo verso i gramnegativi (inclusi le *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*), mentre è simile l'attività verso gli anaerobi.

Farmacocinetica

Il m. è, a differenza dell'imipenem, resistente all'azione degradante della diidropetidasi-I renale.

Somministrato per e.v. ha una emivita di 1 h e si distribuisce ampiamente superando la barriera ematoencefalica. Viene eliminato soprattutto per via renale.

L'emivita varia da più di 1 h a 10 h a seconda se si tratti di pazienti a funzionalità renale normale o compromessa. Viene rimosso dall'emodialisi e deve venire quindi risomministrato dopo ciascuna sessione dialitica.

Indicazioni

È indicato soprattutto nelle infezioni gravi polmonari e intraperitoneali di tipo nosocomiale sostenute da gramnegativi, compresa *Pseudomonas aeruginosa*, e nelle infezioni da flora mista (ad es. anaerobi e aerobi, gramnegativi e grampositivi). Trova utile impiego anche nelle meningiti perché

a differenza dell'imipenem, non provoca convulsioni. Nei bambini con meningite batterica è stata rilevata la guarigione nel 79% dei trattati, risultato analogo a quello riscontrato con cefotassim (Klugman *et al.*, 1995). In adulti affetti da meningite in gran parte dovuta a *H. influenzae*, *S. pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* i risultati sono stati positivi nel 100% dei 23 pazienti trattati, contro il 79% dei 22 pazienti trattati con cefotassim e con ceftriaxone (Schmutzhard *et al.*, 1995). È anche efficace nei pazienti neoplastici con febbre e granulocitopenia (Cometta *et al.*, 1996). L'esperienza clinica, però, con il m. è ancora limitata.

Effetti collaterali

Appare ben tollerato; tra gli effetti collaterali sono riportati: nausea, vomito, diarrea (più frequenti con l'imipenem), talora aumento reversibile delle transaminasi. Non sembra nefrotossico e neurotossico.

Dosaggio e modalità di somministrazione

Il m. viene somministrato per via e.v. con infusione di 20-30 min o anche per bolo e.v. rapido. La dose varia da 500 a 2000 mg ogni 6-8 h. La dose pediatrica è di 10-20 mg/kg ogni 6-8 h.

Vantaggi del meropenem rispetto all'imipenem

I vantaggi potenziali, che dovranno venir confermati con più ampia sperimentazione clinica, sono i seguenti:

- a) non è necessaria la combinazione con la cilastatina;
- b) *in vitro* è più attivo verso i gramnegativi; di contro l'imipenem è più attivo nei confronti di stafilococchi e streptococchi;
- c) è privo di neurotossicità (al contrario dell'imipenem) e quindi può venire impegnato nelle meningiti e nei pazienti con patologia neurologica (è meno epilettogeno);
- d) presenta minori effetti collaterali a carico dell'apparato gastrointestinale;
- e) in quanto meglio tollerato, il m. può essere somministrato per via e.v. più rapidamente.

Bibliografia

- AA. VV., *J. Antimicrob. Chemother.*, 1989, 24 (Suppl. A), 1-311.
 Chambers H. F., Neu H. C., *Other β -lactam antibiotics*, in Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. eds., *Infectious Diseases*, 1995, 4 ed., Churchill Livingstone, New York, pp. 264-272.
 Cometta A. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 1108.
 Del Favero A., *Informazioni sui farmaci*, 1994, XVIII (1), 45-46.
 Harabi E., Kawai Y., Kanazawa K. *et al.*, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 1992, 18, 34-46.
 Klugman K. P. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39, 1140.
Medical Letter, 1996, XXV (23), 100-102.
 Schmutzhard E. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 36, Suppl. A, 85.

LUCIANO VELLA

METADONE [v. vol. IX, coll. 1006-1009]

LAAM

Il LAAM, derivato acetilato del metadone (levo α -acetilmetadolo), è un oppioide analgesico attivo per via orale e utilizzato negli Stati Uniti nel trattamento di mantenimento dei tossicodipendenti da oppiacei. Esso previene infatti i sintomi di astinenza, induce tolleranza agli effetti euforizzanti degli oppiacei e attenua il desiderio compulsivo della droga senza esercitare effetti euforizzanti o produrre eccessiva sedazione.

Dal metadone [m.] il LAAM si differenzia per la cinetica dei suoi effetti: la discreta latenza con cui questi si instaurano (2-4 h dopo l'assunzione orale) può rendere problematico l'impiego del farmaco nella terapia di attacco dei

sintomi di astinenza, ma la lunga durata d'azione (prevenzione dei disturbi di astinenza per 72-96 h) rende più agevole il trattamento di mantenimento dei tossicodipendenti. Queste caratteristiche sembrano in parte riferibili alla biotrasformazione a livello epatico del LAAM in metaboliti attivi (levo α -noracetilmetadolo, levo α -dinoracetilmetadolo identificabili nel plasma, metadolo e normetadolo reperibili nelle urine).

Nei soggetti dipendenti da oppiacei il dosaggio iniziale del farmaco è di 20-40 mg tre volte alla settimana, con successivi aumenti di 5-10 mg fino al raggiungimento di un regime di mantenimento di 70-100 mg tre volte alla settimana. La dose che precede il fine settimana può essere aumentata fino a un massimo del 40% per ottenere una maggiore durata d'azione. In alcuni casi risulta comunque adeguato un trattamento con dosi intervallate di 72 h.

Gli effetti collaterali del LAAM sono simili a quelli osservati con il m. (sudorazione, stipsi, dolori addominali, diminuzione della libido). Il passaggio dal m. al LAAM si accompagna talora alla comparsa di stati di ansia e, in alcuni casi, a un difficile raggiungimento di un equilibrato regime di mantenimento.

Bibliografia

- Anonimo, *The Medical Letter*, 1994, 36, 52.
 Hardman J. C., Limbird L. E., eds., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9 ed., 1996, McGraw-Hill, New York, p. 545.
 Wodak A., *Drugs*, 1994, 47, 446-457.

AMILCARE CARPI DE RESMINI

METASTASI [v. vol. IX, coll. 1022-1029; Agg. I, coll. *5036-5044]

SOMMARIO

PATOLOGIA GENERALE E CLINICA	col. 3650
Introduzione (col. 3650). - Modalità di diffusione (col. 3652). - Fasi del processo metastatico (col. 3653): Distacco cellulare dal tumore primario. - Lisi della matrice extracellulare e delle membrane basali. - Motilità cellulare e invasione metastatica. - Attraversamento dei vasi. - Genetica delle metastasi (col. 3655). - Resistenza al sistema immunitario (col. 3656). - Significato clinico e terapia delle metastasi (col. 3656).	
CHIRURGIA DELLE METASTASI	col. 3657
Introduzione (col. 3657). - Metastasi epatiche (col. 3658): Introduzione. - Selezione del paziente. - Indagini preoperatorie. - Metastasi polmonari (col. 3661): Introduzione e selezione del paziente. - Metastasi da neoplasie colo-rettali. - Metastasi da neoplasie renali. - Metastasi da sarcomi dei tessuti molli. - Metastasi da altri tumori. - Metastasi del cervello (col. 3664). - Metastasi da osteosarcoma (col. 3665). - Altre metastasi operabili (col. 3665): Metastasi da melanoma. - Metastasi surrenaliche.	

PATOLOGIA GENERALE E CLINICA

Introduzione

Le metastasi [m.] rappresentano l'autotrapianto spontaneo di cellule che, staccatesi dal sito primario, raggiungono un altro sito attraverso diverse vie. La capacità metastatica è una peculiarità dei tumori maligni.

La potenzialità metastatica è intrinseca in ogni neoplasia maligna e dipende dall'aggressività del tumore e dal tipo istologico.

Alla diagnosi, il 30% dei tumori presenta m. evidenzia- bili clinicamente, mentre circa il 60% di quelli suscettibili di chirurgia radicale presenta micrometastasi non evidenzia- bili clinicamente.

La formazione delle m. è un processo già possibile in fasi molto precoci dello sviluppo della neoplasia; infatti studi di biologia cellulare hanno evidenziato anche in fase subclinica (tumore < 0,125 cm³) sottogruppi cellulari con questa capacità.

L'eterogeneità della popolazione cellulare neoplastica è alla base del processo di metastatizzazione. Tale variabilità genotipica si evidenzia nelle molteplici espressioni fenotipiche dei cloni neoplastici (produzione di diversi enzimi od ormoni, chemioresistenza, mutabilità recettoriale). Alla base di questo fenomeno vi sarebbe la derepressione di oncogeni e la repressione di geni oncosoppressori: vi è dunque un programma genetico preesistente che la cellula tumorale ha la capacità di riattivare (v. ANTIONCOGENI**; ONCOGENI E PROTONCOGENI**).

La cascata di eventi che porta alla formazione di colonie metastatiche è il risultato di una complessa interazione sequenziale ospite-tumore (tab. I).

Il primo passo è dato dalla selezione, nel tumore primario, di cloni a capacità metastatica. Successivamente le cellule trasformate superano i tessuti circostanti digerendo i costituenti della matrice extracellulare per poter raggiungere i vasi ematici o linfatici. Giunti in prossimità dei capillari le cellule neoplastiche inducono, aderendovi, la retrazione dell'endotelio; quindi lisano la membrana basale, quando presente, e penetrano nei vasi, dove circolano come cellule singole od aggregati cellulari. Infine i cloni si arrestano per adesione all'endotelio vasale attraversandolo nuovamente e, solo dopo aver stimolato la neoangiogenesi, danno origine alla m.

TAB. I. INTERAZIONE OSPITE-TUMORE DURANTE LA CASCATA METASTATICA

Il processo metastatico racchiude in sé eventi che selezionano una limitata sottopopolazione di cloni cellulari. Tale selezione è resa possibile dall'attivazione di oncogeni e dalla inattivazione dei geni oncosoppressori.

Cascata metastatica	Meccanismi
Inizio del tumore	Attivazione o depressione di oncogeni
Promozione e progressione	Amplificazione genica, instabilità genetica
Proliferazione del tumore	Fattori di crescita
Angiogenesi tumorale	Fattori di angiogenesi
Sovvertimento dei tessuti locali e invasione dei vasi	Perdita dell'adesività omotipica, recettori di ancoraggio, lisi delle membrane
Arresto e fuoriuscita delle cellule dai vasi:	
a) aderenza all'endotelio	interazione con molecole di superficie
b) retrazione dell'endotelio	fattori piastrinici
c) adesione alla membrana basale	recettori per la laminina e la trombospodina
d) lisi della membrana	enzimi degradativi fattori «motogenici»
Sottrazione delle cellule alle difese immunitarie del	Resistenza immunitaria, blocco degli antigeni tumorali
Colonizzazione metastatica	

Modalità di diffusione

La propagazione delle cellule neoplastiche può avvenire principalmente attraverso tre vie: 1) via linfatica; 2) via ematogena; 3) via celomatica.

1. La *disseminazione linfatica* rappresenta la via più comune nei carcinomi umani che, privi di un proprio sistema linfatico, utilizzano i capillari dei tessuti peritumorali. Dopo aver raggiunto il torrente linfatico, le cellule neoplastiche approdano, usualmente, ai linfonodi locoregionali arrestandosi a livello dei seni marginali.

La crescita della m. avviene inizialmente all'interno del linfonodo, ma quando la adenopatia oltrepassa i 5 cm di diametro, il superamento della capsula è inevitabile. A questo punto l'invasione neoplastica riproduce quella del tumore primario. La convinzione che la disseminazione da un linfonodo al successivo avvenga in modo progressivo è oggi abbandonata, fatta eccezione per i linfomi, grazie alla presenza di anastomosi linfovenose e all'invasione precoce per via venosa; inoltre, il blocco del flusso linfatico, determina la colonizzazione di stazioni linfonodali inusuali. Le tappe successive prevedono l'invasione progressiva delle catene linfonodali sino allo sbocco nel torrente ematico. Nei tumori a partenza sottodiaframmatica è spesso coinvolto il dotto toracico, con reperimento delle cellule neoplastiche nel linfonodo sovraclaveare di sinistra, detto di Troisier, coinvolto nel carcinoma gastrico, prostatico e del collo uterino.

2. Nel *torrente ematico* vengono riversate un numero impressionante di cellule neoplastiche (24 milioni per ogni grammo di tumore), tuttavia solo lo 0,01% ha la capacità di metastatizzare. Tra i fattori che determinano lo sviluppo di m. per via ematica sono importanti l'istotipo, la localizzazione del tumore primario e la sua grandezza.

I principali sistemi vascolari utilizzati per la disseminazione neoplastica sono il grande circolo ed il sistema portale; a questi si aggiungono circoli collaterali accessori che possono essere usati da particolari neoplasie: il più conosciuto è il circolo venoso vertebrale di *Batson* che, privo di valvole, rende possibile la disseminazione bizzarra di alcune m. Infatti attraverso questo circolo collaterale, il tumore della prostata può metastatizzare a livello vertebrale, pelvico, e femorale senza evidenza di m. in altri organi. Tale circolo è anche coinvolto nelle m. vertebrali da carcinoma mammario.

3. *Molti carcinomi di tipo mucinoso* (ovarico, gastrico, colecistico e pancreatico) possono metastatizzare le sierose dell'organismo: il peritoneo, la pleura e talvolta il pericardio (*via celomatica*). L'impianto è reso possibile dal rilascio di fibrina che, creando una maglia imbrigliante le cellule, scatena una reazione infiammatoria locale responsabile della formazione di liquido (pleurite e ascite neoplastica) che, nel caso del peritoneo, favorisce la disseminazione e il successivo impianto in altri distretti (cavo del Douglas) o in altri organi come le ovaie (tumore di Krukenberg, oggi considerato una metastatizzazione linfatica retrograda, vista la presenza di lesioni all'interno dell'organo).

Va precisato che l'organotropismo delle m. non è correlato alla contiguità del tessuto metastatizzato ma alla presenza di adeguati recettori presenti sulla superficie cellulare e alla produzione, nel sito di localizzazione, di fattori favorevoli l'impianto. Una prova convalidante tale ipotesi è la mancanza di focolai metastatici polmonari nei pazienti affetti da tumore gastrointestinale con ascite neoplastica ai quali è stato posizionato un drenaggio peritoneo-giugulare; va anche esclusa la possibilità di insemamento metastatico derivato dall'atto chirurgico, che può, invece, favorire la disseminazione tumorale nel circolo sanguigno.

Fasi del processo metastatico

Distacco cellulare dal tumore primario

Il normale collegamento tra le cellule è garantito da molecole presenti sulla superficie cellulare, denominate CAM (*Cell-Cell Adhesion Molecules*, Molecole di adesione intercellulare; v. ADESIONE, MOLECOLE DI**).

Nella adesività omotipica le CAM interagiscono con una CAM dello stesso tipo, mentre nell'adesività eterotipica le CAM prendono contatto con una CAM diversa.

Le molecole di adesione si dividono in quattro famiglie: le integrine, le caderine, le immunoglobuline (molecole Ig-simili) e le selectine.

La *caderina E* (uvomorulina), collegata al citoscheletro attraverso un complesso proteico (catenine α , β , γ), è risultata essere diminuita in molti tumori umani. La sua funzione fisiologica è quella di disabilitare temporaneamente l'adesione intercellulare omotipica attraverso la fosforilazione, attivata da fattori di crescita, della tirosina del complesso caderina-catenina. Nelle cellule tumorali la derepressione di alcuni oncogeni ad attività tirosinchinasica garantirebbe la perdita definitiva dell'adesività, condizione necessaria, ma non sufficiente, ad indurre la metastatizzazione: è, infatti, necessaria una nuova distribuzione dei «domini funzionali» delle proteine di membrana della cellula tumorale, che viene così a perdere la sua polarità. Tale riarrangiamento di superficie è considerato un segno precoce di progressione tumorale.

Le CAM responsabili della adesione cellula-matrice appartengono alla famiglia della *integrine*, una classe di recettori dimerici costituiti da 2 subunità (α e β). Esse creano un collegamento tra il versante citoscheletrico della cellula (costituito dalle molecole di vinculina, talina e dai microfilamenti di actina) e la matrice extracellulare (fibronectina, laminina, elastina, entactina, tenascina, fattore di von Willebrand e vari tipi di collagene). Tale collegamento avviene attraverso una regione, detta RGD, costituita da tre aminoacidi (arginina, glicina e acido aspartico), la cui aggiunta in alta concentrazione *in vitro* sembrerebbe inibire la capacità invasiva delle cellule trasformate.

L'espressione delle integrine varia da cellula a cellula ed è modulata da programmi interni o da segnali esterni (fattori di crescita). Si è visto ad esempio che l'integrina $\alpha 5 \beta 1$ (recettore della fibronectina) è diminuita in alcuni tumori, mentre l'iperespressione della integrina $\alpha v \beta 3$ (recettore per la vitronectina) è correlata ad una maggiore capacità metastatica delle cellule di melanoma. Altre integrine, come quella legante la laminina, possono essere alterate in numerosi tumori umani (colon e mammella); è stato dimostrato, inoltre, che alcuni tumori esprimono CAM meno adesive delle originarie per un maggior contenuto di acido polisialico. La capacità metastatica è, quindi, dipendente dall'alterata espressione, quantitativa e qualitativa, delle molecole di adesione.

Per la descrizione delle molecole *Ig-simili* e delle *selectine* si rinvia alla voce ADESIONE, MOLECOLE DI** (col. **71).

Lisi della matrice extracellulare e delle membrane basali

I vari compartimenti cellulari sono delimitati da strutture appartenenti alla matrice extracellulare denominate membrane basali; impenetrabili dalle cellule normali (fanno eccezione quelle specializzate come i leucociti), esse costituiscono un valido sostegno per gli epiteli, un rivestimento per le fibre nervose e muscolari ed infine, circoscrivono il confine tra parenchima e stroma. Le cellule neoplastiche, imitando i programmi genetici utilizzati fisiologicamente dalle cellule specializzate, acquisiscono la capacità di attraversare tali strutture di confine, utilizzando enzimi proteolitici

secreti sia dalle stesse cellule tumorali sia dai fibroblasti tumore indotti.

Il pool di enzimi comprende l'attivatore del plasminogeno (PA), la plasmina, diverse collagenasi (metalloproteasi calcio e zinco dipendenti), cathepsine, glicosidasi e idrolasi; quest'ultime, rilasciate come proenzimi, sono attivate da proteasi che garantiscono un'amplificazione del processo. L'attività litica di tutti i suddetti enzimi è strettamente regolata, nelle cellule normali, dal rapporto di attività tra enzima ed inibitore.

Un ruolo determinante nella lisi della matrice è svolto dalle *metalloproteasi*, che si dividono in tre sottoclassi: collagenasi di tipo IV, collagenasi interstiziali e stromalisine; in particolare le due collagenasi di tipo IV sono in relazione con il fenotipo metastatico delle cellule tumorali. Studi *in vitro* hanno mostrato in alcuni tumori umani (colon, stomaco e mammella) un'abnorme produzione di questo enzima, che viene regolato dall'azione del TGF- $\beta 1$; inoltre l'uso degli inibitori, denominati TIMP 1 e 2, limita sia la capacità invasiva delle suddette cellule, sia la capacità neoangiogenetica: queste caratteristiche rendono le collagenasi di tipo IV un fattore prognostico di aggressività.

L'espressione dei recettori per l'attivatore del plasminogeno, sulla superficie delle cellule trasformate, garantisce un'aumentata attività idrolitica dell'enzima nelle vicinanze della cellula, sottraendolo all'azione degli inibitori. Tale meccanismo, dimostrato nelle cellule di melanoma, è contrastato, *in vitro*, dall'azione di anticorpi antirecettore.

Motilità cellulare e invasione metastatica

Avvenuta la lisi della matrice, le cellule tumorali migrano attraverso essa con un movimento direzionale, reso possibile da molecole diffusibili secrete localmente dai fibroblasti, dalle cellule endoteliali o dai leucociti, capaci di stimolare la motilità cellulare ed orientarla.

Questi fattori «motogenici», che vengono rilasciati attraverso un meccanismo di secrezione paracrina, sono utilizzati dalle cellule normali durante i processi di riparazione e rigenerazione cellulare. Le cellule neoplastiche possono indurre la loro produzione, o rilasciarli direttamente attraverso un meccanismo di tipo autocrino.

Tra i vari fattori scoperti lo *Scatter Factor* è uno dei più studiati: secreto dai fibroblasti esso risulta essere identico al fattore di crescita per gli epatociti (HGF) che, *in vitro*, stimola la proliferazione degli epatociti, ed è inoltre capace di orientare la migrazione delle cellule trasformate nella matrice cellulare. Lo *Scatter Factor* agisce attraverso il legame con un recettore presente sulla membrana cellulare di diverse cellule. Strutturalmente il recettore è composto da un dominio extracellulare, che lega il fattore di crescita, e una porzione citoplasmatica ad attività tirosinchinasica che catalizza la fosforilazione dei residui di tirosina della proteina intracellulare. Il gene che codifica lo *Scatter factor* è il proto-oncogene *met*; la sua iperespressione è stata evidenziata in molti tumori umani ad alto indice di metastatizzazione. Il duplice ruolo svolto dalla molecola evidenzia come la cellula neoplastica utilizzi programmi e strutture preesistenti nella cellula normale, alterandone l'attività quantitativamente e qualitativamente. Due interessanti analogie sono state evidenziate tra i processi di migrazione cellulare e quelli di neoangiogenesi: *in vitro* l'impregnazione della matrice extracellulare con i fattori «motogenici» ha stimolato una vistosa risposta angiogenetica (v. ANGIOGENESI**, coll. **344-346). Anche i recettori presenti sulle cellule endoteliali tumorali per i fattori di crescita endoteliale e di permeabilità vascolare (VEGF/VPF) si caratterizzano per una porzione intracitoplasmatica ad attività tirosinchinasica.

Attività «motogenetica» è svolta anche da un insieme di molecole: il fattore di crescita delle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di necrosi tumorale (TNF), e una famiglia di sostanze denominate AMF (*autocrine motility factors*) anch'esse contenute nello stroma.

Attraversamento dei vasi

La circolazione ematica trasporta le cellule neoplastiche ubiquitariamente; durante il loro viaggio, esse interagiscono con diversi tipi di cellule dell'ospite, quali i leucociti, le piastrine, e le cellule endoteliali dei vasi; tali interazioni sono critiche nel favorire la capacità metastatica.

I leucociti, in risposta a processi infiammatori, aderiscono alle pareti dei vasi attraversandoli, guidati da segnali specifici (fattori di crescita, citochine) che stimolano l'endotelio vasale all'espressione di molecole di adesione, come le selectine che, legando i gruppi carboidrati della superficie cellulare del globulo bianco, ne rallentano il flusso. Questo «rallentamento» garantisce una sufficiente esposizione a segnali attivanti l'espressione delle integrine che stabilizzano il legame, permettendo l'estroflessione della membrana cellulare (*leading lamella*), la protrusione dei lamellociti, la cui estremità, facendo perno sul vaso, consente la migrazione della cellula.

Le cellule neoplastiche mimano questo processo legandosi alle selectine dell'endotelio attivato ed esprimendo le integrine di superficie; inoltre, attraverso l'espressione di lectine, possono aderire ai leucociti: tutto ciò facilita la disseminazione neoplastica.

Genetica delle metastasi

L'invasione e la disseminazione neoplastica avvengono attraverso l'utilizzo di programmi genetici preesistenti, il cui controllo è strettamente regolato da un complesso apparato comprendente segnali extracellulari, recettori di superficie, sistemi trasduzionali e trascrizionali. Una lesione a qualsiasi livello di questo apparato sequenziale, promuove la capacità invasiva della cellula; si è coniato il termine *metastasiogeni* e *geni metastasi-soppressori* per indicare i geni deputati a tale controllo, indipendenti da quelli che influenzano il fenotipo tumorale.

Un esempio di metastasi-gene è dato dalla proteina di membrana dei leucociti, la CD44; attraverso il riarrangiamento (*splicing*) si generano molteplici isoforme denominate CD44v. In particolare la variante V-6 è notevolmente diminuita nei tumori altamente metastatizzanti, favorendo la disseminazione linfonodale.

Esperimenti di biologia molecolare hanno mostrato come sia possibile attivare il programma migratorio-invasivo in cellule neoplastiche che ne sono prive, attraverso la transfezione di oncogeni della famiglia *H-ras*, evidenziando, inoltre, una stretta correlazione tra i livelli di espressione dell'oncogene ed il numero di metastasi.

Nei tumori umani vengono trovate, spesso, alterazioni degli oncogeni; l'amplificazione del *c-erbB2/HER-2/neu* e del *H-ras* è associata alla metastatizzazione linfonodale del carcinoma del colon e mammario; l'*N-myc* è associato ad una rapida progressione del neuroblastoma. La sua iper-espressione è, infatti, associata a cattiva prognosi, con una sopravvivenza libera da malattia a 18 mesi compresa tra il 70% ed il 5% per tumori con un numero di copie dell'oncogene rispettivamente di 1 o più di 10. Altri oncogeni della famiglia *myc*, *v-myc*, *v-raf* e *v-src*, sono coinvolti nella conversione delle cellule neoplastiche non metastatizzanti in metastatizzanti (V. ONCOGENI E FATTORI ONCOGENI**).

Si va delineando oggi il ruolo dei geni metastasi-soppressori. In particolare nel carcinoma del colon si è ricon-

trata un'alterazione del dominio extracellulare della cadherina E (NCAM; *neural cell adhesion molecule*) codificata dal gene oncosoppressore *DCC* (deletto nel carcinoma del colon). Un altro metastasi soppressore coinvolto nelle m. del carcinoma mammario è il gene *nm23*, codificante per un fattore trascrizionale; la sua inoculazione sperimentale in alcune linee di cellule tumorali ne ha ridotto notevolmente la proprietà metastatica. Anche l'inattivazione del gene oncosoppressore *p53* (V. *p53* GENE E PROTEINA**; ANTIONCOGENI**) sembra essere coinvolta nel 50% delle progressioni nei tumori umani determinando un maggior numero di errori durante la replicazione del DNA.

Resistenza al sistema immunitario

L'espressione da parte delle cellule tumorali di antigeni non fisiologicamente espressi dalle cellule normali dovrebbe, teoricamente, garantire il controllo della proliferazione e dell'invasione neoplastica mediata dalla risposta cellulomediata. La realtà è molto complessa: se da una parte il controllo immunitario garantisce un'efficace limitazione allo sviluppo di cloni neoplastici, dall'altra le cellule tumorali hanno sviluppato meccanismi per eludere tale controllo, proliferando e metastatizzando.

Diversi sono i meccanismi di elusione («*escape*»):

- 1) copertura degli epitopi presenti sugli antigeni della cellula tumorale da parte di anticorpi;
- 2) formazione di complessi immuni circolanti;
- 3) interazione tra paratopo del TCR (recettore dei linfociti T) ed epitopo dell'antigene tumorale;
- 4) scarsa espressione sulla superficie delle cellule neoplastiche dei complessi maggiori di istocompatibilità (MHC) di classe I;
- 5) variabilità antigenica durante la progressione neoplastica, che può portare alla espressione di nuovi cloni insensibili ai meccanismi immunitari sino a quel momento funzionanti;
- 6) rilascio di «fattori biochimici» che interferiscono su sistemi di attivazione cellulare (inibizione delle vie effettrici immunitarie, variazioni del contenuto di nucleotidi ciclici).

Significato clinico e terapia delle metastasi

La presenza delle m. già in fase subclinica rappresenta un ostacolo enorme al trattamento dei tumori. Un tumore di 1 cm³ contiene approssimativamente 10 miliardi di cellule. Calcolando che da ogni singola cellula può originare un clone neoplastico, ne deriva che, alla diagnosi, la storia naturale del tumore è già relativamente avanzata.

La corretta stadiazione clinica della neoplasia è oggi l'unico strumento a disposizione per selezionare i pazienti passibili di trattamento chemioterapico, chirurgico o radioterapico. I dati sperimentali in nostro possesso, mostrano che la selezione di cloni tumorali metastatizzanti è subordinata al raggiungimento di una massa critica prima della quale la probabilità che una mutazione possa accadere è nulla (origine mutazionale) per cui un intervento terapeutico precoce (*trattamento adiuvante e neoadiuvante*) garantirebbe l'eradicazione della malattia. Va anche considerata la frequente ripresa di malattia sia locale che a distanza, dopo l'escissione del tumore primario, legata alla presenza di micrometastasi, allo stato di immunodepressione post-operatoria, all'alterazione dei processi di coagulazione, che favoriscono i processi di metastatizzazione.

La strategia terapeutica per il trattamento delle m. va impostata solo dopo aver valutato la sede di metastatizzazione, il numero delle lesioni, l'intervallo libero di malattia (in caso di precedente trattamento). Non è possibile, generalmente, codificare un trattamento standard per la malattia metastatica.

La comprensione dei meccanismi che sono alla base del processo metastatico, ha permesso di programmare nuove strategie per la diagnosi e la terapia dei tumori. Studi sperimentali stanno valutando la possibilità di utilizzare gli oncogeni come fattori prognostici, capaci di predire la capacità metastatizzante del tumore; l'uso di anticorpi marcati anti metastaso-antigeni potrà forse permettere di evidenziare le sedi di micrometastasi. Si sta tentando di mettere a punto metodi di rilevazione degli enzimi litici, come la collagenasi di tipo IV, nel sangue e nelle urine, per anticipare i tempi di diagnosi di ripresa di malattia. L'importanza dell'angiogenesi (v.**) nella metastatizzazione ha stimolato la ricerca di agenti capaci di bloccare tale evento. È in corso la sperimentazione clinica di fase I. Anche la terapia genica è entrata nel bagaglio terapeutico dell'oncologo: si tenta infatti di introdurre antigeni MHC di classe I nelle cellule tumorali che ne sono carenti, oppure di utilizzare oligonucleotidi antisense (v. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDI**) che possono inibire l'mRNA di un oncogene attivato. Le prospettive future sono molte (compresa quella della *strategia anti-gene*, per la quale rinviamo alla voce NUCLEICI ACIDI**, *strategia anti-gene*), anche se a tutt'oggi la diagnosi ed il trattamento precoce delle neoplasie rimane l'arma più efficace.

Bibliografia

- Aznavorian S. A., Liotta L. A., *Bull. Inst. Pasteur*, 1994, **92-4**, 234-241.
 Aznavorian S., Murphy A. N., Stetler-Stevenson W. G., Liotta L. A., *Cancer*, 1993, **71**, 1368-1383.
 De Vita V. T. jr., Hellman S., Rosenberg S. A., *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 1997, 5 ediz., Lippincott-Raven, Philadelphia-New York.
 Fidler I. J., *Am. Surg.*, 1995, **61**, 1065-1066.
 Levine M. D., Liotta L. A., Stracke M. L., *EXS*, 1995, **74**, 157-179.
 Liotta L. A., Steeg P. S., Stetler-Stevenson W. G., *Cell*, 1991, **64**, 327-336.
 MacDonald N. J., Steeg P. S., *Cancer Surv.*, 1993, **16**, 175-199.
 Marcel M. M., Van Roy F. M., Bracke M. E., *Crit. Rev. Oncog.*, 1993, **4**, 559-594.

ENRICO CORTESI E GIUSEPPE FORNARINI

CHIRURGIA DELLE METASTASI

Introduzione

La comparsa di una m. per via ematogena è stata a lungo considerata un segno di interessamento sistemico da parte della malattia neoplastica e, quindi, non suscettibile di trattamento curativo.

In base a tale principio, negli scorsi decenni, il trattamento chirurgico delle lesioni metastatiche di rado appariva giustificato; tuttavia la prognosi drammaticamente severa dei pazienti con malattia neoplastica metastatica ha ben presto spinto la ricerca verso soluzioni alternative e più valide di un trattamento meramente palliativo.

I progressi compiuti in oncologia con i trattamenti integrati radio-chemioterapici, l'affinamento delle tecniche chirurgiche e la migliorata assistenza perioperatoria hanno comunque permesso alla chirurgia di ritagliarsi un ruolo non ancora definitivo, ma importante, nel campo del trattamento delle m.: esistono situazioni cliniche, seppur selezionate, in cui la rimozione della localizzazione secondaria può condurre ad una considerevole aspettativa di vita se non addirittura alla guarigione permanente del paziente neoplastico.

La letteratura abbonda di descrizioni aneddotiche e di studi retrospettivi, effettuati su gruppi di pazienti con malattia neoplastica metastatica, in cui i risultati appaiono spesso contrastanti e mal interpretabili e le indicazioni poste dai vari AA. al trattamento chirurgico mai ben definite ed omogenee. In attesa di conoscere i risultati a lungo termine dei vari studi prospettici attualmente in corso, di

fronte ad una malattia neoplastica in stato avanzato è opportuno non gettare la spugna, ma è necessario, ad ogni modo, delineare un programma terapeutico che tenga debitamente conto del tumore primitivo (istotipo, *staging*, evoluzione, prognosi), delle m. presenti (numero, sede, aggreddibilità) e delle condizioni generali del paziente (sintomatologia, stato clinico generale, presenza di eventuali patologie cardiovascolari, renali e respiratorie concomitanti) in modo da affidare alla chirurgia i pazienti che effettivamente possano ricevere giovamento dall'asportazione della o delle m.

Metastasi epatiche

Introduzione

Tutte le neoplasie possono, nella loro evoluzione biologica, dare m. epatiche. In studi autopsici effettuati su pazienti deceduti per neoplasie, la frequenza di m. epatiche è di circa il 40% ed è seconda solo alle localizzazioni linfonodali (oltre il 50%) e di poco superiore a quelle polmonari (39%) (Staudacher *et al.*, 1996).

Se si eccettuano le lesioni ripetitive epatiche di neoplasie renali (in particolare da tumore di Wilms) e di alcuni tumori neuroendocrini, le m. da tumori extradietivi in genere non rivestono interesse chirurgico: nella storia di tali neoplasie, infatti, le localizzazioni epatiche sono in genere precedute da m. ad altri distretti e, anche se in letteratura sono comunque riportati casi trattati chirurgicamente con un certo successo, si tratta tuttavia di osservazioni isolate.

I tumori digestivi, tributari del sistema portale, spesso danno m. esclusivamente epatiche e possono quindi avvalersi di un trattamento chirurgico che abbia intenti curativi. L'indicazione all'intervento, tuttavia, viene solitamente posta solo per i carcinomi del grosso intestino; le lesioni ripetitive epatiche a partenza da altri organi (colecisti, pancreas, stomaco) cadono generalmente oltre i confini della reseccabilità a causa della maggiore aggressività di questi istotipi.

L'incidenza di m. epatiche da carcinoma intestinale coesistenti col tumore primitivo (sincrone [fig. 1]), o evidenziate durante il *follow-up* (metacrone [fig. 2]), in alcune casistiche raggiunge l'80%. La sopravvivenza mediana dei pazienti non sottoposti ad alcun trattamento, eccettuati casi sporadici di neoplasie ben differenziate, non supera i 4-12 mesi. Il trattamento chirurgico, quando attuabile, migliora sensibilmente la prognosi: la sopravvivenza a distanza, sulla base delle maggiori casistiche riportate in letteratura, risulta essere di circa l'80% ad 1 anno, del 60% a tre anni e del 25-40% a cinque anni (Scheiner e Brower, 1994).

Sebbene non siano comuni come le analoghe lesioni da carcinoma del colon e del retto, le m. epatiche da nefroblastoma (tumore di Wilms) e da tumori endocrini trattate chirurgicamente mostrano risultati addirittura migliori: le casistiche pubblicate, seppur poco numerose, riportano tassi di sopravvivenza a 5 anni superiori al 50% per le m. uniche da neoplasie renali e fino all'80% a cinque anni per quelle da tumori neuroendocrini, con scomparsa della sintomatologia da iperinsurrezione ormonale in tutti i casi trattati (Mariette e Fagnier, 1992).

Tali incoraggianti risultati hanno stimolato una serie di studi tesi ad individuare alcuni fattori prognostici in base ai quali selezionare quei pazienti per i quali il trattamento chirurgico fosse di estremo beneficio. Sono stati presi in considerazione dati relativi al paziente (età, sesso, condizioni generali), al tumore primitivo (stadio, *grading*, sede), alla m. (numero, dimensioni, distribuzione e tempo di insorgenza) e al numero di trasfusioni eventualmente effettuate durante l'intervento (Schwartz, 1995).

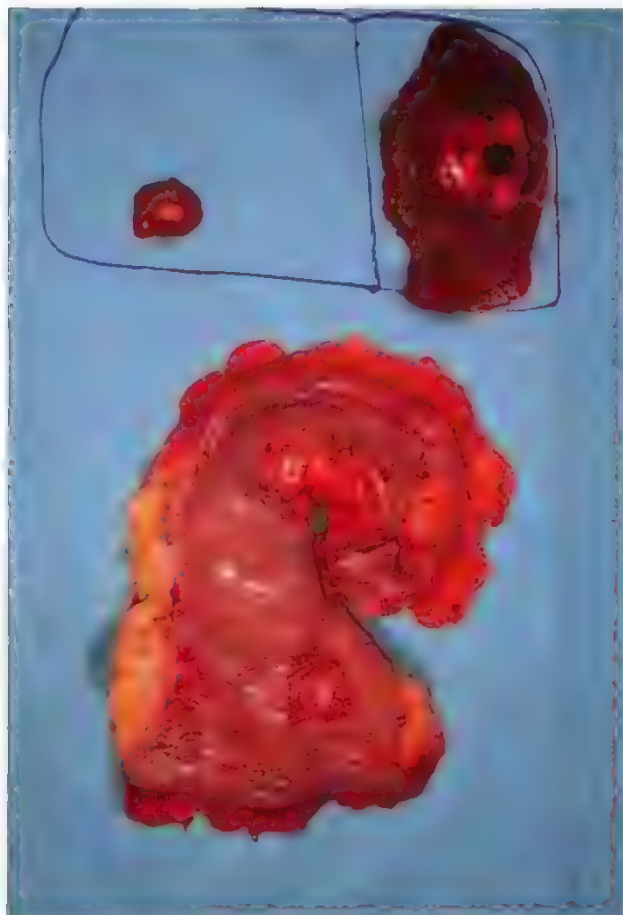


Fig. 1. M. sincrone. Nel pezzo operatorio sono compresi la neoplasia primitiva (adenocarcinoma del colon; *in basso*) e tre m. epatiche sincrone (una più piccola, localizzata nel lobo sinistro del fegato e due a carico del lobo destro; *in alto*).

Dal variegato panorama di studi non emergono però conclusioni unanimemente accettate, per cui, al momento, in attesa di ulteriori studi prospettici, non è possibile affer-

mare con certezza l'esistenza di fattori prognostici determinanti (Barr *et al.*, 1992).

Una certa importanza viene comunque riconosciuta al tempo di insorgenza delle m.: le metacrone tardive (comparse almeno 12 mesi dopo il trattamento del tumore primitivo) sono spesso associate ad una sopravvivenza superiore rispetto alle m. sincrone.

Selezione del paziente

In assenza di determinanti statisticamente significativi, la selezione del paziente da avviare alla chirurgia deve tenere debitamente conto di alcuni criteri, legati alla malattia ed al paziente.

1. *Condizioni generali del paziente.* - È necessario valutare attentamente il rapporto rischio-beneficio, tenendo conto dell'età del paziente ma soprattutto delle condizioni generali; la presenza di importanti patologie concomitanti (cardiovascolari, respiratorie, renali) generalmente controindica l'intervento chirurgico.

2. *Istotipo della neoplasia primitiva.* - Come detto, le m. da carcinoma intestinale, da nefroblastoma e da tumori neuroendocrini offrono i risultati migliori.

3. *Numero delle metastasi.* - Le m. uniche risultano generalmente più facili da aggredire chirurgicamente; la presenza di più lesioni monolaterali, purché tecnicamente asportabili, pur non rappresentando necessariamente una controindicazione all'intervento e non essendo statisticamente caratterizzata da una prognosi peggiore, può talvolta richiedere un intervento tecnicamente più complesso e un sacrificio di parenchima epatico maggiore. Quando bilaterali e multiple, le metastasi epatiche vengono generalmente considerate inoperabili.

4. *Resecabilità e riserva epatica.* - È necessario risparmiare una quota del parenchima epatico in grado di garantire una sufficiente funzionalità postoperatoria; in un fegato sano, pertanto, è possibile asportare fino ad un massimo dell'80% del parenchima funzionante. La cirrosi, di per sé, non rappresenta una controindicazione almeno per le classi A e B1 della classificazione di Child. In tali casi, però, è necessario preservare almeno il 60% della riserva epatica.

Nei casi in cui l'intervento chirurgico non appaia in grado di garantire una riserva epatica adeguata, si può prendere in considerazione un trattamento in due tempi: si effettua dapprima un'embolizzazione transcutanea del ramo portale principale tributario del lobo epatico da asportare.

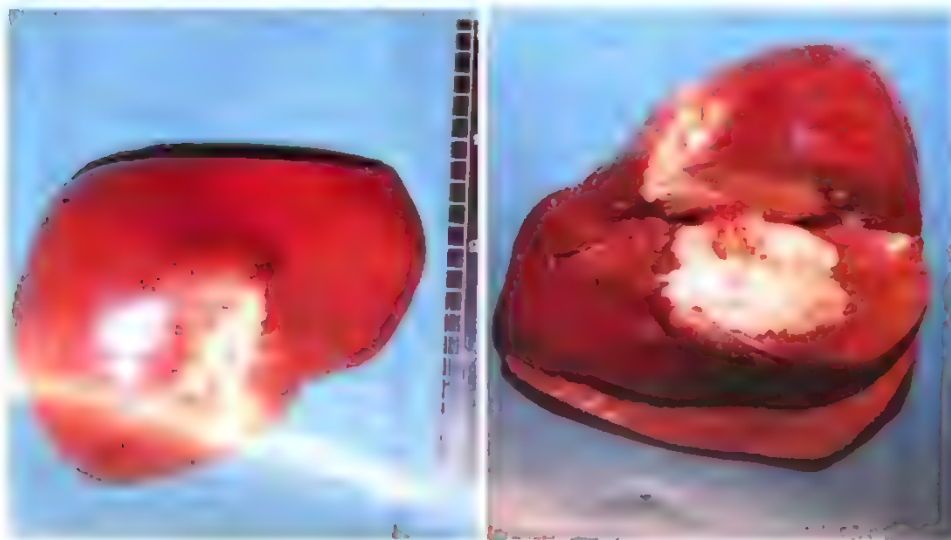


Fig. 2. *A sinistra*: m. metacrone. Epatectomia destra (pezzo operatorio) in paziente sottoposto due anni prima a resezione intestinale per neoplasia del colon. *A destra*: la voluminosa lesione metastatica occupa gran parte del lobo destro del fegato.

in modo da provocarne l'atrofia e, contemporaneamente, stimolando il lobo controlaterale all'iperplasia compensatoria, così da raggiungere una riserva epatica altrimenti insufficiente.

La scelta dell'intervento, quando non condizionata dalla sede e dal numero delle lesioni e dalla quantità di parenchima coinvolto, è legata alle preferenze dell'operatore: non sono finora emerse differenze statisticamente significative tra «wedge» resections e resezioni epatiche regolate (segmentectomie, settoriectomie, epatectomie), anche se si raccomanda far cadere i margini di resezione chirurgica ad almeno 1 cm da quelli della lesione neoplastica.

Indagini preoperatorie

I criteri suesposti presuppongono un'accurata indagine preoperatoria anamnestica, di laboratorio e strumentale.

Attualmente la TC *total body* offre i risultati migliori nel documentare preoperatoriamente sia le lesioni epatiche, sia la presenza di lesioni in altri distretti che rappresenterebbero una controindicazione all'intervento. La metodica consente inoltre quell'analisi volumetrica in grado di definire la quantità di parenchima epatico da asportare e, quindi, di identificare preoperatoriamente la riserva epatica di ogni singolo paziente.

I dati forniti dalla TC, secondo quando concordemente affermato dai vari AA., devono essere necessariamente integrati con quelli della ecografia epatica intraoperatoria, dotata di una altissima specificità verso altre localizzazioni epatiche che possono rimanere misconosciute.

Per m. che contraggono rapporto con i vasi maggiori è opportuno completare l'iter diagnostico con un'angiografia; nello studio di lesioni contigue alle vie biliari principali il ricorso alla colangiografia retrograda perendoscopica appare necessario, anche se attualmente giungono incoraggianti risultati dalla colangi-RMN (v. TOMOGRAFIA A RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE**), destinata probabilmente a sostituire la colangiografia retrograda perendoscopica in tale applicazione.

Per i tumori neuroendocrini, infine, la fase diagnostica si deve avvalere di una scintigrafia con octreotide (Octreoscan) al fine di verificare l'eventuale presenza di altri siti metastatici che controindicherebbero l'intervento.

In casi in cui, al tavolo operatorio, si ponga controindicazione all'intervento resettivo, è possibile incannulare la vena gastroepiploica destra con un catetere destinato alla chemioterapia loco-regionale per via venosa portale. La metodica, pur conservando le sue caratteristiche di palliazione, sembra offrire risultati più vantaggiosi rispetto alla radioterapia, alla chemioterapia sistemica, alla legatura dell'arteria epatica ed alla alcolizzazione (Staudacher *et al.*, 1996).

Metastasi polmonari

Introduzione e selezione del paziente

La descrizione della prima resezione polmonare per metastasi fu pubblicata da Divis nel 1927.

Da allora, fino agli inizi degli anni '70, il trattamento chirurgico delle m. polmonari è stato appannaggio esclusivo di un ristretto numero di pazienti, selezionati in base a rigidi criteri; l'osservazione retrospettiva dell'altissima mortalità dei pazienti non trattati ha tuttavia suggerito un atteggiamento più aggressivo.

Anche il polmone, per il suo ruolo centrale nell'albero vascolare, può essere interessato da diffusione metastatica di malattia a partenza da vari organi (tab. II).

Le m. polmonari raramente sono sintomatiche (< 5%); la diagnosi viene tipicamente stabilita da una radiografia del torace di screening in corso di follow-up dopo il trattamento della neoplasia primaria (Rusch, 1995).

TAB. II. FREQUENZA DELLE METASTASI POLMONARI NELLE VARIE NEOPLASIE

(modificata da W. Rusch, 1995)

Tumore primitivo	Metastasi polmonari (%)
Grosso intestino	20
Mammella	19
Rene	10
Osteosarcoma	9
Sarcoma dei tessuti molli	8
Melanoma	8
Tumori ginecologici	6
Altri	5

L'aspetto della lesione, la storia biologica del tumore ed il rialzo dei *markers* specifici di neoplasia, in presenza di una lesione sospetta alla radiografia del torace consentono di porre diagnosi con una certa sicurezza. La TC, quando possibile, va comunque eseguita per escludere una diffusione micronodulare nel parenchima polmonare ed eseguire una biopsia guidata della lesione.

Molti dei pazienti con diffusione polmonare di malattia presentano purtroppo m. in altri siti e conseguentemente appaiono non suscettibili di trattamento chirurgico; in casi selezionati, tuttavia, è possibile resecare le lesioni polmonari (fig. 3).

Sebbene manchi unanimità sui criteri di selezione dei pazienti, il ricorso alla chirurgia è comunemente ritenuto corretto qualora:

- a) esista un buon controllo della lesione primitiva;
- b) non siano presenti localizzazioni extratoraciche;
- c) il tempo di raddoppiamento della neoplasia sia superiore a 40 giorni;
- d) le lesioni, singole o multiple, siano aggredibili chirurgicamente;
- e) la funzionalità del parenchima residuo sia soddisfacente.

Il tipo di intervento (*wedge resection*, resezione tipica) non sembra condizionare la sopravvivenza; la scelta della tattica chirurgica appare dunque condizionata dall'aggredibilità delle lesioni, da effettuarsi mediante toracotomia monolaterale, bilaterale, sternotomia mediana o toracotomia anteriore bilaterale. La scelta dell'approccio, naturalmente, è funzione del numero e della sede delle lesioni metastatiche. L'impiego terapeutico della videotoracosopia (TVATS: *Thoracoscopy Video Assisted Thoracic Surgery*) appare limitato alle lesioni affioranti alla pleura viscerale ed è comunque gravato dal rischio di non effettuare un intervento radicale, con i margini di sezione passanti per tessuto tumorale, e di provocare un insembramento neoplastico.

Alle m. polmonari da osteosarcoma è dedicata una sezione successiva di questo capitolo. Le m. originate dagli altri istotipi di tumore vengono invece qui di seguito trattate.

Metastasi da neoplasie colo-rettali

Le m. polmonari (fig. 3) complicano in circa il 20% dei casi la storia biologica di tali neoplasie, ma solo in una piccola percentuale (2-10%; il dato varia a seconda delle casistiche considerate) sono localizzate esclusivamente al polmone e suscettibili di exeresi. La sopravvivenza a 5 anni, emersa dalla più recente letteratura, oscilla tra il 21% ed il 50% e

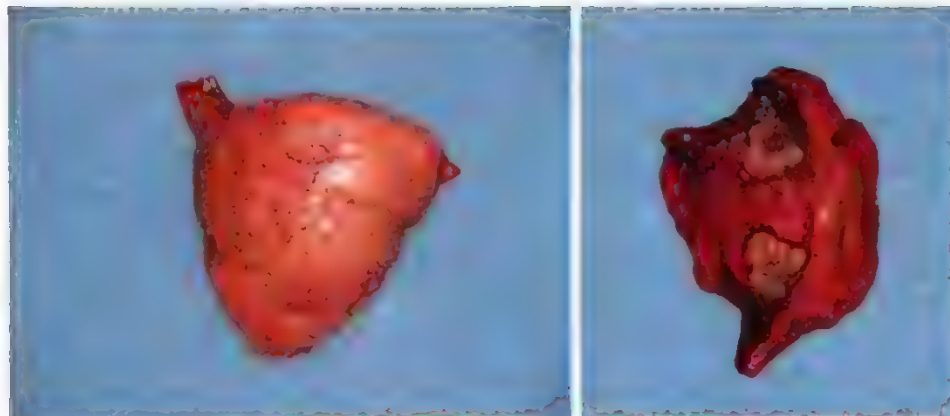


Fig. 3. A sinistra: lobectomia polmonare (pezzo operatorio) in paziente sottoposto in precedenza a resezione anteriore del retto per neoplasia. A destra: nel lobo polmonare sono riconoscibili due m. contigue.

sembra essere indipendente dal numero delle m. e dallo stadio diukes del tumore primitivo. Al contrario, nei pazienti non trattati, la sopravvivenza non supera i 12-24 mesi. L'intervento garantisce un sensibile aumento di sopravvivenza anche nei casi di ripresentazione metastatica polmonare dopo una resezione e in pazienti già operati per una m. epatica da carcinoma colo-rettale (Rusch, 1995; McCormack, 1992).

Metastasi da neoplasie renali

Solo in una piccola percentuale (1-3%) le lesioni polmonari sono uniche o comunque reseccabili. In tale gruppo, seppur selezionato, i risultati del trattamento chirurgico appaiono in genere buoni (sopravvivenza a 5 anni del 21-60%). I pazienti con lesioni monolaterali inferiori a 2 cm sembrano avere risultati migliori rispetto agli altri; la sopravvivenza attuariale appare tuttavia indipendente dal numero di lesioni e dall'intervallo di malattia (Kirsch *et al.*, 1993).

In letteratura è descritta la regressione spontanea delle m. polmonari dopo nefrectomia: si tratta di un fenomeno ben conosciuto, ma estremamente raro (67 casi dal 1928) e che non rappresenta sicuro indice di guarigione (Barr *et al.*, 1992).

Metastasi da sarcomi dei tessuti molli

La resezione chirurgica, quando possibile, rimane al momento l'unico trattamento potenzialmente curativo per le m. polmonari da sarcoma dei tessuti molli, essendo nota la chemioresistenza di tale neoplasia che predilige proprio il polmone quale sede di diffusione a distanza. I risultati ottenuti finora appaiono incoraggianti, con tassi di sopravvivenza a 5 anni che oscillano tra il 20 ed il 35% per i pazienti sottoposti ad intervento potenzialmente curativo. Sono considerati fattori prognostici favorevoli un tempo di raddoppiamento della neoplasia superiore a 20 giorni, la localizzazione monolaterale, il numero delle metastasi (non più di quattro), l'intervallo libero da malattia (> a 12 mesi) e l'istotipo (l'istiocitoma fibroso maligno appare il più favorevole) (Roth *et al.*, 1996).

Poiché le m. non trattate risultano generalmente fatali entro due anni, ed in assenza di una valida alternativa terapeutica, si sta valutando il ruolo dei reinterventi nelle m. polmonari recidive.

Metastasi da altri tumori

Il ruolo della chirurgia appare limitato. Nel tumore della mammella il tasso di m. polmonari aggredibili è estremamente basso (1%) per la tendenza della neoplasia a metastatizzare contemporaneamente in altri siti, anche se con-

fortato da tassi di sopravvivenza a 5 anni del 20-45% ottenuti integrando il trattamento chirurgico con l'importante ruolo svolto dalla chemioterapia. Nelle m. da melanoma il tasso di sopravvivenza è desolante, a causa del comportamento capriccioso ed imprevedibile di tale neoplasia che sovente metastatizza contemporaneamente in altri organi. Nei pazienti operabili il tasso di sopravvivenza a 5 anni è solo del 4-10%; il trattamento chirurgico di pazienti con meno di tre localizzazioni polmonari sembra offrire risultati migliori (Staudacher *et al.*, 1996).

Metastasi del cervello

L'origine più comune delle m. cerebrali è il carcinoma polmonare (59%), seguito dal carcinoma della mammella (17%); altri istotipi, comunque, possono localizzarsi al cervello (melanoma, tumori dell'apparato genito-urinario, tumori intestinali); in una percentuale non trascurabile (15-30%), le m. cerebrali rappresentano la manifestazione primaria di un tumore occulto.

Contrariamente a quanto avviene per le m. epatiche e polmonari, le m. cerebrali sono frequentemente sintomatiche ed invalidanti anche quando sono di piccole dimensioni. Si tratta di lesioni sovente ben circoscritte, ricoperte da una pseudocapsula di gliosi reattiva e, quindi, facilmente enucleabili. L'indicazione alla chirurgia è condivisa da gran parte degli A.A. solo nei casi di m. unica, aggredibile chirurgicamente in pazienti che non presentano altre localizzazioni secondarie ed in buone condizioni generali. La possibilità di aggredire la m. dipende naturalmente dalla profondità e dalla localizzazione: lesioni della fossa cranica posteriore, per ovvi motivi, sono meno frequentemente reseccabili di quelle sopratentoriali che però sono le più comuni (75%). Rispettati tali criteri di selezione, la chirurgia (peraltro gravata da bassi tassi di mortalità e morbidità) sembra garantire una buona sopravvivenza, migliora sensibilmente e prontamente sintomatologia e *performance status*, con risultati di gran lunga superiori a quelli ottenibili con la radioterapia. Va comunque rimarcato che, in circa il 70% dei casi, le m. cerebrali sono multiple e che, in un'altro segmento di pazienti, al momento della diagnosi sono presenti altre localizzazioni. Da qui l'esigenza di studiare accuratamente il paziente mediante TAC e RMN per valutare la situazione cerebrale; nei casi in cui la m. sia la prima manifestazione di un tumore occulto, è necessario inoltre eseguire gli opportuni approfondimenti diagnostici tesi ad accertare il sito di origine della neoplasia.

Quando l'intervento di metastasectomia (è estremamente raro il ricorso alla lobectomia) è controindicato, è opportuno ricorrere ad un trattamento radioterapico palliativo, pre-

feribilmente associato alla somministrazione di cortisone ad alte dosi e/o di sensibilizzanti delle cellule ipossiche.

Come detto, l'istotipo più rappresentato è senza dubbio il carcinoma del polmone; la prognosi di tali lesioni, lasciate alla loro evoluzione, è estremamente severa. In assenza di trattamento la sopravvivenza media è di circa un mese; il trattamento con corticosteroidi sembra garantire, in media, due mesi di sopravvivenza, l'irradiazione totale dell'encefalo la migliora fino a 3-6 mesi. Quando nei tumori *Non-Small Cell Lung Cancer* (NSCLC) è possibile effettuare un trattamento chirurgico combinato, con buon controllo della malattia nel sito primario, la sopravvivenza media raggiunge 18-28 mesi.

Metastasi da osteosarcoma

L'osteosarcoma rappresenta il tumore maligno più frequente del tessuto osseo ed ha una particolare predilezione per l'età giovanile (seconda e terza decade). Prima del 1975, la percentuale di pazienti affetti da osteosarcoma che giungeva alla guarigione era del 20%; attualmente essa si aggira attorno al 60%. Tale insperato aumento della sopravvivenza è riconducibile soprattutto ai progressi della chemioterapia (sia adiuvante che neo-adiuvante) ed all'affinamento delle tecniche chirurgiche, che ha ridotto drasticamente il numero di interventi necessariamente mutilanti. La storia naturale di questa neoplasia sovente porta alla formazione di m. polmonari (80%); anche in tali stadi, però, è giustificato un atteggiamento chirurgico aggressivo. La sola chemioterapia, infatti, pur basata su schemi collaudati (adriamicina + ifosfamide) è in grado di offrire solo risultati transitori e la quasi totalità dei pazienti muore entro due anni dalla scoperta delle m. polmonari. Attualmente, le localizzazioni da sarcoma osteogenico rappresentano una delle maggiori indicazioni alla metastasectomia polmonare: circa due terzi dei pazienti con malattia diffusa, infatti, è giudicato potenzialmente idoneo all'intervento chirurgico. Attualmente, infatti, la localizzazione multipla bilaterale e/o recidiva di per sé non costituisce controindicazione all'intervento, e giustifica un accesso sternotomico bilaterale a patto che vi sia un buon controllo della malattia primaria; Saltzman *et al.* (1993) riportano diversi casi in cui, in corso di un'unica toracotomia, sono stati asportati numerosi noduli metastatici; il laser Nd:YAG, secondo gli stessi AA., sembra garantire il rispetto dell'emostasi e la salvaguardia di un'adeguata riserva polmonare.

Il tasso di sopravvivenza a 5 anni, nelle casistiche più consistenti, varia dal 22 al 50%; tali risultati, una volta insperati, e la giovane età dei pazienti impongono che il giudizio di inoperabilità venga formulato con molta cautela. Il ruolo della chemioterapia nel trattamento integrato è attualmente oggetto di studi controllati (Roth *et al.*, 1995).

Altre metastasi operabili

Ogni altro organo, potenzialmente, può essere sede di m.

I criteri di selezione per i pazienti che possono avvalersi del trattamento chirurgico, dunque, devono essere applicati al singolo quadro clinico, anche se finora l'impiego della chirurgia per m. ad altre sedi è risultato occasionale e comunque poco redditizio in termini di sopravvivenza. Il trattamento chirurgico, comunque, non deve mai prescindere dal controllo della malattia nel sito primario e dalle condizioni generali del paziente, tranne nei casi in cui sia presente una sintomatologia non altrimenti controllabile ed in cui si renda necessario un trattamento chirurgico urgente.

Metastasi da melanoma

L'esempio tipico è rappresentato dalle m. gastro-intestinali da melanoma (3-4% dei casi) che sovente si presentano con

quadri ostruttivi, perforativi, emorragici. Il tratto più colpito è il tenue, ma non sono rare localizzazioni gastriche o coliche. Pur in presenza di malattia diffusa, in tali pazienti si rende necessario un trattamento chirurgico che, pur conservando i caratteri di palliazione, scongiura l'immediato pericolo di vita e risolve la sintomatologia (Karakousis *et al.*, 1994).

La sopravvivenza media dei pazienti affetti da melanoma ed operati per m. gastrointestinali sintomatiche è di circa un anno. In casistiche di pazienti selezionati e sottoposti ad intervento con intenti curativi, tuttavia la sopravvivenza a 5 anni è di circa il 19% (Karakousis *et al.*, 1994).

Metastasi surrenaliche

Negli ultimi anni la chirurgia sembra aver acquistato un ruolo importante nel trattamento delle m. surrenaliche da NSCLC. Studi autopsici hanno infatti dimostrato che il surrene, più del S.N.C., è il sito preferenziale delle metastasi che, al momento della stadiazione mediante TAC sono presenti in circa il 12% dei pazienti; nel 4% si tratta di lesioni uniche e resecabili.

Tali lesioni sono in genere asintomatiche; l'insufficienza surrenalica compare di rado e solo nei casi di una massiva sostituzione bilaterale da parte della neoplasia.

Dal momento che una percentuale oscillante tra il 2 ed il 7% della popolazione totale è portatrice di adenomi benigni surrenalici, particolare attenzione deve essere posta alla diagnostica differenziale il cui protocollo, al momento, è sufficientemente standardizzato e si avvale di ecografia, TAC e/o RMN, esame istologico su prelievo biotico percutaneo, angiografia, scintigrafia, dosaggi ormonali. L'osservazione della precoce comparsa delle m. surrenali nei tumori NSCLC, spiegata solo in parte dall'alto tropismo delle cellule neoplastiche polmonari per il surrene, e la pessima prognosi a distanza osservata nei pazienti non operati (meno del 6% di sopravvivenza a 5 anni nei gruppi sottoposti a radio-chemioterapia adiuvante) ha indotto recentemente ad un allargamento delle indicazioni chirurgiche: si riserva comunque l'intervento di adrenalectomia, combinato con l'exeresi del tumore primitivo o differito nel tempo, ai casi di lesione surrenalica unica, monolaterale, in pazienti con una stadiazione della neoplasia primitiva favorevole ed in buoni condizioni generali.

La sopravvivenza media finora osservata, seppur relativa a casistiche poco consistenti, è di 15-36 mesi; sono stati inoltre segnalati casi di sopravvivenza a 5 anni senza ripresa di malattia (Magilligan, 1987).

Dai dati finora disponibili, ed in attesa dei risultati degli studi controllati, sembra quindi scaturire che l'asportazione della m. surrenalica eventualmente preceduta da una chemioterapia di consolidamento, quando possibile, migliori in modo significativo la prognosi dei pazienti sia in termini di sopravvivenza globale che di guarigione.

Bibliografia

- Barr L. C., Skene A. I., Meirion J. Thomas, *Br. J. Surg.*, 1992, 79(12), 1268-1274.
- Deviri E., Schachner A., Halevy A., *Cancer*, 1983, 52, 1507-1521.
- Karakousis C. P., Velez A., Driscoll D. L., Takita H., *Surgery*, 1994, 3, 295-302.
- Kirsch A. J., Oz M. C., Stoopler M. *et al.*, *Urology*, 1993, 42, 716-719.
- Magilligan D. J., *Treatment of lung cancer metastatic to the brain*, in Martini N. ed., *The Surgical Clinics of North America*, vol. 5, 1987, Saunders, Philadelphia, pp. 1073-1080.
- Mariette D., Fagniez P. L., *Rev. Pat.*, 1992, 42, 1271-1275.
- McCormack P. M., Burt M. E., Bains M. S. *et al.*, *Arch Surg.*, 1992, 127, 1403-1406.
- Roth J. A., Beech D. J., Pollock R. E., *Treatment of the patient with lung metastases*, in *Current problems in Surgery*, November 1996.

METASTASI

- Rusch V. W., *Chest*, 1995, **107**, 322S-332S.
Saltzman D. A., Snyder C. L., Ferrell K. L. *et al.*, *Am. J. Surg.*, 1993, **166**, 543-547.
Schwartz S. I., *World J. Surg.*, 1995, **19**, 72-75.
Scheiner P. A., Brower S. T., *Treatment of metastatic cancer to the liver*, in *Seminars in liver disease*, 1994, **14**, 169-177.
Staudacher V., Veronesi U., Andreoni B., Costa A., *Manuale di oncologia chirurgica*, 3 ed., 1996, Masson editore, Milano.

AURELIO PICCIOCCHI E VENANZIO PORZIELLA

METEMOGLOBINA [v. vol. IX, coll. 1035-1037; Agg. I, coll. *5044-5046]

SOMMARIO

Aspetti generali (col. 3667). - **Emicromi ed emocromi** (col. 3667). - **Azione farmacologica della met-Hb⁺** (col. 3668). - **Determinazione della met-Hb⁺ mediante risonanza magnetica NMR** (col. 3669).

Aspetti generali

Il ferro dell'eme dell'emoglobina (Hb) (v. EMOGLOBINE [v. v.*; v.**]), fisiologicamente nella forma ferrosa (Fe(II)), va incontro ad una lenta ossidazione spontanea in presenza di O₂, dando luogo al derivato ferrico (Fe(III)), noto come metemoglobina (met-Hb⁺), che non è più in grado di legare reversibilmente l'O₂. Gli eritrociti contengono sistemi enzimatici con attività riducente (basati sul citocromo b₅ ed il NADH) noti come metemoglobina-riduttasi; la met-Hb⁺ può essere ridotta *in vitro* dal ditionito, dall'ascorbato e dal boroidruro.

La met-Hb⁺ si comporta come un indicatore di pH con un valore del pK_a pari a 8,1, presentando il colore marrone in ambiente acido e rosso in ambiente alcalino. Il cambiamento di colore è dovuto alla deprotonazione della molecola d'acqua legata al Fe(III) dell'eme per valori di pH > 8. Ovvero, in condizioni basiche, tale molecola d'acqua si dissocia cedendo un protone al solvente e lasciando l'ossidrile legato al Fe(III); si forma in tal modo il derivato idrossilato della met-Hb⁺, noto come met-Hb⁺OH⁻. Questo evento è accompagnato da una transizione dello stato elettronico del ferro da alto a basso *spin* (v. MATERIA, IX, 489), cioè da uno stato con più elettroni spaiati ad uno con meno elettroni spaiati. La molecola d'acqua può essere sostituita dal fluoro (F⁻), dal cianato (OCN⁻), dal tiocianato (SCN⁻), dallo ione azoturo (noto anche come azide, N₃⁻), dall'imidazolo e dal cianuro (CN⁻). Fra i leganti menzionati, lo ione CN⁻ presenta generalmente la maggiore affinità. La fluoro-metemoglobina (met-Hb⁺F⁻) si trova prevalentemente nello stato di alto *spin*, mentre la ciano-metemoglobina (met-Hb⁺CN⁻) nella forma pressoché pura di basso *spin*.

Anche un legante endogeno, come ad es. l'imidazolo dell'istidina distale (spesso indicata con la sigla HisE7), può coordinare il Fe(III) dell'eme della met-Hb⁺. Tale condizione strutturale rappresenta uno degli stati conformazionali fisiologici, caratterizzato da un tempo brevissimo di semivita, che fa parte della distribuzione dei sottostati normalmente popolati nell'Hb nativa. Peraltro, tale forma può assumere un carattere di stabilità che comporta notevoli alterazioni della geometria della tasca dell'eme. Tale derivato presenta il carattere di basso *spin*, è detto *emid* indica una precisa connotazione di stato denaturato.

Emicromi ed emocromi

Come conseguenza dell'invecchiamento, dell'ipossia, dell'ossidazione e delle mutazioni che destabilizzano la struttura nativa della proteina, l'Hb intracitocitaria può andare incontro ad un processo di denaturazione con la

conseguente formazione degli *emicromi*. Sebbene tale processo non sia stato completamente chiarito, i dati sperimentali disponibili possono essere descritti secondo il seguente meccanismo generale:



Pertanto, inizialmente l'Hb ossigenata (HbO₂) si ossida dando origine al derivato ferrico (met-Hb⁺); successivamente, riarrangiamenti strutturali possono condurre alla formazione di emicromi reversibili (rHmc) che, in condizioni favorevoli, sono in grado di trasformarsi nuovamente in met-Hb⁺, ma possono anche andare incontro alla denaturazione irreversibile dando luogo agli emicromi irreversibili (iHmc), che tendono ad aggregarsi ed a precipitare sul versante interno della membrana cellulare.

Il processo di denaturazione determina la formazione di varie specie di emicromi, quali il tipo bis-istidinico (così denominato in quanto la quinta e la sesta posizione di coordinazione del Fe(III) dell'eme sono occupate dai residui di istidina prossimale [F8] e distale [E7]) ed il tipo solfo-istidinico (in cui è il solfo del residuo Cys93 [F9] delle catene β che si lega al Fe(III) dell'eme come sesto legante di coordinazione). L'aggiunta del ditionito agli emicromi irreversibili determina la riduzione del Fe(III) dell'eme a Fe(II), con la produzione di composti a basso *spin* detti *emocromi*, senza ripristinare la HbO₂ in quanto i leganti del ferro nella quinta e sesta posizione di coordinazione rimangono gli stessi presenti degli emicromi.

Gli emicromi, precipitati sul versante interno della membrana eritrocitaria, copolimerizzano con il dominio citoplasmatico di un'importante proteina transmembrana, la Banda 3. Tale reazione è caratterizzata dalla comparsa di numerosi complessi formati dagli emicromi e molecole della Banda 3 che si raccolgono in fasci dando luogo ad un addensamento del dominio extracellulare della Banda 3. La reazione non si osserva se si fa interagire il dominio citoplasmatico della Banda 3 con i derivati non denaturati dell'Hb, quali la met-Hb⁺ e la HbCO.

Gli aggregati formati dagli emicromi irreversibili e dalla Banda 3, presenti negli eritrociti invecchiati ed in quelli dei soggetti affetti dalla β-talassemia, dall'anemia falciforme e da altri simili stati patologici, rappresentano soltanto l'1-1,5% di tutte le proteine della membrana eritrocitaria, ma nondimeno contengono oltre il 50% di tutte le IgG depositate sulla membrana stessa. Ciò implica che le IgG autologhe si leghino agli aggregati dei domini extracellulari della Banda 3 in quantità estremamente elevate (1000 volte superiori rispetto a quelle che si legano alla Banda 3 nello stato monomero). Pertanto, la redistribuzione della Banda 3 nella membrana eritrocitaria (indotta dagli emicromi precipitati) costituisce un segnale per il sistema immunitario, tale da promuovere l'opsonizzazione e quindi il riconoscimento e la rimozione di quegli eritrociti circolanti invecchiati o anormali da parte dei fagociti. Questi aggregati proteici sono tipici corpi di inclusione, noti come *corpi di Heinz*. La loro grandezza e composizione è molto simile nelle più diverse condizioni fisiologiche (quali, l'invecchiamento dell'eritrocita) e patologiche (quali, la β-talassemia).

Azione farmacologica della met-Hb⁺

Nell'avvelenamento da cianuro la produzione della met-Hb⁺, indotta da agenti chimici, può essere usata come antidoto, purché se l'intervento è tempestivo. Tale trattamento terapeutico consiste nell'iniezione endovenosa di una soluzione sterile di nitrito di sodio (0,3-0,5 g in 10-15 ml di acqua sterile, in 3-4 min) con la conseguente forma-

zione di un'alta concentrazione di met-Hb⁺ nel sistema circolatorio. La met-Hb⁺ così formata compete con il ferro allo stato ferrico (Fe(III)) dell'eme α_1 della citocromossidasi (Cyt⁺) per lo ione cianuro. Peraltro, il gradiente di concentrazione fra la met-Hb⁺ e la Cyt⁺ favorisce la formazione del complesso met-Hb⁺CN⁻ rispetto all'addotto Cyt⁺CN⁻. Superata la fase acuta, il trattamento terapeutico viene completato con la somministrazione di tiosolfato di sodio (Na₂S₂O₃) che reagisce con il cianuro per dare, in presenza dell'enzima solfotrasferasi, il tiocianato (SCN⁻), una sostanza poco tossica che è facilmente escreta con le urine. La dose di tiosolfato di sodio da somministrarsi per via endovenosa in circa 10 min è di 12,5 g in 50 ml di acqua. Il successo del trattamento dell'avvelenamento da cianuro con nitrito e tiosolfato è stato registrato di frequente.

Determinazione della met-Hb⁺ mediante rilassometria NMR

Generalmente, la percentuale della met-Hb⁺ intraeritrocitaria viene determinata con il metodo spettrofotometrico, previa trasformazione nel relativo derivato met-Hb⁺CN⁻. Recentemente è stato messo a punto un nuovo metodo per la determinazione della met-Hb⁺ basato sulla diversa suscettività magnetica della HbO₂ e della met-Hb⁺F⁻. Tale metodo consiste nella determinazione della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua del solvente (R_1) in presenza di un sistema paramagnetico, rappresentato dalla met-Hb⁺F⁻. In questo derivato dell'Hb il fluoruro (F⁻) è coordinato al Fe(III) dell'eme e forma due legami a idrogeno con l'istidina distale (E7) e con una molecola d'acqua. Quest'ultima può essere scambiata con l'acqua del solvente la cui rilassività risulta in tal modo perturbata.

La determinazione della concentrazione della met-Hb⁺ mediante rilassometria ¹H-NMR utilizza campioni di 50 µl di eritrociti emolizzati a cui viene aggiunto NaF per una concentrazione finale pari a 1 M: i valori del parametro R_1 sono poi determinati con uno strumento da banco. Poiché la velocità di rilassamento dell'acqua del solvente (R_1^{obs}) dipende in modo lineare dalla frazione molare della met-Hb⁺F⁻ e della HbO₂, la quota incognita della met-Hb⁺ può essere calcolata dalla seguente relazione:

$$\begin{aligned} \text{met-Hb}^+ (\%) &= \frac{100 \cdot (R_1^{obs} - R_{1HbO_2})}{(R_{1\text{met-Hb}} - R_{1HbO_2}) \cdot [Hb]} = \\ &= \frac{100 \cdot (R_1^{obs} - 0,422)}{(2,62 - 0,422) \cdot [Hb]} \end{aligned}$$

dove $R_{1\text{met-Hb}}$ è la rilassività (pari a 2,62 s⁻¹) di un campione di riferimento formato da una soluzione 1 mM di met-Hb⁺F⁻, R_{1HbO_2} è la rilassività (pari a 0,422 s⁻¹) di un campione di riferimento di HbO₂ di pari concentrazione, R_1^{obs} è la rilassività osservata e [Hb] è la concentrazione totale dell'emoglobina presente nel campione in esame. Il valore di R_1 della met-Hb⁺F⁻ è indipendente dalla temperatura e dal pH. Il metodo rilassometrico è più accurato di quello basato sulla spettroscopia di assorbimento e non prevede l'uso di sostanze particolarmente tossiche quali il cianuro.

Bibliografia

- Aime S., Dastrù W., Fasano M. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1993, **38**, 2401-2404.
 Aime S., Fasano M., Paoletti S. *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, 1995, **33**, 827-831.
 Amiconi G., Bertolini A., Matarese R. M. *et al.*, in Magnani M., De Flora A. eds., *Red Blood Cell Aging*, 1991, Plenum Press, New York, pp. 185-190.
 Bunn H. F., Forget B. G., *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, 1986, Saunders W. B., Philadelphia.
 Della Longa S., Amiconi G., Salah O. A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1294**, 72-76.
 Zijlstra W. G., Buurman A., *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 1685-1689.

GINO AMICONI, GIOVANNA BOUMIS, MAURO FASANO,
BRUNO GIARDINA, IRENE MESSANA E PAOLO ASCENZI

METILAZIONE [v. vol. IX, coll. 1056-1058]

SOMMARIO

La metilazione del DNA (col. 3670): *Introduzione*. - *La metilazione come modificazione protettiva del DNA*. - *La metilazione nel controllo della replicazione e della trascrizione del DNA*.

La metilazione del DNA

Introduzione

La metilazione delle molecole biologiche può essere considerata essenzialmente sotto due profili. Il primo, di tipo più specificamente biochimico, prende in considerazione le reazioni di trasferimento di gruppi metilici da molecole donatrici a molecole accettrici: queste ultime non necessariamente hanno a che fare con gli acidi nucleici (v. NUCLEICI ACIDI [v.; v.]) o con il DNA in particolare. Tali reazioni avvengono nel corso del metabolismo cellulare e possono consistere in eliminazioni così come in aggiunte di gruppi metile: numerose molecole, dalle funzioni biologiche più disparate, possono essere implicate in reazioni di trasferimento di gruppi metile (*transmetilazione* [v.]). La molecola donatrice principale è costituita dalla metionina, composto che media tutte le transmetilazioni; questo aminoacido solforato si unisce, in una reazione che richiede la presenza di magnesio e l'idrolisi di ATP, tramite l'atomo di solfo della catena laterale, al carbonio in posizione 5' della adenosina. Questo composto intermedio, noto come S-adenosilmetionina, è l'effettivo donatore di gruppi metilici. Nelle numerose e complesse reazioni intracellulari che portano alla biosintesi dei nucleotidi avvengono reazioni di transmetilazione delle basi puriniche che richiedono l'intervento della S-adenosilmetionina: la timina, ad es., si differenzia dall'uracile solo per la presenza di un gruppo metile (fig. 1).

Il secondo aspetto da considerare nella discussione della m. delle molecole biologiche è di tipo più strettamente molecolare. In questo caso si debbono esaminare i fenomeni che portano all'aggiunta di gruppi metilici su polimeri di DNA o di RNA. Nel primo caso la m. è ovviamente un evento post-replicativo mentre nel caso della m. dell'RNA la modifica è di tipo post-trascrizionale. La m. degli acidi nucleici avviene sia nei batteri che negli eucarioti: questa conservazione su scala evolutiva della m. delle basi azotate lascia supporre un ruolo assai importante di questa modificazione chimica nei meccanismi della funzione e dell'espressione genica. L'interesse della biologia molecolare si è concentrato negli ultimi anni proprio sullo studio di un possibile ruolo della m. nella replicazione e nel riparo del DNA, nel controllo dell'espressione genica e nel ruolo protettivo che essa può svolgere nei batteri. Questo ultimo aspetto, in particolare, è circoscritto al mondo procariotico.

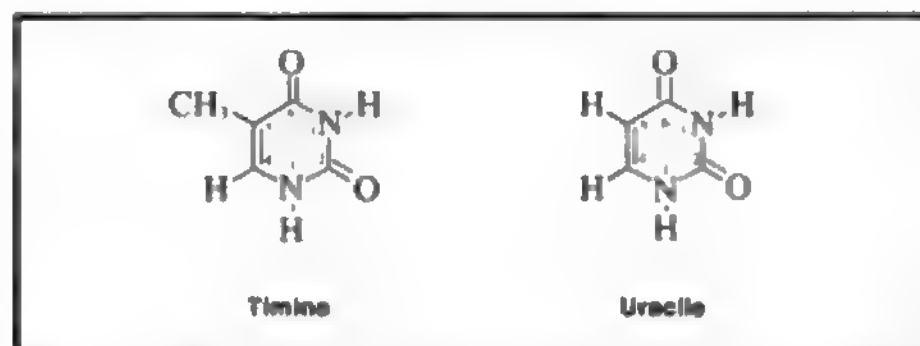


Fig. 1. La differenza tra timina (a sinistra) e uracile (a destra) consiste nella presenza nella timina di un gruppo metile sul carbonio in posizione 5.

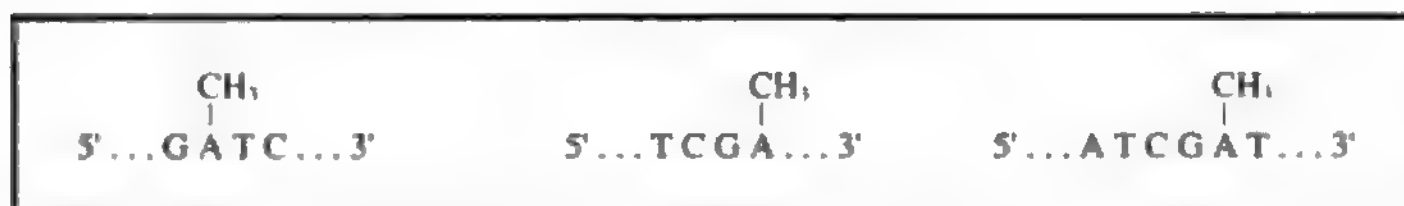


Fig. 2. Esempi di m. della base purinica adenina che inibiscono il «taglio» da parte dell'enzima di restrizione.

La metilazione come modificazione protettiva del DNA

Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi in grado di idrolizzare il legame 3'-5' fosfodiesterico che unisce i nucleotidi del DNA. Questi enzimi sono molto comuni nel mondo procariotico ed è interessante esaminare il possibile ruolo all'interno della cellula batterica. Da un punto di vista storico la definizione di «restrizione» data a questi enzimi deriva da osservazioni genetico-molecolari effettuate da S. Luria. Questo scienziato osservò che alcuni ceppi batterici presentavano una infettività «ristretta» nei confronti di un certo tipo di fago: essi erano in altre parole resistenti all'infezione. Dopo la scoperta degli enzimi di restrizione si comprese la base molecolare per questa infettività ristretta. Gli enzimi di restrizione prodotti dal batterio sono in grado di demolire il DNA del fago dopo il suo ingresso all'interno della cellula batterica. Naturalmente il batterio deve potere difendere il proprio DNA, sia esso cromosomale che plasmidico. Il sistema protettivo che si è evoluto nei batteri consiste nell'accoppiare all'enzima di restrizione una *metilasi* specifica che aggiunge gruppi metilici sui siti di riconoscimento degli enzimi di restrizione stessi e rende così il DNA batterico resistente all'idrolisi (fig. 2). Tra i sistemi di m. probabilmente meglio caratterizzati vanno citate la *dam*-metilasi, la *Taq* I-metilasi e la *Cla* I-metilasi, associate rispettivamente agli enzimi di restrizione di classe II *Eco*RI, *Taq*I e *Cla*I.

La *dam*-metilasi è anche coinvolta nella regolazione della replicazione (v. sotto) e del riparo del DNA in *Escherichia coli*, dunque la sua non è una funzione esclusivamente anti «restrizione»; inoltre, altri enzimi quali *Dpn* I scindono il DNA soltanto quando l'adenina presente nella sequenza GATC è metilata in posizione 6. Un'ultima considerazione da fare è che gli enzimi di restrizione, in termini assai generali, potrebbero rappresentare una specie di «sistema immunitario» molto semplice e rudimentale sviluppato dai batteri. In tal proposito, bisogna rilevare che al momento attuale non c'è evidenza di enzimi di restrizione nel mondo eucariotico.

La metilazione nel controllo della replicazione e della trascrizione del DNA

Nel batterio *Escherichia coli* la replicazione del DNA inizia da un unico sito di origine *ori*. La struttura minimale di *ori* è costituita da 245 coppie di basi contenenti 11 tratti ripetuti della sequenza GATC. Se l'adenina presente in questa sequenza è marcata su uno solo dei due filamenti del DNA, questo rappresenta il segnale molecolare che la doppia elica è di sintesi recente. Infatti, dopo breve tempo dal completamento del filamento neosintetizzato la *dam*-metilasi riconosce le sequenze stesse e aggiunge un gruppo metile sull'adenina presente nel nuovo filamento: quindi il DNA passa da uno stato emimetilato ad uno di m. completa. A questo punto *ori* si attiva e così inizia un nuovo ciclo replicativo. Questo modello è supportato da evidenze genetiche: infatti in ceppi di *Escherichia coli* mutanti per la *dam*-metilasi si ha l'accumulo di cromosomi emimetilati.

Per quanto riguarda il controllo della trascrizione, esistono evidenze che la m. è implicata nel controllo della replicazione e nella trascrizione del DNA, ma anche nel differenziamento cellulare. In particolare la m. della citosina in posizione 5, quando questa si trova nel dinucleotide CpG,

sembra svolgere un ruolo importante nel determinare lo stato differenziato di una cellula. Esistono comunque pareri discordi sull'importanza della m. della citosina e del suo ruolo nel differenziamento stesso. Anche per quanto riguarda l'espressione genica esistono evidenze sia a favore che contrarie al ruolo svolto dalla m. Ad es., sono stati pubblicati lavori in cui la demetilazione dei dinucleotidi CpG è stata correlata all'attivazione di geni posti nelle immediate vicinanze. In altri lavori è stato però dimostrato che il genoma del virus SV40 e quello del poliomavirus murino dopo essere stati completamente metilati *in vitro* sono comunque in grado di portare a termine un ciclo infettivo e dunque la loro funzionalità genetica non risulta alterata.

Lavori di recente pubblicazione suggeriscono anche che alterazioni nei livelli di m. del DNA potrebbero essere alla base della trasformazione tumorale. In realtà anche in questi lavori non si trovano dati completamente concordi e unitari: infatti, alcuni AA. sostengono che la ipometilazione è associata ad aumento dell'espressione genica. Altri invece sostengono che una variazione della m. può provocare una deaminazione spontanea della 5 metil-citosina a timina con il risultato di dare luogo a transizioni da C a T. In questo caso, dunque, la demetilazione non sarebbe direttamente cancerogena ma avrebbe piuttosto una funzione mutagenica. Risultati così controversi non sono in realtà che una ulteriore prova della complessità del genoma eucariotico in cui moltissimi fattori diversi agiscono in maniera sinergica per la completa funzionalità genetica della cellula e dell'organismo di cui questa fa parte.

Bibliografia

- Counts J. L., Goodman J. I., *Cell*, 1995, **83**, 13-15 e referenze ivi contenute.
 Lewin B., *Genes VI*, 1997, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio.
 Watson J. D. et al., *Biologia Molecolare del gene*, 1989, 4 ed., Zanichelli, Bologna.

GIANFRANCO RISULEO

METIONINA [v. vol. IX, coll. 1065-1069]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3672). - Agenti ossidanti di interesse biomedico (col. 3673). - Riduzione della solfossimetionina, Met(O), a metionina (col. 3674). - Aspetti funzionali (col. 3674).

Introduzione

La metionina è sensibile a molti agenti ossidanti che si producono in numerosi tipi cellulari o diffondono dall'ambiente esterno. La prima tappa del processo ossidativo della m. conduce alla formazione del derivato solfossido, Met(O), che poi può essere ulteriormente ossidato a solfone (fig. 1). La Met(O) si forma con una certa frequenza e facilità, mentre il solfone viene osservato raramente nei sistemi biologici.

Il processo ossidativo che porta alla comparsa della Met(O) è reversibile e la sua riduzione a m. può essere ottenuta sia con sistemi enzimatici sia con agenti chimici.

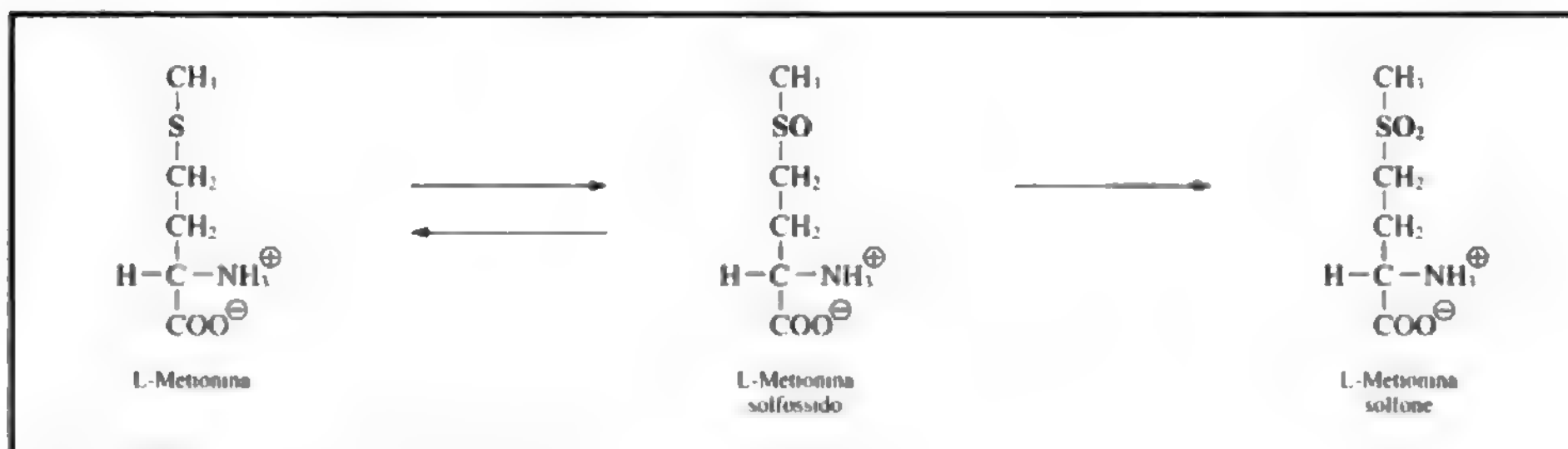


Fig. 1. M., m. solfossido e m. solfone (cfr. testo).

Il solfone invece è un derivato molto stabile e non riducibile in condizioni fisiologiche. I processi di ossidazione e di riduzione dei residui di m. permettono la modulazione dell'attività delle proteine e spesso sono correlati con l'invecchiamento molecolare e cellulare.

Agenti ossidanti d'interesse biomedico

Con l'eccezione del radicale anionico superossido ($O_2^{\cdot -}$), tutte le specie ossidanti (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]), quali perossido (O_2^{2-}), radicale ossidrilico ($HO^{\cdot}$), ione ipoclorito (OCl^-) e clorammine, che vengono prodotte nel corso dell'infiammazione dal sistema mieloperossidasi/ H_2O_2 /cloruro dei neutrofili e dei monociti (v. INFIAMMAZIONE*, *formazione dei radicali liberi dell'ossigeno*), sono in grado di trasformare la m. nella Met(O). La medesima reazione è catalizzata anche dalla cloroperossidasi presente negli eosinofili.

Tale trasformazione è favorita dagli ioni dei metalli di transizione (principalmente rame e ferro), che sono essenziali per la generazione del radicale ossidrilico a partire dal perossido, secondo la reazione:



(dove Me^{n+} è lo ione di un metallo di transizione). Peraltro, il perossido ossida direttamente la m. a Met(O) soltanto ad alte concentrazioni. Difficilmente gli ioni metallici si trovano liberi nei tessuti e nei fluidi biologici dove possono esercitare la loro attività catalitica che porta all'ossidazione della m. Ciò può accadere nel corso di danni tissutali o di stress ossidativi, in quanto gli ioni del ferro e del rame si possono liberare dalle proteine a cui sono normalmente legati per associarsi rapidamente ad altre macromolecole. A livello del nuovo sito di legame si genera un radicale ossidrilico che, per la sua elevata reattività e per il suo tempo di semivita molto breve, esercita il suo potere ossidante soltanto localmente. Se, nel nuovo sito di legame, è presente un residuo di m. questa si ossiderà preferibilmente rispetto ad altri aminoacidi per effetto della sua intrinseca elevata reattività.

Fra le clorammine generate dai polimorfonucleati quella più abbondante deriva dalla taurina (v.; v.**), una sostanza contenuta in grande quantità nei leucociti. Questa clorammina è più stabile e meno reattiva del radicale ossidrilico e dell'ipoclorito e pertanto può migrare in compartimenti biologici lontani dal suo sito di formazione, ove è in grado di catalizzare (in presenza di ioni metallici) la produzione della Met(O).

I neutrofili attivati, i macrofagi e le cellule endoteliali dei capillari generano, oltre al radicale anionico superossido

($O_2^{\cdot -}$), anche il monossido d'azoto (NO) (v. MONOSSIDO DI AZOTO**). Queste due specie chimiche si possono combinare per formare il perossinitrito ($ONOO^-$), un composto in grado di indurre la formazione della Met(O) a valori fisiologici di pH.

Riduzione della solfossimetionina, Met(O), a metionina

Sistemi enzimatici in grado di ridurre la Met(O) (detti solfossimetioninriduttasi) sono stati isolati in numerosi organismi, fra cui *Escherichia coli*, *Euglena gracilis*, *Tetrahymena pyriformis*, piante, vari tessuti del ratto, le cellule HeLa (v. COLTURE DI TESSUTI), il cristallino umano e bovino, i polmoni ed i leucociti umani. Tutte le solfossimetioninriduttasi utilizzano fisiologicamente come riducente la tioredossina ridotta, che *in vitro* può essere sostituita dal ditioneolitolo. Sono noti due tipi di enzimi: uno capace di ridurre la Met(O) libera (cioè non associata in un legame peptidico) e l'altro in grado di ridurre il residuo della Met(O) presente in peptidi e proteine.

Tra i migliori agenti chimici in grado di ridurre la Met(O) a m. si ricorda l'*N*-metilmercaptoacetamide, la cui attività altamente specifica è scarsamente influenzata dal pH.

Aspetti funzionali

L'ossidazione specifica di uno o più residui di m. in numerosi peptidi e proteine è stata riconosciuta come un importante principio regolatore, che include il controllo della chemiotassi, la modulazione delle vie metaboliche ed il riconoscimento di superfici proteiche. Si ritiene inoltre che l'ossidazione della m. svolga un ruolo rilevante nella patogenesi di alcune malattie, quali l'enfisema polmonare nei soggetti dediti al fumo, la cataratta e l'artrite reumatoide.

Dal punto di vista funzionale, l'ossidazione della m. a Met(O) può avere diverse conseguenze. Infatti, se la m. è presente sulla superficie di contatto tra due proteine o contribuisce alla formazione di un sito attivo (interagendo con altri gruppi a carattere idrofobico), la sua ossidazione conduce spesso alla diminuzione delle forze di legame ed alla inattivazione funzionale della proteina.

Un caso tipico è rappresentato dall'inibitore α_1 delle proteasi (α_1 -PI), una proteina appartenente alla famiglia delle serpine (v.; v. anche: PROTEASI, INIBITORI DELLE [v.*; v.**]) presente nel plasma sanguigno e nel liquido sinoviale, che rappresenta il più importante inibitore dell'elastasi. La conversione del residuo Met358 (che fa parte del sito reattivo dell' α_1 -PI) a Met(O) (per effetto, ad es., dei composti di natura aromatica presenti nel fumo delle sigarette e della più elevata temperatura dell'aria inspirata)

interferisce con la velocità di inibizione dell'elastasi, la cui vita media a concentrazioni fisiologiche dell' α_1 -PI aumenta da 0,64 ms a 1,3 s, in seguito alla formazione della Met(O). L'enzima ha così il tempo sufficiente per legarsi al tessuto connettivo, per il quale ha un'elevata affinità, ed idrolizzarlo. La capacità di digerire le fibre elastiche da parte dell'elastasi, non più inibita dall' α_1 -PI, può portare all'enfisema polmonare e a danni della cartilagine articolare. Tale meccanismo di inattivazione modula anche l'attività di ormoni (poli)peptidici e di altre proteine presenti nel torrente circolatorio.

In alcuni casi le attività delle macromolecole possono essere esaltate dall'ossidazione dei residui di m.. In tale ambito si ricorda il componente C5 del complemento la cui attivazione fisiologica consiste nell'idrolisi di un legame peptidico specifico con la conseguente liberazione di due frammenti polipeptidici: il C5a, che mostra attività anafilotossinica, ed il C5b che, in seguito all'attacco proteolitico, rende accessibile un sito di legame per il componente C6 del complemento. Recenti osservazioni *in vitro* hanno dimostrato che agenti ossidanti (quali l'ipoclorito e la taurina clorammina) determinano nel C5 l'esposizione del sito di interazione con il C6 senza che abbia luogo la liberazione del frammento C5a. Ciò è dovuto a una variazione conformazionale del C5 in seguito all'ossidazione a Met(O) di alcuni residui di m.. Così ossidato, il C5 è molto più suscettibile all'attacco di proteasi plasmatiche, quali la callicreina e la plasmina, di quanto non lo sia il C5 in forma nativa. Queste proteasi possono così indurre un'attività anafilotossinica liberando dal C5 ossidato frammenti simili al C5a ed in tal modo favorire le difese dell'organismo.

Alcune proteine, in particolare quelle caratterizzate da un tempo di vita medio molto lungo, vanno incontro alla formazione di Met(O) che si accumula per effetto del loro invecchiamento. Così, il livello della Met(O) presente nelle proteine del cristallino dell'occhio umano (un sistema privo di concentrazioni significative di enzimi proteolitici) aumenta con l'età andando dal 15% a 10 anni al 55% intorno agli 80 anni. In presenza di proteasi intracellulari, le proteine «vecchie», che presentano residui di Met(O) anziché di m., sono degradate più facilmente delle proteine «giovani».

Bibliografia

- Evans M. D., Pryor W. A., *Am. J. Physiol.*, 1994, **266**, L593-L611.
Fruttero R., Amiconi G., Ascoli F. et al., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1995, **35**, 861-874.
Rahman M. A., Brot N., Weissbach H., *Cell. Mol. Biol.*, 1992, **38**, 529-542.
Reddy V. Y., Desroches P. E., Pizzo S. V. et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 4683-4691.
Stadtman F. R., *Trends Biochem. Sci.*, 1986, **11**, 11-12.

GINO AMICONI, PAOLO ASCENZI E GIOVANNA BOUMIS

METRRORRAGIA [v. vol. IX, coll. 1090-1097]

SOMMARIO

Premessa sul trattamento medico e chirurgico (col. 3675). - **Trattamento medico (col. 3676).** - **Trattamento chirurgico (col. 3679):** Curettage. - Ablazione e riduzione endometriale. - Isterectomia laparoscopica. - Isterectomia vaginale celio-assistita. - **Indicazioni alla terapia delle menometrorragie (col. 3680)**

Premessa sul trattamento medico e chirurgico

La metrorragia è un problema medico comune; è stato valutato che circa 5 milioni di casi si risolvono ogni anno al medico di base per tale problema; le pazienti si lamentano di un flusso mestruale abbondante, con presenza di coaguli. Nel Regno Unito il 31% delle donne in età fertile

riporta un'eccessiva perdita di sangue e per tale motivo vengono eseguite ogni anno 672.000 prescrizioni mediche.

La fisiopatologia della m. è estremamente eterogenea: può essere causata da molteplici condizioni morbose (cfr. tab. I della voce METRRORRAGIA, X, 1091), da fibromi uterini, essere un segnale di iperplasia endometriale o comparire in pazienti sottoposte a terapia anticoagulante. In alcune situazioni, in cui non è possibile riconoscere una causa organica o chiaramente disfunzionale, viene impiegato il termine di m. «idiopatica».

Così come la fisiopatologia della m. è spesso poco chiara, altrettanto l'approccio terapeutico è spesso insoddisfacente sia in termini di risultati che come frequenza di effetti collaterali. Spesso un primo approccio medico alla m. può rivelarsi inefficace; tale insuccesso è generalmente considerato un'indicazione sufficiente per l'isterectomia. Ne deriva che in seguito a m. vengono sottoposte ad isterectomia nel Regno Unito e in U.S.A. rispettivamente 46.000 e 260.000 donne ogni anno.

La scelta di un trattamento medico e la valutazione della sua efficacia necessitano di criteri oggettivi; infatti la valutazione soggettiva delle donne sull'entità della loro perdita è spesso insufficiente. Si può quindi ricorrere ad una valutazione dell'emoglobina prima e dopo il trattamento; un altro strumento utile per rendere più obiettiva la valutazione della m. è rappresentato dall'impiego delle schede di flusso mestruale (fig. 1): su tali schede la paziente deve annotare, per ogni giorno di flusso, il numero di assorbenti impiegati disegnando una barretta verticale nella casella corrispondente all'assorbente utilizzato, che sia più simile alla quantità di flusso presente. Allo stesso modo vanno annotati il numero e le dimensioni di eventuali coaguli.

Trattamento medico

In donne con cicli anovulatori in cui si evidenzia un'iperplasia endometriale, quadro che si presenta spesso in premenopausa, il trattamento più diffuso consiste nella somministrazione di un *progestinico* (progesterone naturale, diidrogesterone, medrogestone, 17-idro-derivati, 19-nor-derivati). I progestinici, in dosi farmacologiche, hanno una potente azione anti-estrogenica, che si esplica attraverso la stimolazione della 17-beta-idrossi-steroido-deidrogenasi e della sulfotrasferasi che convertono il 17-beta-estradiolo in estrone solfato, nonché attraverso l'inibizione della sintesi dei recettori per gli estrogeni. I progestinici inoltre inibiscono la fosfolipasi A2 promuovendo la riduzione della sintesi delle prostaglandine.

Il progestinico va somministrato, in presenza di m., per 10-15 giorni in modo da ottenere una stabilizzazione endometriale, con l'induzione di un quadro di tipo predeciduale e con arresto del flusso. Al momento della sospensione del progestinico in maniera sincrona si avrà un sanguinamento da deprivazione che coinvolgerà l'endometrio, determinando come una sorta di «raschiamento chimico». Nella scelta del tipo di progestinico, il noretisterone acetato (che appartiene alla classe dei 19-nor-derivati) risulta efficace nel trattamento delle m. preclimateriche medio-gravi, mentre nelle forme più lievi può essere impiegato il medrossi-progesterone acetato che risulta avere un minor effetto sfavorevole sul metabolismo lipidico rispetto ai nor-derivati. Si possono anche utilizzare, in donne al di sotto dei 40 anni *associazioni estro-progestiniche*, preferendo quelle a prevalente clima progestinico: essi determinano una riduzione del flusso mestruale del 50%, ed una diminuzione della dismenorrea.

L'impiego dei contraccettivi orali e dei progestinici è sconsigliato, per l'aumentato rischio di patologie cardiovascolari.

ASSORBENTI ESTERNI				COAGULI	FLUSSO EMORRAGICO
1	III	II	I		E
2		III			
3	II	III		C=1 A=2	
4				Ax1 Bx2	
5					
6					
7					
8					

SCHEDA CAMPIONE
Per tenere traccia con cura quanto accade
prima di riempire la sua

A

B

C

ASSORBENTI ESTERNI				COAGULI	FLUSSO EMORRAGICO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

ASSORBENTI INTERNI				COAGULI	FLUSSO EMORRAGICO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

Fig. 1. Scheda di flusso mestruale. (Realizzata in collaborazione con il Prof. G. B. Serra, Ospedale Cristo Re, Roma).

Prima di iniziare la compilazione della scheda per il controllo delle perdite mestruali, si leggano bene le istruzioni e si prenda visione della scheda campione riportata in alto, a sinistra. Queste schede possono essere compilate utilizzando sia assorbenti esterni, che interni, purché i primi siano di misura «media» e i secondi di tipo «Super Plus». Le schede sono separate; se si fa uso di entrambi gli assorbenti, occorre compilare i due grafici.

Norme per la compilazione delle schede.

- Annotare la perdita di sangue disegnando una barretta verticale nella casella corrispondente all'assorbente utilizzato, che sia più simile per la quantità di sangue presente; questo per ogni assorbente cambiato ogni giorno del flusso mestruale.
- Quando in una casella si raggiungono 4 barrette (III), disegnare l'eventuale barretta successiva in senso obliquo sopra le altre (III).
- Se si osserva la presenza di coaguli di sangue sia sugli assorbenti che sulla carta igienica, annotarne il numero e le dimensioni. Per queste confrontare la grandezza dei coaguli con i simboli (A, B, C), riportati al lato a grandezza naturale.
- Nei giorni in cui si osserva una perdita di sangue come fosse un'emorragia si scriva una E nella casella corrispondente.

scolari, nelle donne fumatrici di età superiore ai 35 anni o in pazienti obese, e in donne con alterata funzionalità epatica (V. ANTICONCEZIONALI FARMACI [V.*; V.**]).

Un trattamento ormonale con *estrogeni ad alte dosi* (estrogeni coniugati [alla dose di 20 mg e.v.: Emopremarin® ogni 4 ore nelle prime 12 ore di trattamento]), etinilestradiolo, estradiolo valerato (Progynon®, 10 mg i.m.), può essere di primo impiego per il controllo di una menometrorragia imponente. In questi casi, poiché gran parte dell'endometrio è ormai desquamato, l'impiego del progestinico, infatti, non risulta efficace. Gli estrogeni, probabilmente favorendo l'emostasi a livelli dei vasi capillari, risultano invece risolutivi in questo tipo di sanguinamento.

Il *danazolo*, steroide sintetico ad attività antigonadotropica, progestativa e androgenica, determina una riduzione del flusso mestruale fino all'amenorrea, quando viene somministrato a dosi sufficientemente elevate (400 mg/die) per il trattamento dell'endometriosi. Studi condotti su donne

con metrorragia hanno dimostrato una riduzione delle perdite mestruali anche alla dose di 200 mg/die. Dockeray *et al.* (1994) riferiscono però che circa la metà delle pazienti trattate con danazolo interrompono il trattamento, ritenendo gli effetti collaterali superiori ai benefici in termini di riduzione del flusso.

Gli *analoghi del Gn-RH*, ad attività antigonadotropa e ipoestrogenizzante, sono in grado di produrre uno stato ipoestrogenico, transitorio e reversibile, equivalente ad uno stato menopausale, ma con valori di FSH ed LH non elevati; le formulazioni *depot* permettono una somministrazione periodica i.m. ogni 4 settimane, con una buona aderenza alla prescrizione (*compliance*) da parte delle pazienti. Tali farmaci vengono impiegati nella terapia medica dei fibromi uterini, con lo scopo sia di ottenerne una riduzione volumetrica che una riduzione nella quantità di flusso mestruale. Spesso in epoca perimenopausale possono comparire irregolarità del ciclo che, oltre a causare disagio nella

donna, possono determinare l'instaurarsi di uno stato anemico. In questi casi può essere proposto tale trattamento, magari transitorio, per interrompere la sintomatologia o per recuperare migliori condizioni fisiche in previsione di un intervento chirurgico.

Farmaci induttori dell'ovulazione sono indicati nei casi di metrorragie disfunzionali anovulatorie in pazienti che desiderino una gravidanza.

Un trattamento sintomatico, con *farmaci emostatici e antifibrinolitici* quali l'ac. tranexamico (4-6 g/die per 3 giorni) e l'ac. ε-aminocaproico (3 mg/die per 3 giorni) risulta efficace, da solo o in associazione a terapie ormonali, nel trattamento di m. disfunzionali in pazienti con cicli ovulatori, riducendo di circa il 50% i flussi emorragici (perdite > 80 ml). Ma trattamenti a lungo termine sono controindicati per il rischio di indurre una trombosi e non ben tollerati per l'elevata frequenza di effetti collaterali aspecifici, come ad es. nausea e disturbi gastrici.

Farmaci antiprostaglandinici, quali l'acido mefenamico (500 mg 3 volte al dì), naproxene (750 mg/die per 3 giorni seguiti poi da 250 mg/die per 5 giorni), ibuprofene (400 mg ogni 6 ore) determinano una riduzione del flusso dal 20 al 50%. Essi agiscono sulle prostaglandine intrauterine aumentando il livello di trombossano A₂, con conseguente vaso-costrizione e aumento dell'aggregazione piastrinica. Il trattamento dovrebbe essere iniziato il primo giorno del flusso mestruale e continuato per tutto il ciclo; sono anche efficaci nel ridurre la dismenorrea. Le pazienti con m. secondaria a fibromi uterini non rispondono a tale trattamento.

Trattamento chirurgico

Viene distinto in *trattamento conservativo* [1) curettage della cavità uterina; 2) ablazione endometriale con elettroresettore o con laser; 3) riduzione endometriale; 4) ablazione endometriale termica] e *trattamento demolitivo* [1) isterectomia laparotomica; 2) isterectomia laparoscopica; 3) isterectomia vaginale; 4) isterectomia vaginale celio-assistita].

Curettage

Di impiego oggi più limitato, rappresenta un primo intervento di urgenza in caso di emorragia massiva mediante asportazione della mucosa endometriale. Recentemente non viene effettuato più a scopo terapeutico ma per fornire materiale per diagnosi istologica.

Ablazione e riduzione endometriale

La differenza dei due trattamenti sta nella rimozione o meno della porzione istmica dell'endometrio. Le pazienti trattate con ablazione completa dell'endometrio vanno incontro ad amenorrea per scomparsa della mucosa e sintesi aderenziale della cavità uterina. Le pazienti trattate con riduzione endometriale e conservazione del colletto endometriale istmico vanno incontro a normalizzazione del flusso mestruale o ipomenorrea. Entrambi i trattamenti possono essere eseguiti con l'impiego dell'elettroresettore o del laser a CO₂. Con quest'ultima tecnica si ottiene la vaporizzazione dell'endometrio con esclusione della possibilità di un esame istologico del materiale endometriale. Entrambe le tecniche prevedono l'asportazione completa della mucosa endometriale, compreso lo strato basale, fino al piano muscolare. La metodica si presenta di facile esecuzione e gravata da scarsa morbosità. Complicazioni sono presenti in circa il 3% dei casi e sono rappresentate da emorragie massive, perforazione uterina e intravasazione con assorbimento massivo di liquidi.

La selezione delle pazienti deve essere accurata e prevede l'esclusione della patologia organica e l'insuccesso

delle terapie mediche. I risultati ottenuti sono incoraggianti poiché solo il 25% circa delle pazienti ha una recidiva della menorragia dopo il primo trattamento mentre soltanto il 3% delle pazienti trattate deve essere sottoposto ad una successiva isterectomia.

Recentemente è stata proposta una nuova tecnica di ablazione endometriale mediante l'impiego di un palloncino termico endouterino. Si tratta di una metodica che necessita di ulteriori valutazioni in quanto non supportata da sufficienti dati clinici controllati.

Isterectomia laparoscopica

L'impiego della via laparoscopica nell'esecuzione della isterectomia prevede due opzioni, l'isterectomia totale laparoscopica e l'isterectomia subtotale sopracervicale laparoscopica (v. LAPAROSCOPIA CHIRURGICA GINECOLOGICA**). L'indicazione e la tecnica chirurgica sono gli stessi dell'intervento classico laparotomico con il vantaggio di ridotti tempi di degenza (1-2 giorni), le minori complicazioni e la ripresa funzionale più rapida. Tuttavia l'intervento ha una durata mediamente superiore a quello laparotomico. L'estrazione dell'utero attraverso la parete addominale è possibile mediante un morcellatore manuale o elettrico. Attualmente, la tecnica laparoscopica per l'esecuzione di una isterectomia non è considerata un intervento elettivo; in particolare la tecnica subtotale con conservazione del collo uterino e con asportazione dell'endocollo suscita perplessità a fronte di vantaggi, ancora non dimostrati, sul tempo operatorio e sulla statica pelvica.

Isterectomia vaginale celio-assistita

Al contrario dell'isterectomia totale laparoscopica, la tecnica che abbina un primo tempo laparoscopico esplorativo e operativo ad un secondo tempo operativo vaginale sembra più proponibile. Il suo razionale è quello di convertire alla via chirurgica vaginale quelle isterectomie precedentemente selezionate per la via addominale, con indubbi vantaggi associati alla isterectomia vaginale. Mancano tuttavia dati controllati che confermino le potenzialità di questo tipo di intervento.

Indicazioni alla terapia delle menometrorragie

Nel periodo peripuberale: contrastare le problematiche disfunzionali responsabili delle menometrorragie del periodo puberale rappresentate dalla anovularietà, la disovularietà con assenza o insufficienza luteinica mediante la somministrazione ciclica di progesterone, di trattamenti sequenziali o associazioni estro-progestiniche. In alcuni casi è utile istituire una amenorrea terapeutica mediante la somministrazione continua di un progestinico. Una soluzione chirurgica è da escludere se non in caso di emorragie resistenti ai diversi trattamenti medici.

Nel periodo dell'attività riproduttiva: se la paziente non ha desiderio di prole si ricorre all'uso di progestinici o associazioni estro-progestiniche per correggere le turbe dell'ovulazione, dell'iperestrogenismo e dell'iperplasia endometriale documentata con una isteroscopia ed eventualmente con una biopsia dell'endometrio. Se la paziente ha desiderio di prole, in presenza di una fase luteale breve (< 10 giorni), si ricorre agli induttori dell'ovulazione o ad altra terapia etiologica ormonale a seconda della diagnosi. Un trattamento medico più radicale a base di danazolo o analoghi del GnRH è attuabile nel tentativo di evitare procedure chirurgiche più invasive.

Nel periodo perimenopausale: il quadro prevalente di iperestrogenismo relativo di questo periodo della vita della donna consente di somministrare con buoni risultati nel breve periodo di trattamento ad attività antigonadotropa e

antiestrogenica (derivati del nor-pregnano). Più raramente si useranno i derivati del 19-nortestosterone. Nel caso di insuccesso del trattamento medico è proponibile la resezione endometriale isteroscopica transcervicale, che risulta efficace in assenza di patologia organica definita. Tale trattamento è sicuramente da preferire alla isterectomia nei casi di pazienti con problemi medici generali e in precarie condizioni di salute oppure in pazienti che desiderano conservare la loro integrità anatomica, e può essere ripetuto successivamente nel caso di una recidiva della sintomatologia metrorragica. L'intervento chirurgico demolitore va effettuato nei casi di recidiva intrattabile.

Nel periodo postmenopausale: è d'obbligo effettuare un esame istologico tramite isteroscopia o curettage della cavità uterina. In base all'esito dell'esame istologico si potrà decidere tra un trattamento conservativo, medico (progestinici o terapia combinata sostitutiva) o chirurgico (endometriectomia), e un trattamento demolitivo (isterectomia).

Bibliografia

- Canis M., Mage G., Chapron C. et al., *Surg. Endosc.*, 1993, 7, 42.
 Chapron C., Aubert V., Dubuisson J. B., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 170, 1210.
 Chapron C., Aubert V., Dubuisson J. B., *Contracept. Fert. Sex.*, 1995, 23, 686-691.
 Dockeray C. J., Sheppard B. L., Bonnar J., *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 170, 1220.
 Donnez J., Nisolle M. J., *Gynecol. Surg.*, 1993, 9, 91-94.
 Genazzani A. R. ed., *Le menometrorragie ed i sanguinamenti uterini patologici*, in *Aggiornamento permanente in ostetricia e ginecologia*, vol. I, aprile 1997, Pacini editore, Pisa.
 MacDonald R., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1990, 97, 3.
 Neuwirth R. S., Duran A. A., Singer A. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1994, 83 (5), 792-796.
 Nezhat C., Bess D., Admon D. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1994, 83, 713-716.
 Reich H., McGlynn F., Sekel L., *Gynaecol. Endocrinol.*, 1993, 2, 59-63.
 Serra G. B., Panetta V., Fanfani R. et al., *Use and long-term effectiveness of gonadotropin releasing hormone agonists in patients with persistent menorrhagia*, in Montemagno U. et al. eds., *Neuroendocrinology of Female Reproductive Function*, 1992, Parthenon Publishing Group, New York, pp. 197-205.
 Singer A., Almanza R., Gutierrez A., Haber G., Bolduc L. R., Neuwirth R., *Obstet. Gynecol.*, 1994, 83 (5), 732-734.
 Wathen P. I., Mark C., Henderson, Witz A., Craig, *Med. Clin. North America*, 1995, 79-2, 329-341.

PAOLA MANNA, ROBERTO FANFANI E
GIOVAN BATTISTA SERRA

MICOBATTERIOSI: V. MICOBATTERIOSI (IX, 1124-1130); MICOBATTERIOSI*, *micobatteriosi e AIDS* (*5061-5063); MYCOBACTERIUM GENERE (IX, 2313-2323); MYCOBACTERIUM GENERE**: TUBERCOLOSI, *micobatteriosi* (XV, 668-672); TUBERCOLOSI**.

MICOSI FUNGOIDE: V. MICOSI FUNGOIDE (IX, 1168-1179); LINFOMI** (coll. **3282-3284; **3401-3407).

MICROSPORIDIOSI [v. Agg. I, coll. *5115-5119]

SOMMARIO

Generalità (col. 3681). - **Caratteristiche dei diversi microsporidi dell'uomo** (col. 3682). - **Quadro clinico** (col. 3684). - **Diagnosi** (col. 3685). - **Terapia** (col. 3686).

Generalità

La costante descrizione di nuovi microsporidi, parassiti dei più diversi invertebrati e vertebrati, ha portato, attualmente, alla classificazione di circa 1000 specie, raggruppate in quasi 100 generi.

In campo medico, negli ultimissimi anni, si è assistito ad un costante incremento delle segnalazioni di casi di micro-

sporidiosi [m.], quasi esclusivamente in soggetti affetti da AIDS, e ciò presumibilmente in relazione al diffondersi dell'infezione da HIV che evidenzia, tra l'altro, il tipico carattere di patogeni opportunisti espresso da questi parassiti endocellulari.

Le specie, sino ad oggi, individuate nell'uomo appartengono ai generi *Enterocytozoon*, *Septata*, *Encephalitozoon*, *Nosema* e *Pleistophora*; in particolare *Enterocytozoon bienersi* e *Septata intestinalis* sono responsabili, sostanzialmente, di forme di m. intestinale, mentre *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* e *Nosema corneum* (1 caso) di quadri di m. oculare; *Nosema connori* è invece stata riscontrata una sola volta in un bimbo di 4 mesi affetto da aplasia timica, come agente di m. diffusa (oltre che nell'intestino, era presente in cellule del fegato, polmone, miocardio, rene, etc.), mentre una specie non identificata del genere *Pleistophora* è stata descritta in un unico paziente, come responsabile di m. muscolare.

Caratteristiche dei diversi microsporidi dell'uomo

Enterocytozoon bienersi (v. fig. 4, col. *5118, Agg. I), descritta per la prima volta nel 1985, con gli oltre 100 casi riportati in letteratura, risulta la specie più segnalata: ha una diffusione cosmopolita ed è stata riscontrata esclusivamente in soggetti affetti da AIDS; la sua presenza causa l'insorgere di diarrea cronica, perdita di peso e grave deperimento. Considerando che, in questo tipo di pazienti, oltre il 50% dei casi di diarrea non viene diagnosticato, è presumibile che l'effettiva diffusione del parassita sia molto più elevata; su questa base, alcuni AA. sostengono, infatti, che oltre il 25% di queste sindromi sia legato alla presenza di *E. bienersi*, per lo più non individuato a causa della difficoltà di riconoscimento legata alle sue esigue dimensioni e al non utilizzo di adeguate tecniche diagnostiche. Il parassita vive negli enterociti del duodeno e del digiuno, prevalentemente nella porzione apicale dei villi, disponendosi, in genere, al di sopra del nucleo, nel citoplasma prospiciente il lume intestinale, ma, recentemente, è stato riscontrato anche nelle cellule dei dotti biliari e dell'epitelio della cistifellea. Le fasi riproduttive portano alla formazione in successione di meronti, sporonti, sporoblasti e spore, tra loro più o meno aggregati e a diretto contatto con il citoplasma della cellula ospite.

Septata intestinalis è l'ultima specie identificata, essendo stata descritta per la prima volta solo nel 1993, in U.S.A., in 5 pazienti colpiti da AIDS e affetti da sindrome diarroica. Si localizza negli stessi distretti intestinali colonizzati da *E. bienersi*, ma, oltre che negli enterociti, si riproduce anche nei macrofagi (più spesso), nei fibroblasti e nelle cellule endoteliali della lamina propria; occasionalmente è stata riscontrata anche nei macrofagi e nelle cellule epiteliali della cistifellea (1 caso) e nelle cellule dei tubuli renali (2 casi), per cui non è da escludere una sua possibile veicolazione anche in altri organi.

Le diverse fasi riproduttive vengono completate all'interno di un vacuolo parassitario, per cui, differentemente da quanto accade ad *E. bienersi*, i vari stadi di maturazione risultano del tutto isolati nel citoplasma della cellula ospite. Un ulteriore elemento differenziale, da cui deriva il nome del genere, si riscontra anche nella struttura del vacuolo parassitario che appare «settato» per la presenza di materiale fibrillare secreto dagli sporonti e dagli sporoblasti; questi, unitamente alle spore, si vengono a trovare distanziati tra loro, all'interno di una struttura a nido d'ape, in cui ogni «cella» è occupata da una singola forma parassitaria (fig. 1). Non essendo lo sviluppo sincrono, nel vacuolo si possono individuare i diversi stadi di sviluppo del parassita, con le spore disposte in genere nella parte più centrale e le forme più giovani ammassate in periferia.

Encephalitozoon cuniculi (v. fig. 3, col. *5117, Agg. I) ed *E. hellem*, sono specie responsabili, prevalentemente, di infezioni oculari: sono state individuate all'interno di cellule di tessuto corneale e delle congiuntive oculari, rispettivamente in 8 e 11 pazienti colpiti da AIDS e affetti da cherato-congiuntivite. *E. cuniculi* è stato anche segnalato come causa di epatite e di peritonite (2 casi distinti), mentre, *E. hellem* è stato associato anche a forme di sinusite (1 caso) e disseminato nei tratti tracheobronchiale e urinario, all'in-

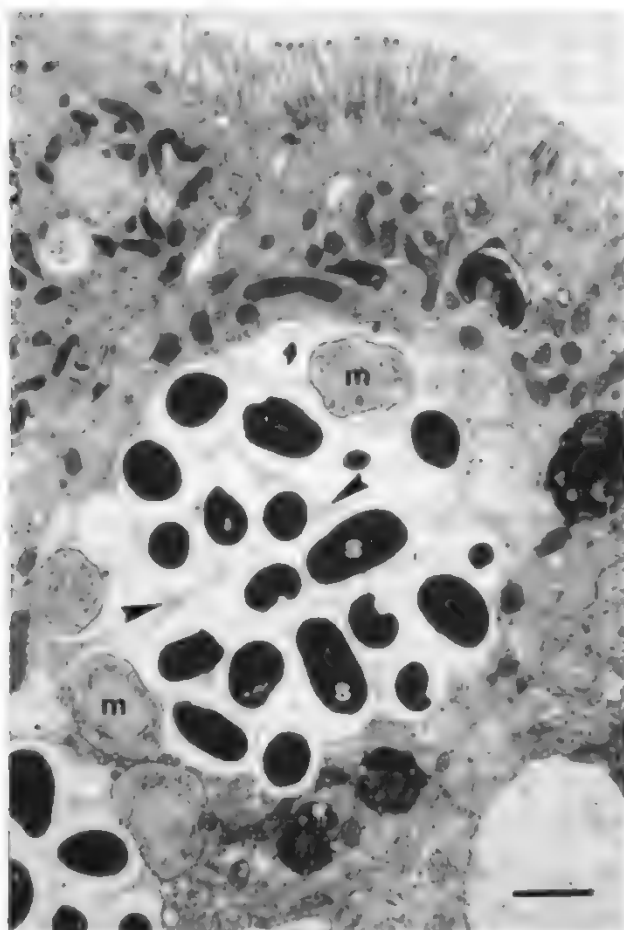


Fig. 1. *M. intestinale*: enterocita colonizzato da *Septata intestinalis*, osservato al microscopio elettronico; meronti (m), sporonti e spore (s) sono stipati all'interno di un vacuolo parassitofo «settato» (frecche) (7600 $\times$; barra = 1,3 μ m). (Da Scully et al., 1993, per gentile concessione).

terno di cellule epiteliali e di macrofagi (1 caso); tale quadro è di un certo interesse in quanto, ancora una volta, permette di evidenziare la possibilità di una veicolazione dei parassiti anche in distretti diversi da quello d'elezione. Le varie forme, in diverso grado

di maturazione, analogamente a quanto descritto per *S. intestinalis*, si dispongono all'interno di un vacuolo parassitofo, ma, in questo caso, si ritrovano ammassate, a stretto contatto le une con le altre per la mancanza di qualsiasi tipo di settatura interna alla struttura (fig. 3 dell'Agg. I). Le due specie sono indistinguibili su base ultrastrutturale e presentano le stesse modalità di sviluppo, tuttavia, in tempi recenti, si è resa possibile una loro differenziazione su base antigenica, mediante indagini di tipo immunologico; il fatto che l'utilizzo di tali tecniche abbia permesso di individuare solo nuove infezioni da *E. hellem*, fa ragionevolmente supporre che questo sia il vero agente, responsabile anche delle infezioni segnalate in precedenza ed attribuite forse erroneamente a *E. cunicoli*.

Tra gli agenti di *m. oculare* va ancora ricordata *Nosema corneum*, che, differentemente dalle specie del genere *Encephalitozoon*, si localizza in profondità, nello spessore dello stroma corneale. Insieme a *N. connori* presenta tutti gli stadi di sviluppo binucleati e sempre a diretto contatto con il citoplasma della cellula ospite.

Le forme del genere *Pleistophora*, infine, formano plasmodi con nuclei arrotondati e secernono materiale che forma una spessa «membrana pansporoblastica» in grado di isolare i microsporidi dal citoplasma della cellula colonizzata.

Un quadro schematico dei caratteri differenziali delle diverse specie parassite dell'uomo è riportato in tab. I.

Quadro clinico

Nel corso di infezioni intestinali, sia *Encephalitozoon bienersi* che *Septata intestinalis* manifestano lo stesso grado di virulenza, provocano lo stesso tipo di lesioni tessutali e, di conseguenza, causano un quadro sintomatologico del tutto simile. L'esame micro-, e sub-microscopico delle biopsie evidenzia iperplasia delle cripte, appiattimento e atrofia dei villi, degenerazione e distruzione degli enterociti colonizzati, anche in vaste aree della mucosa, che in genere risulta infiammata e congesta. Il quadro clinico che ne deriva risulta molto simile a quello riscontrabile nel corso di altre infezioni opportunistiche come la criptosporidiosi (v.*) o l'isosporidiosi: il sintomo dominante è infatti rappresentato dalla diarrea ricorrente e remittente, tendente a cronicizzare anche per diversi mesi, caratterizzata da emissione di feci liquide, non mucose, non emorragiche, contenenti, talora, cibo non digerito; in relazione al numero di scariche giornaliere (4-8), si può avere grave perdita di liquidi accompagnata da squilibrio elettrolitico; alla diarrea spesso si associa nausea, anoressia e malassorbimento, con conseguente grave deperimento e perdita di peso (0,5-1 kg/settimana); non si riscontrano, in genere, febbre e splenomegalia. Sembra che la somministrazione di farmaci antisecretori unitamente all'eliminazione dei grassi dalla dieta e alla semplice assunzione di carboidrati permettano di ridurre o contenere la gravità del quadro.

In relazione alla loro possibile localizzazione extra-inte-

TAB. I. MICROSPORIDI PARASSITI DELL'UOMO

Genere	Distretto d'elezione*	Modalità di riproduzione	Presenza vacuolo parassitofo	Dimensioni spore (μ m)	N° medio spire del tubulo polare
<i>Enterocytozoon</i>	Intestino tenue	Merogonia e sporogonia	NO	0,8 $\times$ 1,5	6 (su 2 file)
<i>Septata</i>	Intestino tenue	Merogonia e sporogonia	SI (settato)	1,2 $\times$ 2	6 (su 1 fila)
<i>Encephalitozoon</i>	Occhio	Scissione binaria	SI (non settato)	1 $\times$ 2	5-6 (su 1 fila)
<i>Nosema</i>	Occhio	Scissione binaria	NO	1-2 $\times$ 2-4	6 (su 1 fila)
<i>Pleistophora</i>	Sistema scheletrico	Merogonia e sporogonia	SI* (non settato)	2,5 $\times$ 3,5	11

* Alcune infezioni da *Encephalitozoon* possono presentare casi con disseminazione dei parassiti in altri organi.

* Presenza di una parete secreta dal parassito.

stinale, *E. bienewisi* è stato considerato responsabile anche dell'insorgere di quadri di colangite e *S. intestinalis* di colecistite acalcolotica e nefrite tubulo-interstiziale.

Nelle *m. oculari* provocate da *Encephalitozoon cuniculi* e *E. hellem* l'infezione si limita alle cellule dell'epitelio corneale e congiuntivale, mentre in quelle causate da *Nosema corneum* si evidenzia, più frequentemente, interessamento, talora ulcera, dello stroma corneale. Il quadro è dominato da cherato-congiuntivite, a cui si può associare iperemia congiuntivale, fotofobia, sensazione da corpo estraneo, infiltrato ed erosione a carico dell'epitelio corneale.

Diagnosi

La diagnosi di *m.* è sostanzialmente di tipo diretto e si basa sull'identificazione, mediante l'ausilio del microscopio ottico ed elettronico, delle diverse forme endocellulari dei parassiti (sporonti, sporoblasti, e soprattutto spore) eventualmente presenti nei frammenti biotici prelevati dall'organo colpito. Lo studio ultrastrutturale diviene indispensabile nel caso si voglia giungere ad una diagnosi di specie: soltanto questo, infatti, è in grado di evidenziare caratteri differenziali, come l'organizzazione dei diversi stadi di maturazione dei parassiti, la presenza o meno di un vacuolo parassitoforo nella cellula ospite, le dimensioni esatte delle spore o il numero di spire del tubulo polare presente al loro interno (tab. I). Per la semplice individuazione dei microsporidi può, tuttavia, risultare sufficiente anche l'osservazione al microscopio ottico di campioni inclusi in resina, dopo colorazione delle sezioni semifine con blu di metilene ed Azur II, seguita da colorazione con fucsina basica o blu di toluidina; di più difficile interpretazione risulta, invece, lo studio di preparati inclusi in paraffina, colorati con tecniche diverse quali ematossilina-eosina, Giemsa, Gram, Brown-Hopp, PAS, metenamina-argento, etc.

La *m. intestinale* dovrebbe essere sospettata in tutti i pazienti affetti da AIDS con manifesta diarrea cronica, perdita di peso e malassorbimento intestinale. Nei soggetti colpiti, i microsporidi si possono facilmente ritrovare in biopsie ottenute dalla porzione distale del duodeno o dalla prima parte del digiuno mentre sono per lo più assenti in frammenti di tessuto prelevati dallo stomaco, dal colon e dal retto. Spore parassitarie possono, comunque, essere individuate direttamente in strisci ottenuti da campioni di feci, essendo queste grampositive (in tutti i microsporidi) e in possesso, anteriormente, di un granulo PAS-positivo; la loro presenza si evidenzia anche in seguito a colorazione degli strisci con blu di metilene — azzurro II — fucsina basica, con il Giemsa o con coloranti del tipo Romanowsky o mediante l'uso della tecnica di colorazione tricromica di Ziehl-Neelsen per acido resistenti; in relazione alle esigue dimensioni, la loro identificazione richiede comunque notevole abilità ed esperienza, per cui è sempre consigliabile l'inclusione in resina del materiale fecale e la sua successiva osservazione a livello ottico ed ultrastrutturale.

Il sospetto di *m. oculare* e la relativa ricerca di parassiti dovrebbe, invece, essere attuata in tutti i pazienti affetti da AIDS che evidenziano sintomi oculari a livello di cornea o congiuntiva. In questi casi l'identificazione delle spore può essere attuata seguendo le tecniche già descritte, dopo osservazione micro- e submicroscopica di campioni di cellule epiteliali raccolte in seguito a raschiamento delle congiuntive palpebrali.

Ancora assai esiguo risulta invece l'utilizzo di tecniche immunodiagnostiche; *E. cuniculi*, in particolare, è l'unica specie per la quale siano disponibili test (ELISA, CIA, immunofluorescenza indiretta), dei quali, peraltro, non sono ben definite né la specificità né la sensibilità e l'eventuale possibilità di cross-reazione con altre specie di microsporidi.

Terapia

Allo stato attuale, non si dispone ancora di farmaci completamente efficaci nel trattamento delle diverse forme di *m.* e l'uso, spesse volte empirico, delle più diverse molecole ha dato, sino ad ora, risultati assai deludenti.

Tra i farmaci provati, l'*albendazolo*, somministrato per via orale nella dose di 400 mg/2 volte al dì, si è dimostrato il più efficace nel trattamento della *m. intestinale* causata da *S. intestinalis*; questa molecola favorisce una riduzione o addirittura una risoluzione della sindrome diarroica anche per alcuni mesi, nonché l'arresto e il recupero della perdita di peso e il ripristino del senso di benessere del paziente ma non è in grado di risolvere in modo definitivo l'infezione; in seguito alla sospensione del trattamento, si osserva, infatti, il ripristino della sindrome con nuova eliminazione di feci liquide, contenenti altre spore parassitarie. L'esame istopatologico di biopsie effettuato dopo il trattamento, evidenzia solo un apparente arresto della moltiplicazione dei microsporidi associato peraltro ad una loro marcata degenerazione, mettendo così in risalto soltanto una capacità parasitostatica del farmaco, probabilmente legata alla sua azione inibitrice della formazione dei microtubuli presenti nelle cellule parassitarie.

Il *metronidazolo*, somministrato in dosi giornaliere di 1,5 g, ha invece evidenziato una certa efficacia nei confronti di *E. bienewisi*; anche in questo caso il farmaco riesce a ridurre o risolvere temporaneamente la sindrome diarroica, ma non è in grado di debellare l'infezione.

Nelle forme di *m. oculare* da *E. hellem*, infine, la sperimentazione ha individuato negli antibiotici *fumagillina* (70 µg/ml ottenuti dal Fumidil B) e nella *propamidina isetionato* (0,1%) molecole efficaci nel favorire una marcata remissione dei sintomi e una notevole riduzione delle manifestazioni cliniche, anche dopo pochi giorni di trattamento, ma, ancora una volta, non idonee a risolvere totalmente l'infezione. Un'azione del tutto simile è stata evidenziata anche per l'*itraconazolo*, farmaco orale dotato di attività antifungina, efficace nel trattamento delle ulcere corneali causate da *Acanthamoeba*.

Bibliografia

- Bryan R. T., Cali A., Owen R. L., Spencer H. C., *Progress in Clinical Parasitology*, vol. II, 1990, 1-26, Field & Wood, Philadelphia.
Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M., 1993, *J. Euk. Microbiol.*, 1993, 40, 101-112.
Diesenhouse M. C., Wilson L. A., Corrent G. F. et al., *Am. J. Ophthalm.*, 1993, 155, 293-298.
Dieterich D. T. et al., *J. Infect. Dis.*, 1994, 169, 178-183.
Molina J. M. et al., *J. Infect. Dis.*, 1993, 167, 217-221.
Orenstein J. M., *J. Parasitol.*, 1991, 77, 843-864.
Orenstein J. M., Tenner M., Cali A., Kotler D. P., *Hum. Pathol.*, 1992, 23, 722-728.
Scully R. E., Mark E. J., McNeely W. F., McNeely B. U., *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329 (26), 1946-1954.
Schwartz D. A., Visvesvara G. S., Diesenhouse M. C. et al., *Am. J. Ophthalm.*, 1993, 115, 285-292.

GIANFRANCO BORTOLETTI

MIDOLLO OSSEO [v. vol. IX, coll. 1279-1309; Agg. I, coll. *5123-5139]

TRAPIANTO

(Progressi nel trapianto di midollo osseo: gli anni '90)

SOMMARIO

Introduzione (col. 3687). - **I fattori di crescita emopoietici e le cellule staminali periferiche** (col. 3689). - **L'antigene CD34** (col. 3689). - **Chemioterapia, fattori di crescita, cellule CD34 positive** (col. 3690). - **Autotrapianti di PBSC e trapianto autologo** (col. 3690). - **Cellule staminali periferiche da donatori sani** (col. 3690). - **Trapianti di cellule staminali emopoietiche incompatibili** (col. 3691).

MIDOLLO OSSEO

- Trapianti da donatori non consanguinei (col. 3691). - Controllo delle complicazioni trapiantologiche (col. 3692). - Sangue del cordone ombelicale (col. 3693). - Trapianto di cellule CD34⁺ in utero (col. 3693). - Il futuro del trapianto di midollo osseo (col. 3693). - Trapianto di midollo osseo da donatore familiare incompatibile (col. 3694).

Introduzione

Come sintetizzato nella stesura inserita nell'Agg. I (*5124), si devono distinguere due tipi fondamentali di trapianto di midollo osseo [m.o.]: quello in cui esso proviene da un donatore (*trapianto allogenico*) e quello in cui il paziente funge da donatore di se stesso (*trapianto autologo*).

Il midollo prelevato da un donatore può a sua volta provenire da gemelli omozigoti (*trapianto singenico*) o da altre categorie di donatori, unite appunto dalla denominazione di *trapianto allogenico*: fratelli HLA-identici, fratelli non HLA-identici e donatori non familiari HLA-identici, noti come MUD (*Matched Unrelated Donors*).

Il *trapianto autologo* è utilizzato nelle leucemie acute, nei linfomi maligni e in tumori solidi, in particolare nel carcinoma mammario, e richiede di solito una remissione completa, ossia una normalizzazione del midollo del paziente (leucemie) ovvero una persistente normalità dello stesso (linfomi, neoplasie). In queste situazioni è necessario poter disporre di *cellule staminali emopoietiche*, le cosiddette PBSC (*Peripheral Blood Stem Cell*), che consentono il trapianto autologo.

Esistono patologie per le quali viene preferito il trapianto autologo (per esempio i linfomi ed il carcinoma mammario) ed altre nelle quali si preferisce il trapianto allogenico (per esempio la leucemia mieloide cronica).

Riassumiamo nella tab. I le principali caratteristiche dei trapianti allogenici e autologhi di m.o.

Nella tab. II riassumiamo i processi morbosi curabili con il trapianto di m.o.

TAB. I. CARATTERISTICHE DEI TRAPIANTI ALLOGENICI O AUTOLOGHI DI MIDOLLO OSSEO

Caratteristiche	Trapianto allogenico	Trapianto autologo
Età limite in anni per il candidato al trapianto	60	60-70
Fattori che influenzano l'attecchimento del trapianto di m.o.	Identità HLA e molte cellule midollari infuse	Sufficiente numero di cellule autologhe PBSC, non contaminate da cellule tumorali
Complicazioni maggiori	GvHD (malattia trapianto contro ospite)	Recidiva della malattia originale
Impiego nelle malattie tumorali	Dimostrata potenzialità curativa. Ora anche impiego di cellule staminali periferiche (PBSC)	Potenzialità curative nel morbo di Hodgkin e nel linfoma non-Hodgkin e in alcune leucemie acute
Impiego in malattie non tumorali	Potenzialità curativa in malattie genetiche e immunologiche	Impiego unitamente a terapia genica

TAB. II. PRINCIPALI PROCESSI MORBOSI CURABILI CON IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

Processi neoplastici	Tipo di trapianto	Processi non neoplastici congeniti	Tipo di trapianto	Processi non neoplastici acquisiti	Tipo di trapianto
Leucemia mieloblastica acuta	Allogenico (Autologo)	Anemia aplastica (anemia di Fanconi)	Allogenico	Anemia aplastica	Allogenico
Leucemia linfoblastica acuta	Allogenico (Autologo)	Emoglobinopatie (talassemie)	Allogenico	Emoglobinuria parossistica notturna	Allogenico
Leucemia mieloide cronica	Allogenico (Autologo)	Immunodeficienze (SCID: sindrome di Wiskott-Aldrich, etc.)	Allogenico (cellule del sangue del cordone ombelicale). Trapianto in utero		
Leucemia linfatica cronica	Allogenico (Autologo)	Osteopetrosi	Allogenico		
Sindromi mielodisplastiche	Allogenico	Malattia di Gaucher	Allogenico		
Mieloma multiplo (Plasmocitoma)	Allogenico (Autologo)	Adrenoleucodistrofia legata al sesso	Allogenico		
Linfoma non-Hodgkin	Autologo (PBSC)				
Mieloma di Hodgkin	Autologo (Allogenico)				
Neutropenia	Autologo				
Cancro della mammella	Autologo (controverse al riguardo)				

Più specificatamente, per il trattamento dell'*anemia aplastica*, sia congenita che acquisita, mediante trapianto di m.o., v. ANEMIA APLASTICA** (coll. **268-272); per il trattamento della emoglobinuria parossistica notturna, v. la voce omologa (coll. **1848-1849); per il trattamento delle emoglobinopatie talassemiche, v. TALASSEMIE (v.; v.*; v.**).

I fattori di crescita emopoietici e le cellule staminali periferiche

Il m.o. produce ogni giorno 10^{12} (10.000.000.000.000) cellule del sangue, globuli bianchi, globuli rossi, piastrine, che svolgono il loro lavoro e poi muoiono, con una vita media che va da 3-6 ore per alcuni globuli bianchi a 2-3 mesi per i globuli rossi. Tale produzione è garantita da cellule dette cellule staminali (CS) o CS emopoietiche.

Negli anni '70 veniva riconosciuto che la crescita *in vitro* delle cellule emopoietiche era legata alla presenza di fattori di crescita (v.***) emopoietici. Tale scoperta va attribuita al lavoro di Don Metcalf a Melbourne, il quale per primo identificò tali sostanze. Egli riuscì a dimostrare che cellule ottenute dal m.o. potevano dar luogo a cosiddette «colonie» se poste in terreni semisolidi e stimolate in maniera appropriata. Identificò dapprima un fattore che chiamò GM-CSF ovvero «granulo-macrophage colony stimulating factor» ad indicare che tale sostanza era in grado di consentire la crescita di colonie della linea mieloide granulo-macrophagica. Ben presto al GM-CSF si unirono altri fattori specifici per tutte le linee emopoietiche: monociti, granulociti, eritrociti, megacariociti. Si veniva così delineando un sistema di ormoni emopoietici i quali probabilmente avevano un effetto anche *in vivo* (Metcalf, 1986).

Negli anni '80 vennero delineati gli effetti di questi fattori di crescita, o emopoietine, e vennero identificati i primi inibitori della emopoiesi, o fattori soppressivi: il sistema apparve sempre più come sottoposto alla regolazione di stimoli positivi e negativi. Sono le cellule accessorie (linfociti e monociti) i principali produttori di tali sostanze: queste cellule accessorie possono quindi modificare la produzione di cellule nucleate del sangue a seconda delle esigenze. L'unica eccezione è la eritropoietina (v.*; v.***) o fattore di crescita dei globuli rossi, che viene prodotta nel glomerulo renale.

Alla fine degli anni '80 erano stati clonati i geni responsabili della produzione di questi fattori di crescita e si era dato il via alla produzione dei cosiddetti fattori di crescita ricombinanti, ovvero fattori di crescita in tutto uguali a quelli umani, ma prodotti con tecniche di ingegneria genetica. Si è così aperta la possibilità di somministrare tali sostanze *in vivo* con lo scopo di aumentare per esempio la produzione dei globuli bianchi (Liessche e Burgess, 1992a; 1992b).

Contemporaneamente iniziavano le osservazioni sul fatto che le cellule staminali emopoietiche circolano nel sangue periferico, che tale circolazione era aumentata dopo chemioterapia probabilmente con un effetto rimbalzo (*rebound*): dopo una dose elevata di ciclofosfamide si assisteva alla consueta caduta dei globuli bianchi e delle piastrine, ma nella fase di ripresa compariva inaspettatamente nel sangue periferico un numero elevato di progenitori emopoietici.

L'antigene CD34

Tutte le cellule esprimono cosiddetti antigeni di superficie, perlopiù proteine o glicoproteine che caratterizzano la funzione delle cellule stesse: la descrizione di innumerevoli antigeni di superficie ha portato alla creazione di una sorta di registro per tali antigeni, e di una nomenclatura internazionale. Una volta identificati gli antigeni viene loro asse-

gnato un numero di codice preceduto dalle due lettere CD (*Cluster Defined*). Fra i tanti, un interesse particolare destava l'antigene CD34, espresso da progenitori emopoietici. La storia della cellula staminale del m.o. data ormai più di un secolo e ha visto la scuola italiana di ematologia, ed in particolare quella di Adolfo Ferrata di Pavia, protagonista in questo campo. Si trattava di identificare una cellula capace di dare origine a tutti gli elementi del sangue: l'esistenza di tale cellula era stata ipotizzata appunto da Ferrata, ma si sapeva che il numero di queste cellule era estremamente ridotto essendo l'organizzazione della emopoiesi piramidale. Con l'avvento delle tecniche di citofluorimetria (v. CITOMETRIA A FLUSSO*) e con la scoperta dell'antigene CD34 sulla superficie di cellule emopoietiche, era finalmente possibile caratterizzare le cellule staminali.

Chemioterapia, fattori di crescita, cellule CD34 positive

È merito del gruppo di Milano di Massimo Gianni l'aver sviluppato una tecnica affidabile e sicura per la cosiddetta mobilitazione di cellule staminali emopoietiche (Gianni *et al.*, 1989). Il programma consiste nel trattamento del paziente con chemioterapia (ciclofosfamide) seguita dalla somministrazione di fattori di crescita (GM-CSF o G-CSF). La combinazione di chemioterapia e fattori di crescita aumentava di molte volte la mobilitazione di cellule CD34 positive (CD34⁺) e l'analisi del sangue periferico per quest'ultimo antigene, consente di monitorare nei giorni il traffico delle cellule emopoietiche. È quindi possibile raccogliere le stesse con separatori cellulari, criopreservare le cellule in azoto liquido e utilizzarle poi per autotrapianti.

Autotrapianti di PBSC e trapianto autologo

Oggi, a distanza di un quinquennio dai primi studi, l'autotrapianto di PBSC (*Peripheral Blood Stem Cell*) è ormai entrato a far parte del bagaglio convenzionale delle strutture ematologiche ed oncologiche: trova infatti indicazione nei linfomi maligni (Hodgkin e non-Hodgkin), sia in alcune forme di leucemie acute e croniche, nei mielomi (Majolino *et al.*, 1995) e molto più recentemente nel carcinoma della mammella. Nel 1995 vi sono stati 6408 autotrapianti di PBSC in Europa, dei quali 1803 per linfomi, 1298 per cancro della mammella e 1115 per mielomi, e 655 per leucemie acute e croniche, come indicazioni più frequenti. Nello stesso anno i trapianti autologhi da m.o. sono stati 1365.

I risultati clinici sembrano confermare che la chemioterapia ad alte dosi seguita dall'utilizzo di cellule staminali periferiche offra un vantaggio in termini di sopravvivenza libera da malattia per molte forme neoplastiche.

Ecco quindi l'esempio di come la ricerca di base (colonie *in vitro* e fattori di crescita), il progresso tecnologico (citofluorimetria, ingegneria genetica e anticorpi monoclonali), osservazioni cliniche (chemioterapie e cellule staminali) opportunamente combinati hanno prodotto vantaggi clinici obbiettivi. È molto importante che queste tecniche vengano ora confrontate in modo rigoroso con tecniche terapeutiche più convenzionali per provare o meno la sua superiorità: si tratta come si può ben evincere di una procedura ad alto contenuto tecnologico, e pertanto ad elevato costo.

Cellule staminali periferiche da donatori sani

Il passo successivo è stato quello di saggiare l'impiego dei fattori di crescita in donatori sani: abbiamo infatti fino a qui descritto l'utilizzo di questi fattori nel paziente stesso, per la raccolta e la criopreservazione di cellule staminali emopoietiche autologhe. Le esperienze favorevoli, la buona tolleranza, la raccolta di un numero elevato di cellule staminali, e l'assenza di importanti effetti collaterali, hanno consentito l'avvio di questa procedura anche per donatori sani.

Nel 1994 sono stati «mobilizzati» i primi donatori normali con lo scopo di raccogliere cellule staminali emopoietiche per il trapianto allogenico (Bensinger *et al.*, 1995). La tecnica consueta del prelievo di m.o. in anestesia generale aveva ora una alternativa, la somministrazione per quattro giorni di fattore di crescita e la raccolta di cellule staminali mediante separatore cellulare. Negli ultimi tre anni sono state eseguite parecchie centinaia di trapianti allogenici di CSP con risultati incoraggianti (Bacigalupo *et al.*, 1996).

È in corso uno studio europeo per il confronto fra cellule staminali periferiche e cellule midollari. Il fattore di crescita più impiegato è il G-CSF che, ad un ottimo effetto sulle staminali ed ad un'ottima tollerabilità, unisce un interessante effetto immunomodulante. È di recente acquisizione il ruolo del G-CSF nel determinare l'atteggiamento funzionale di alcune sottopopolazioni di linfociti: esiste un equilibrio tra linfociti «proinfiammatori» (TH1) e linfociti «antinfiammatori» (TH2), i quali differiscono gli uni dagli altri per la produzione di citochine specifiche: i TH1 producono interferone γ , interleuchina 2, TNF; i linfociti TH2 producono interleuchina 4, interleuchina 10. Il G-CSF promuove un atteggiamento funzionale dei linfociti antinfiammatorio, e risulta quindi particolarmente interessante nel trapianto di m.o. allogenico, ovvero da donatore diverso dal paziente (familiare o no).

Trapianti di cellule staminali emopoietiche incompatibili

Grazie ai fattori di crescita, ai fattori di crescita emopoietici, è stato possibile avviare trapianti fra coppie incompatibili per il sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). È merito del gruppo di Perugia diretto da Massimo Martelli aver introdotto il concetto di dose di cellule staminali: i problemi legati ai trapianti incompatibili, ovvero rigetto e malattia trapianto verso ospite (GvHD, *Graft versus Host Disease*; v. MIDOLLO OSSEO* [coll. *5128-5130]), potevano essere superati con l'utilizzo di un elevato numero di cellule staminali emopoietiche private dei linfociti T (*T deplete*) (Aversa *et al.*, 1994). Questa tecnica inizialmente impiegata in pazienti con leucemia in fase molto avanzata è adesso allo studio in numerose istituzioni italiane ed europee per pazienti in fase più precoce di malattia. L'argomento viene sviluppato in un successivo capitolo (v. sotto, col. **3694).

Trapianti da donatori non consanguinei

Questo tipo di procedura ha avuto un grande impulso negli ultimi cinque anni grazie a due fattori fondamentali: il lavoro delle Associazioni di donatori (in Italia, Associazione Donatori Midollo Osseo [ADMO]) e le nuove tecniche di tipizzazione del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA; *Human Leukocyte Antigens*). Le prime hanno garantito un aumento del numero di potenziali donatori, le seconde hanno permesso di meglio caratterizzare l'HLA, mediante tecniche di biologia molecolare, dandoci nuovi strumenti per selezionare donatori idonei. Il sistema maggiore di istocompatibilità (HLA) controlla numerose funzioni immunologiche legate al riconoscimento del «sé» e dell'«estraneo», quindi essenziali per la vita e per la preservazione della integrità dell'individuo. Proprio per la sua importanza vitale, l'HLA è una regione genica molto conservata, ovvero ereditata in blocco dai genitori, e questi blocchi di geni sul cromosoma 6 vengono chiamati *aplotipi*, ed è rintracciando a ritroso gli aplotipi HLA che è stato di recente possibile identificare un progenitore comune della specie *homo sapiens* probabilmente abitante nelle Regioni Centro-Africane. A causa della espansione della specie umana, gli aplotipi del sistema HLA sono molto polimorfi, ovvero sono possibili numerose combinazioni, circa 40 milioni. Alcuni aplotipi HLA sono molto frequenti altri sono

molto rari: quindi per alcuni pazienti sarà relativamente facile trovare un donatore con lo stesso «aplotipo» e quindi identico, per altri sarà difficile.

Di qui la necessità di poter disporre di un grande numero di donatori volontari per soddisfare le esigenze di pazienti emopatici che potrebbero giovare del trapianto di m.o., ma che non hanno un donatore compatibile nella famiglia. Sono sempre più frequenti le famiglie con figli unici ed il fratello rappresenta pur sempre il donatore con maggior probabilità di essere compatibile. Alla fine degli anni '80 i donatori a livello mondiale erano inferiori a 500.000; nel 1997 abbiamo superato 3,5 milioni di donatori nei Registri internazionali. Il coordinamento fra tutti i Registri Nazionali è garantito da una organizzazione internazionale creata da Jan Van Rood (Leiden) il quale ha riunito tali Registri in un unico elenco, prima cartaceo ed oggi telematico. Il Registro Italiano (RIDMO) nato a Genova alla fine degli anni '80, è oggi il quarto registro al mondo per numero di donatori.

I laboratori di tipizzazione tessutale hanno nello stesso tempo migliorato le metodiche di tipizzazione del donatore e del ricevente e sono oggi in grado di identificare con precisione i prodotti antigenici del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA [v. v.*; v.**]).

Oggi si eseguono circa dieci trapianti ogni giorno da donatore non consanguineo: i risultati sono sempre più vicini in termini di risultati a quelli da donatore familiare (cfr. ad es. Hansen *et al.*, 1998).

In una nostra recente casistica in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica, i trapianti da donatore non consanguineo hanno dato risultati sovrapponibili a quelli da donatore familiare, nell'ordine del 70-80% a quattro anni.

Controllo delle complicazioni trapiantologiche

La infezione da virus citomegalico (CMV) è una delle complicazioni più frequenti e temibili del trapianto di cellule staminali emopoietiche. Abbiamo sviluppato nel corso degli ultimi anni protocolli efficaci di monitoraggio di tale infezione, in particolare determinando la comparsa della cosiddetta antigenemia. È stato possibile quindi sviluppare programmi di profilassi e terapia grazie a due farmaci antivirali, il foscarnet (v. ANTIVIRALI**) ed il ganciclovir (v. GANCICLOVIR*; v. anche ACICLOVIR E ANALOGHI**). Attualmente la profilassi consente di evitare la infezione da CMV nel 50% dei pazienti, e la terapia precoce offre ai pazienti che sviluppano l'infezione una probabilità di cura superiore al 90%. Abbiamo così ridotto in modo significativo una importante causa di morbosità e mortalità dopo trapianto di m.o.

Un secondo fattore che ci ha consentito di ridurre il rischio trapianto è stata l'aumentata consapevolezza dell'importanza della dose di inoculo midollare: alla fine degli anni '90 la mediana di cellule trapiantate nel nostro Centro era di $2,4 \times 10^6/\text{kg}$ mentre nel 1996 era di $4,8 \times 10^6/\text{kg}$. In altre parole abbiamo raddoppiato, grazie ad una particolare tecnica di espianto, il numero di cellule che noi trapiantiamo ad un paziente emopatico (Bacigalupo *et al.*, 1992). Questo si è tradotto in un attecchimento qualitativamente migliore, e in una possibilità per il malato di superare le tipiche complicazioni del trapianto, soprattutto quelle infettive. L'importanza della dose di cellule staminali è stata confermata da studi internazionali sia nel trapianto da familiare che soprattutto nel trapianto da donatore non consanguineo.

Infine abbiamo ottimizzato i protocolli di condizionamento (la chemioterapia e la radioterapia che vengono somministrate al paziente prima del trapianto) ed i protocolli di profilassi della malattia trapianto verso ospite (GvHD). Grazie a tutte queste modifiche oggi il trapianto

allogeneico da donatore familiare ha un rischio che è inferiore al 15%, la metà di quello che era negli anni '80. È quindi aumentata la probabilità di guarigione per pazienti affetti da leucemie acute e croniche in fase precoce di malattia.

Sangue del cordone ombelicale

Una alternativa al midollo osseo è rappresentata dal sangue del cordone ombelicale, ricco di cellule staminali e capace di ricostituire una emopoiesi efficace nel ricevente. Recentemente, questo tipo di trapianto è stato utilizzato, soprattutto nei bambini (Wagner *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1996), usando sangue cordonale di fratelli compatibili o anche di donatori non consanguinei ma HLA-identici. Questa procedura offre alcuni vantaggi rispetto al trapianto di m.o. (nessun rischio per il donatore, possibile riduzione dell'incidenza e della gravità della GvHD) ma rimane per ora applicabile solo in pazienti con peso corporeo ridotto (circa 20 kg), a causa della quantità limitata di cellule staminali disponibili.

Trapianto di cellule CD34⁺ in utero

Infine è stata sperimentata in alcuni pazienti la infusione di cellule CD34⁺ direttamente nel feto, quindi durante la vita intrauterina (IUT: *in-utero transplantation*; alla 21^a settimana di gestazione). Si è avuto in rari casi l'attecchimento parziale delle cellule del donatore. Ricordiamo il recente successo del gruppo di Ugazio e collaboratori (Wengler *et al.*, 1996) che ha trattato con successo un caso di SCID, mediante trapianto in utero di cellule CD34⁺ di provenienza paterna e l'analoga esperienza di Flake *et al.* (1996). È troppo presto per considerare questa procedura ai fini applicativi.

Il futuro del trapianto di midollo osseo

Resta il problema dei pazienti con leucemia in fase avanzata di malattia, e infatti mentre abbiamo ridotto in modo significativo la tossicità del trapianto, non siamo riusciti a ridurre in modo altrettanto convincente il rischio di recidiva leucemica. In una analisi recente su oltre 20.000 pazienti sottoposti a trapianto di m.o. in Europa, il rischio di recidiva di malattia è rimasto invariato negli ultimi 10 anni (dati non pubblicati). Abbiamo due possibilità per affrontare questo problema: la prima è quella di aumentare la dose di chemioterapia e radioterapia somministrata prima del trapianto, la seconda è quella di promuovere l'attività biologica dei linfociti del donatore in senso antileucemico. La prima strada è stata esplorata negli ultimi 10 anni, ma l'aumento della chemioradioterapia equivale ad un aumento della tossicità trapiantologica; quindi la riduzione eventuale di recidiva non porta ad un aumento della probabilità di cura. Recentemente sono stati introdotti anticorpi monoclonali coniugati con radioisotopi: è possibile con l'impiego di questi agenti somministrare una dose superiore di radioterapia e quindi al tumore, senza al tempo stesso aumentare la dose totale somministrata al paziente. Sono già in corso studi clinici controllati (Matthews *et al.*, 1995).

La seconda strada è quella della manipolazione biologica del tumore: l'esperienza ci ha insegnato che la recidiva è più elevata nei trapianti gemellari che non nei trapianti da fratelli ed è ancora inferiore nei trapianti da donatori non consanguinei. È quindi operativa dopo il trapianto una attività antileucemica proporzionale alla differenza fra donatore e ricevente: tanto più uguali (come nel caso dei gemelli), tanto inferiore è questa attività immunologica o immunoterapica. Di recente è stato introdotto l'uso dei linfociti del donatore per la recidiva leucemica post-trapianto: si

tratta di una procedura iniziata nel 1990 che ha dato risultati straordinari soprattutto nella leucemia mieloide cronica, nella quale l'80% dei pazienti che ricadono dopo il trapianto possono ottenere una remissione di malattia duratura con la semplice infusione di linfociti del donatore. Purtroppo meno incoraggiante è questo effetto nelle leucemie acute, nel mieloma, e forse anche nei linfomi.

Infine una delle aree di grande sviluppo è quella del trapianto in età avanzata: fino ad oggi proprio per l'impiego di dosi molto elevate di chemioradioterapia, il trapianto era riservato a pazienti fino a 45-50 anni di età. Nel nostro Centro oggi trapiantiamo pazienti fino a 60 anni di età. Ma soprattutto sono in corso studi per trapianti nelle malattie linfoproliferative croniche e mieloproliferative croniche per pazienti fra i 60 e i 70 anni di età: si tratta di ridurre al minimo la chemioradioterapia di preparazione e di aumentare la dose di cellule staminali infuse.

In conclusione il trapianto di cellule staminali emopoietiche si è avvalso negli ultimi 15 anni di importanti sviluppi sul piano tecnologico, culturale, e biologico: i programmi di ricerca dedicati a queste problematiche hanno consentito l'applicazione della tecnica in un numero sempre maggiore di pazienti. Abbiamo ridotto il rischio del trapianto, abbiamo aumentato la probabilità di cura, abbiamo ampliato il numero dei donatori potenziali e soprattutto abbiamo innalzato il limite dell'età offrendo quindi questa importante opzione terapeutica a un sempre più vasto numero di pazienti emopatici.

Bibliografia

- Aversa F., Tabilio A., Terenzi A. *et al.*, *Blood*, 1994, **84** (11), 3948-3955.
 Bacigalupo A., Tong J., Podestà M. *et al.*, *Bone Marrow Transplantation*, 1992, **9**, 467-470.
 Bacigalupo A., Van Lint M. T., Valbonesi M. *et al.*, *Blood*, 1996, **88** (1), 353-357.
 Bensinger W. I., Weaver C. H., Appelbaum F. R. *et al.*, *Blood*, 1995, **15**, 1665.
 Flake A. W. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335** (24), 1806.
 Gianni A. M. *et al.*, *Lancet*, 1989, **2**, 580-585.
 Hansen J. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (14), 962-968.
 Liesschke G. J., Burgess A. W., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327** (1), 28-35.
 Liesschke G. J., Burgess A. W., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327** (2), 99-106.
 Majolino I., Aversa F., Bacigalupo A., Bandini G., Arcese W., Reali G. for GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo, e di cellule staminali ematopoietiche, nell'adulto e nel bambino), *Haematologica*, 1995, **80** (1), 40-43.
 Matthews D. O., Appelbaum F. R., Eary J. F. *et al.*, *Blood*, 1995, **85** (4), 1122-1131.
 Metcalf D., *Blood*, 1986, **67**, 257-267.
 Tsai T. W., Frentes C. O., *Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Leukemias and Aplastic Anemia*, in Schrier R. W. *et al.* eds., *Advances in Internal Medicine*, 1997, **42**, 423-451, Mosby, St. Louis.
 Wagner J. E., Kernan N. A., Steinbuch M. *et al.*, *Lancet*, 1995, **346**, July 22.
 Wagner J. E. *et al.*, *Blood*, 1996, **88**, 795-802.
 Wengler G. S. *et al.*, *Lancet*, 1996, **348**, 1484.

ANDREA BACIGALUPO

Trapianto di midollo osseo da donatore familiare incompatibile

Il trapianto di m.o. allogeneico è attualmente la migliore strategia terapeutica per molte malattie del sangue, maligne e non, congenite ed acquisite. Sebbene si sia assistito, in questi ultimi anni, ad una enorme espansione dell'attività trapiantologica sia in termini di numero di trapianti eseguiti per anno sia in termini di nuovi Centri attivati, una più vasta applicazione del trapianto di m.o. è limitata dalla disponibilità del donatore HLA-identico. Al giorno d'oggi, con le attuali dimensioni delle famiglie americane ed europee, solo il 30% circa dei pazienti eleggibili per il trapianto dispongono di un donatore familiare HLA-identico.

La recente istituzione di ampi Registri nazionali ed internazionali di donatori volontari di m.o. e di banche del

cordone ombelicale ha consentito, in questi ultimi anni, di estendere la pratica trapiantologica anche a pazienti che, pur privi di un donatore familiare compatibile, hanno trovato un donatore non consanguineo fenotipicamente identico nell'ambito dei registri di donatori volontari.

Ciononostante, permangono ancora molti problemi che limitano una più vasta applicazione del trapianto da non consanguineo. Innanzitutto, la difficoltà per alcuni pazienti con assetto fenotipico raro di reperire un donatore idoneo al di fuori della propria famiglia e poi, ci sono i tempi della ricerca, spesso lunghi per concludere tutte le complesse procedure di tipizzazione, che finiscono con l'essere incompatibili con l'urgenza della malattia. Per questi motivi, ancora oggi, circa il 40-50% dei pazienti, potenzialmente curabili con un trapianto di m.o., non possono accedere a questa procedura terapeutica perché privi di un donatore compatibile e prontamente disponibile. Per contro, la quasi totalità di questi pazienti dispone di familiari (genitori, figli, fratelli, cugini, etc.) che condividono almeno un aploipo con il paziente ma che sono differenti per due-tre loci sull'aploipo non condiviso e che potrebbero essere impiegati come donatori. Sfortunatamente, i numerosi tentativi di utilizzare il m.o. di donatori familiari parzialmente isto-incompatibili (aploidentici 2-3 loci incompatibili) sono stati largamente insoddisfacenti a motivo dell'elevata incidenza (oltre 80%) di GvHD (v. MIDOLLO OSSEO* [coll. **5128-5130]) severa e di rigetti ed una sopravvivenza libera da malattia inferiore al 10%.

Tuttavia, la vasta esperienza acquisita con il trapianto da familiare incompatibile per pazienti con immunodeficienza severa combinata (SCID) ha confermato la possibilità di ottenere un attecchimento «full donor» del midollo incompatibile senza GvHD, sia acuta che cronica, ove si realizzi una T-deplezione del midollo del donatore di almeno 3 log, per esempio attraverso la tecnica della *lectina soybean agglutinin* e successiva *E-rosettazione* con emazie di montone. Rispetto ad altre tecnologie di T-deplezione (elutrazione, *purging* con anticorpi monoclonali) quella basata sulla combinazione della *lectina soybean agglutinin* e della *E-rosettazione* con emazie di montone presensibilizzate con neuraminidasi (Reisner *et al.*, 1988) consente di ottenere appunto un abbattimento di T linfociti dell'inoculo midollare superiore a 3 log e non rende necessaria alcuna addizionale immunosoppressione post-trapianto per la prevenzione della GvHD. Applicando questa tecnologia, il gruppo del Memorial Hospital di New York ha ottenuto, nel 1981, il primo successo di un trapianto T-depletato da padre incompatibile in un bambino con leucemia acuta linfoblastica (Reisner *et al.*, 1981). Dopo condizionamento con irradiazione totale (*total body irradiation*; TBI) e ciclofosfamide (Cy), l'infusione di cellule midollari T-depletate con *lectina* e *E-rosette* portò all'attecchimento «full-donor» senza alcun segno di GvHD. Purtroppo, dopo 11 settimane, il paziente andò incontro a recidiva di malattia. Da allora, l'impiego di una T-deplezione estrema nel trapianto incompatibile per pazienti con leucemia si è costantemente associato ad una elevata incidenza di rigetti o mancati attecchimenti. Del resto, ricorrendo a metodiche di T-deplezione meno spinta (2 log) nel tentativo di ridurre il rigetto, si riproponeva il problema della GvHD, nonostante l'impiego di un'addizionale profilassi post-trapianto con ciclosporina.

I successivi studi del problema del rigetto del midollo incompatibile T-depletato hanno evidenziato l'inadeguatezza dei convenzionali regimi di condizionamento nella immunosoppressione del paziente. Il sistema linfoide dell'ospite, residuo al termine del condizionamento, è responsabile della reazione di rigetto attraverso l'espansione di

cellule T citotossiche specifiche per alcuni alleli del sistema HLA del donatore.

Studi nel modello murino, hanno indicato che la reattività immunologica dell'animale poteva essere completamente soppressa incrementando la dose totale di TBI o aggiungendo alla TBI altri presidi selettivamente anti-T con minima tossicità extra-ematologica, quali l'irradiazione supplementare della milza o la somministrazione *in vivo* di anticorpi monoclonali anti-T o di globulina antilinfocitaria (ATG). Al contempo, sempre nel topo, l'attecchimento del midollo incompatibile T-depletato può essere raggiunto incrementando il braccio mieloablativo del regime di condizionamento aggiungendo alla TBI farmaci potentemente aplastizzanti quali busulfano, dimetil-myleran o tiotepa.

Sulla base di questi dati sperimentali, sono stati disegnati regimi di condizionamento potenziati con l'aggiunta di altri farmaci (citosina-arabinoside, etoposide, ATG, tiotepa) alla combinazione standard TBI e Cy. Purtroppo, nessuno di questi agenti si è rivelato pienamente efficace nel prevenire il rigetto del trapianto incompatibile T-depletato mentre hanno sicuramente contribuito a potenziare l'attecchimento di midolli T-depletati HLA-compatibili. L'intensificazione dei regimi di condizionamento senza un'altrettanta estrema T-deplezione, ha purtroppo portato anche ad un incremento nella frequenza della GvHD nonostante l'impiego di una aggressiva immunoprofilassi post-trapianto.

Di fondamentale importanza nel superamento della barriera dell'istocompatibilità nell'animale sono stati gli studi condotti dal gruppo del Dr. Reisner al Weizmann Institute di Rehovot (Israele). In topi condizionati con dosi subletali di radioterapia, l'infusione di una mega dose (da 10 a 100 volte quella abituale) di cellule midollari incompatibili T-depletate ha consentito l'attecchimento con ricostituzione ematopoietica *full-donor* nella quasi totalità degli animali trattati. L'effetto della mega-dose cellulare è stato successivamente confermato impiegando come donatori i topi SCID o trapiantando topi sensibilizzati per il rigetto mediante l'infusione di splenociti «donor» prima del trapianto o parzialmente ricostituiti con la reinfusione di timociti maturi «host» al termine del condizionamento.

La disponibilità dei fattori di crescita emopoietici e l'esperienza acquisita nel trapianto autologo con l'impiego delle cellule staminali (v. sopra, coll. **3690-3691) del sangue periferico mobilitate dopo chemioterapia ad alte dosi seguita dalla stimolazione con G-CSF o GM-CSF hanno reso possibile, anche nell'uomo, l'infusione di mega-dosi di cellule emopoietiche allogeniche a livelli che avevano consentito, nell'animale, il superamento della barriera dell'istocompatibilità. Il Gruppo del Centro Trapianti di Midollo Osseo dell'Università di Perugia ha per primo applicato con successo, nel 1993, il concetto della mega-dose di inoculo ad una serie di pazienti, per lo più adulti, con malattia leucemica avanzata. Dopo un condizionamento potenziato sul versante immunosoppressivo mediante la somministrazione di ATG di coniglio (5 mg/kg/die $\times$ 4 giorni) e Cy (50 mg/kg $\times$ 2 giorni) dopo TBI in dose singola di 8 Gy ad alto *dose-rate* (16 cGy/m) e su quello mieloablativo mediante l'aggiunta di tiotepa (10 mg/kg), i pazienti hanno ricevuto cellule staminali midollari e periferiche, entrambe depletate di T linfociti mediante *lectina soybean agglutinin* ed *E-rosettazione*. La T deplezione è stata l'unica profilassi della GvHD. Nell'inoculo finale, le cellule CD34⁺ e le CFU-GM risultavano incrementate da 8 a 10 volte il valore abitualmente presente nel solo m.o. T-depletato. La quota finale di cellule CD34⁺ era pari a $2,2 \times 10^5$ /kg.

I risultati nei primi 17 pazienti sono stati pubblicati nel 1994 (Aversa *et al.*, 1994) e, successivamente, altri 27 pazienti, sempre con leucemia ad alto rischio e in fase avan-

zata di malattia, sono stati arruolati in questo studio pilota. Per la prima volta, è stato documentato un rapido attecchimento emopoietico in oltre l'80% dei pazienti e, senza un'addizionale profilassi post-trapianto, una GvHD acuta di grado $\geq$ II si è manifestata solo nel 27% dei casi e la forma cronica è stata di fatto irrilevante. 18% dei pazienti sopravvivono, liberi da malattia, ad un *follow-up* mediano di oltre 2 anni. Le maggiori complicazioni osservate in questo primo gruppo di pazienti sono state la tossicità polmonare (43%) e le infezioni nel contesto della GvHD acuta; entrambe hanno contribuito alla mortalità trapianto-correlata che è stata del 60%.

Questo studio pilota ha confermato, anche nell'uomo, il ruolo cruciale della dose di inoculo nel superamento della barriera dell'istocompatibilità. Un ulteriore dato sperimentale a sostegno dell'importanza del numero delle cellule CD34⁺ del sangue periferico è derivato, sempre nel modello sperimentale e per merito ancora della Scuola Israeliana, dalla dimostrazione dell'addizionale effetto immunosoppressivo delle cellule CD34⁺ altamente purificate. Esse sono in grado di ridurre, in coltura mista linfocitaria, la frequenza di precursori citotossici (CTLp) del ricevente dirette contro cellule stimolatorie del donatore. Attraverso questo effetto anergizzante, le cellule CD34⁺ partecipano al condizionamento dell'ospite e potenziano il proprio attecchimento.

L'approccio al trapianto T-depletato da donatore familiare aplo-incompatibile è stato progressivamente evoluto e perfezionato sempre dalla Scuola di Perugia che ha cercato di ridurre ulteriormente l'incidenza della GvHD e la mortalità trapianto-relata. Nel tentativo di giungere ad una infusione finale di cellule CD3⁺ inferiore a 5×10^4 /kg, considerata nel modello SCID incompatibile la soglia della GvHD, ciascuna leucaferesi, dopo una iniziale abbattimento della quota T linfocitaria mediante E-rosettazione, è stata processata su colonna ad alta affinità per la separazione in positivo delle cellule CD34⁺. La T deplezione del midollo osseo non è stata invece modificata. Al termine di questa manipolazione, è stato possibile infondere mediamente 3×10^4 /kg CD3⁺ e 13×10^6 /kg CD34⁺. Inoltre, con lo scopo di ridurre la tossicità acuta polmonare imputabile almeno in parte alla Cy, anche il regime di condizionamento è stato ridisegnato sostituendo la Cy con la fludarabina (40 mg/m²/die $\times$ 5 giorni). La scelta della fludarabina (v. **), di cui era già noto il potente effetto immunosoppressivo in pazienti trattati per malattie linfoproliferative croniche, è stata motivata dalla dimostrazione, nel sistema murino, della capacità di soppressione del sistema immune pari a quello della Cy quando somministrata in combinazione con la TBI (Terenzi *et al.*, 1996). I risultati preliminari di questo nuovo studio pilota, applicato in 24 pazienti con leucemia ad alto rischio e in fase avanzata, sono stati recentemente pubblicati (Martelli *et al.*, 1996). Come sperato, con la riduzione nel numero dei T linfociti infusi e le modifiche apportate al regime di condizionamento, la GvHD è praticamente stata eliminata del tutto senza compromettere l'attecchimento emopoietico che è stato documentato nel 95% dei casi. La mortalità trapianto-correlata è stata ridotta al 29%.

In questi ultimi venti anni, il trapianto di m.o. da donatore incompatibile è passato dalla fase della pura sperimentazione a quella dell'applicazione clinica sebbene ci siano ancora alcuni problemi aperti quali quello della ricostituzione immunologica post-trapianto. A motivo della scarsa quantità di linfociti infusi con l'inoculo, la crescita linfocitaria post-attecchimento è di fatto estremamente lenta e rende ragione della elevata frequenza di infezioni anche dopo mesi dal trapianto e della necessità di una protratta

profilassi antivirale e antifungina. È sperabile che l'ulteriore perfezionamento di questa strategia, applicata con successo anche in altri due studi recentemente pubblicati (Bacigalupo *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1996), possa portare ad un sempre più vasto impiego della terapia trapiantologica anche in quei pazienti che non dispongono di un donatore compatibile familiare o non consanguineo. Inoltre, sfruttando le potenzialità della mega dose di cellule CD34⁺, è lecito immaginare un loro impiego anche in patologie non neoplastiche, quali anemia aplastica, anemia di Fanconi, talassemie, SCID e altri disordini congeniti del metabolismo o, ancora, nell'induzione della tolleranza in trapianti d'organo.

Bibliografia

- Anasetti C., Amos D., Beatty P. G. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1989, 320, 197.
 Anasetti C., Hansen J., in Forman S. J., Blume K. G., Thomas E. D. eds., *Bone Marrow Transplantation*, 1994, Blackwell Scientific, Boston, p. 665.
 Ash R. C., Horowitz M. M., Gale R. P. *et al.*, *Bone Marrow Transplantation*, 1991, 7, 443.
 Aversa F., Tabilio A., Terenzi A. *et al.*, *Blood*, 1994, 84, 3948.
 Bachar-Lustig E., Rachamin N., Hong-Wei Li *et al.*, *Nature Medicine*, 1995, 12, 1268.
 Bacigalupo A., Mordini N., Pitto A. *et al.*, *Blood*, 1995, 86, 937.
 Cobbod S. P., Martin G., Quin S., Waldman H., *Nature*, 1986, 323, 164.
 Kato K., Kojima S., Kondo M. *et al.*, *Bone Marrow Transplant*, 1996, 18, 449.
 Kernan N. A., Bartsch G., Ash R. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, 328, 593.
 Kernan N. A., Collins N. H., Juliano L. *et al.*, *Blood*, 1986, 68, 770.
 Kernan N. A., Flomenberg N., Dupont B., O'Reilly R. J., *Transplantation*, 1987, 43, 482.
 Lapidot T., Singer T. S., Salomon O. *et al.*, *J. Immunol.*, 1988, 141, 2619.
 Lapidot T., Terenzi A., Singer T. S. *et al.*, *Blood*, 1989, 73, 2052.
 Martelli M. F., Aversa F., Velardi A. *et al.*, *Blood*, 1996, Abstract 1924.
 O'Reilly R. J., Kernan N. A., Cunningham I. *et al.*, in Gale R. P., Champlin R. E. eds., *Bone Marrow Transplantation: Current Controversies*, 1989, Alan R. Liss, New York, p. 477.
 Reisner Y., Lapidot T., Singer T. S., Schwartz E., in Martelli M. F., Grignani F., Reisner Y. eds., *T Cell Depletion in Allogeneic Bone Marrow Transplantation*, 1988, Serono Symposia Review, No. 13, 37.
 Reisner Y., Martelli M. F., *Immunol. Today*, 1995, 16, 437.
 Schwartz E., Lapidot T., Dalia G. *et al.*, *J. Immunol.*, 1987, 138, 460.
 Steward W. P., *Lancet*, 1993, 342, 153.
 Terenzi A., Aversa F., Perruccio K. *et al.*, *Blood*, 1996, Abstract 2373.
 Terenzi A., Lubin I., Lapidot T. *et al.*, *Transplantation*, 1990, 50, 717.
 Waldman H., Cobbod S., Hale G., *Current Opin. Immunol.*, 1994, 6, 777.

FRANCO AVERSA

MIELITI [v. vol. IX, coll. 1449-1453]

MIELOPATIA ASSOCIATA AD HTLV-I

SOMMARIO

Introduzione (col. 3698). - Patogenesi (col. 3699). - Sintomatologia (col. 3700). - Anatomia patologica (col. 3700). - Esami di laboratorio (col. 3700). - Trattamento (col. 3701).

Introduzione

Nei primi anni '80 la scoperta dei retrovirus umani HTLV-I e HTLV-II e la possibilità di accertare la relativa infezione attraverso la ricerca degli anticorpi specifici ha messo in luce importanti quadri clinici associati all'infezione da HTLV-I, il principale dei quali è la leucemia a cellule T dell'adulto (ATLL: *Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma* [v. LEUCEMIA*, coll. 4518-4522; *4604; LINFOMI*, coll. **3297-3298; RETROVIRUS*, coll. 6409-6410]).

Con questa forma linfoproliferativa, altri quadri clinici sono stati descritti in associazione all'infezione da HTLV-I. Accanto a casi non più sporadici di uveite, artrite, vasculite, crioglobulinemia, dermatite, nefropatia, broncopneumopatia o polimiosite, la forma clinica più frequente è la *mielopatia associata all'HTLV-I/paraparesi tropicale spastica (HAM/TSP)*. Il quadro è stato così chiamato dopo la dimostrazione che l'HTLV-I era responsabile sia della grande maggioranza dei casi di paraparesi progressiva da tempo descritti in varie aree geografiche tropicali (Africa, Caraibi e alcuni paesi dell'America latina) e in precedenza denominati paraparesi tropicali spastiche, sia dei numerosi casi di mielopatia nel Giappone meridionale, dove l'HTLV-I è particolarmente diffuso. Sebbene la stragrande maggioranza degli oltre 1000 casi di HAM/TSP sinora riportati sia stata osservata in questi paesi, casi sporadici sono descritti anche altrove, riflettendo a grandi linee la prevalenza di anticorpi specifici nella popolazione generale che va dallo 0,01-0,05% circa nei principali paesi occidentali, Italia compresa, all'1-2% nel Giappone, con valori più elevati e conseguente maggior rischio di malattia fra trasfusi e tossicodipendenti, a conferma della trasmissione per via ematica del virus. In genere, per un soggetto HTLV-I positivo, il rischio di sviluppare HAM/TSP è circa del 2-3% e il tempo di latenza fra infezione e sviluppo della mielopatia è di regola di un decennio o più. L'acquisizione dell'infezione da HTLV-I mediante trasfusione appare associata a un rischio più elevato di sviluppare la mielopatia e a un più breve tempo di incubazione (con una media intorno ai 2-3 anni).

Patogenesi

L'ipotesi di un ruolo diretto dell'HTLV-I nella genesi della mielopatia si fonda sul dato epidemiologico di un'alta frequenza di mielopatie croniche in aree di endemia per HTLV-I, ma soprattutto sulla presenza di elevati livelli di anticorpi specifici sierici e liquorali, sulla presenza del genoma virale e sulla possibilità di isolare il virus da linfociti liquorali di soggetti con mielopatia cronica. Tuttavia, mentre in ambito patogenetico i rapporti fra HTLV-I e ATLL sono stati approfonditi da studi molecolari, che hanno portato a ipotizzare un ruolo preciso per alcuni geni dell'HTLV (ad es. il gene *tax*) in alcune fasi dello sviluppo della leucemia, i meccanismi della mielopatia HTLV-I associata sono al momento ancora poco chiari.

Sebbene sia chiaro che il principale serbatoio dell'HTLV-I è rappresentato dalla popolazione dei linfociti CD4⁺, il meccanismo col quale un virus linfotropico provoca lesioni demielinizzanti è ancora incerto, e due sono le ipotesi prevalenti al riguardo. In quella autoimmune, l'infezione da HTLV-I attiverebbe, per infezione diretta o per meccanismo indiretto, delle cellule CD4⁺ con specificità di risposta verso antigeni espressi da cellule gliali nel S.N.C., avviando quindi una risposta autoimmune mediata da linfociti migrati nel midollo. Tale modello, che si accorda con il frequente riscontro in corso di infezione da HTLV-I di varie manifestazioni autoimmuni e con il reperto di infiltrati linfocitari perivascolari associati alle lesioni midollari, non prevede l'infezione diretta delle cellule gliali o neuronali da parte dell'HTLV-I. Nell'ipotesi «citotossica», le lesioni sono il prodotto di un'attività appunto citotossica, verosimilmente CD3⁺ mediata, verso elementi cellulari del S.N.C. (o linfociti presenti in esso) infettati dall'HTLV-I. Questo modello è sostenuto dalla presenza di una elevata percentuale di cellule citotossiche specifiche per l'HTLV-I nel sangue, nel liquor e a livello delle lesioni in pazienti con HAM/TSP e si basa sull'assunzione di una attiva espressione di antigeni dell'HTLV-I nel S.N.C., da parte di cellule

gliali o di linfociti CD4⁺. La questione rimane al momento aperta sia per la difficoltà di evidenziare HTLV-I nel S.N.C., dove i livelli di espressione appaiono comunque bassi, che per la presenza di risultati discordanti sull'argomento. Infatti, da un lato è stato trovato RNA di HTLV-I in cellule a fenotipo astrocitario nel midollo toracico (Lehky *et al.*, 1995), dato che sostiene l'ipotesi dell'infezione produttiva di cellule non linfocitarie, dall'altro il riscontro di DNA provirale di HTLV-I nelle sole cellule linfocitarie e non in neuroni o cellule gliali sembrerebbe confortare l'ipotesi autoimmune (Hara *et al.*, 1994). Una migliore definizione del processo patogenetico quindi è legata a una caratterizzazione più chiara del tipo cellulare prevalentemente infettato dall'HTLV-I nel S.N.C. Si tratta comunque di un'impresa non semplice data la stretta associazione fra cellule gliali e linfociti T.

Sintomatologia

La mielopatia ha carattere cronico e progressivo, con insorgenza nell'età adulta. I sintomi più frequenti sono ipostenia bilaterale e rigidità agli arti inferiori. La paraparesi spastica, accompagnata da iperreflessia agli arti inferiori, ha un grado variabile di progressione, determina di regola disturbi della deambulazione, rende di frequente necessario l'uso del bastone e può evolvere in completa paraplegia, in genere nell'arco di un decennio. I sintomi sensoriali, presenti nella maggioranza dei casi, sono di solito meno marcati, con parestesie, ottundimento, dolori lombari e in genere modesta perdita di sensibilità superficiale e vibratoria. Molto frequenti sono i disturbi genito-urinari, con urgenza urinaria, pollachiuria, e possibili incontinenza e impotenza. I segni di interessamento degli arti superiori sono più rari e di regola limitati a lieve iperreflessia. Anche i nervi cranici sono di regola risparmiati, ma può raramente verificarsi neuropatia ottica o sordità. I disturbi cognitivi sono assenti e casi di demenza sono del tutto eccezionali. L'evoluzione della malattia può arrestarsi a un livello variabile di progressione o può progredire rapidamente con infezioni intercorrenti ed embolie polmonari responsabili dell'esito infausto.

Anatomia patologica

Le lesioni caratteristiche mostrano perdita diffusa di mielina, soprattutto a livello del midollo toracico, degenerazione assonale, proliferazione delle cellule gliali con astrocitosi e caratteristiche infiltrazioni perivascolari. Rispetto alle lesioni della sclerosi multipla, la HAM/TSP è caratterizzata da lesioni meno circoscritte con un più evidente carattere degenerativo. Nei casi con caratteristiche di acuzie può osservarsi essudazione infiammatoria perimidollare. Studi di immunocitochimica, di PCR e di microscopia elettronica hanno evidenziato rispettivamente proteine di HTLV-I, sequenze provirali del relativo DNA e particelle virali con le caratteristiche dell'HTLV-I nel midollo spinale di soggetti con HAM/TSP. Le immagini di risonanza magnetica nucleare hanno mostrato riduzione del diametro del midollo spinale toracico e, con una frequenza non trascurabile, lesioni cerebrali subcorticali e periventricolari, generalmente di dimensioni inferiori (< 3 mm) rispetto a quelle caratteristiche della sclerosi multipla.

Esami di laboratorio

Il quadro ematologico si differenzia da quello della leucemia per vari aspetti. Nella mielopatia HTLV-I associata, sebbene siano riscontrabili occasionalmente cellule atipiche nel sangue e nel liquor, non si osservano linfocitosi CD4⁺ o manifestazioni leucemiche. Il liquor può essere normale o mostrare alterazioni minori, rappresentate da lievi aumenti delle proteine e delle cellule mononucleate. Nel sangue,

almeno il 5-15% dei linfociti T periferici sono HTLV-positivi, con un *pattern* policlonale di integrazione e un fenotipo in grande prevalenza CD4⁺ (raramente CD8⁺), segni di attivazione linfocitaria analoghi a quelli descritti per la leucemia (proteina p55 dell'IL-2r, antigeni HLA-II). I linfociti periferici di soggetti con HAM sono in grado di proliferare spontaneamente in vitro, proprietà assente nei soggetti con ATLL e presente solo in una minoranza di soggetti asintomatici HTLV-positivi. Lo studio del sistema complementare ha mostrato in soggetti con HAM/TSP aumentati livelli di C3b e C4d, compatibili con un attivazione del sistema. Secondo vari AA, l'accentuata replicazione dell'HTLV-I (testimoniata dall'alto numero di linfociti T infetti) sarebbe alla base della vigorosa risposta immune anticorpale e cellulare e dell'attivazione dei T, che peraltro favorisce anch'essa la replicazione del virus.

Trattamento

Complessivamente, l'entità e le caratteristiche della risposta immune e la possibile concomitante presenza di altri quadri clinici a carattere autoimmunitario suggeriscono l'indicazione a un trattamento immunosoppressivo. Su queste basi la HAM/TSP viene trattata in genere con corticosteroidi o altri immunosoppressori, con i quali si ottengono miglioramenti peraltro in genere transitori. La terapia immunosoppressiva sarebbe più efficace nei casi caratterizzati da minore durata della malattia.

Bibliografia

- Gessain A., Gout O., *Ann. Int. Med.*, 1992, **117**, 933.
Hara H., Morita M., Iwaka T. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, **180**, 831.
Hollberg P., Hafler D. A., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 1173.
Kira J.-I., *Mol. Neurobiol.*, 1994, **8**, 139.
Kira J.-I., Koyanagi Y., Yamada T. et al., *Ann. Neurol.*, 1994, **36**, 149.
Kuroda Y., Matsui M., Yukitake M. et al., *Neurology*, 1995, **45**, 30.
Lehky T. J., Fox C. H., Koenig S. et al., *Ann. Neurol.*, 1995, **37**, 167.
Rodgers-Johnson P. E. B., *Mol. Neurobiol.*, 1994, **8**, 175.
Saarlous M.-N., Koenig R. E., Spear G. T., *J. Inf. Dis.*, 1995, **172**, 1095.
Yamaguchi K., *Lancet*, 1994, **323**, 213.

MARCO FLORIDIA

MIELOPATIE INVOLUTIVE: V. ANEMIA APLASTICA**
(coll. **268-272); MIELOPATIE INVOLUTIVE (IX, 1482-1499).

MIOCARDIO [v. vol. IX, coll. 1600-1646]

IPERTROFIA E DILATAZIONE DEL MIOCARDIO

SOMMARIO

Introduzione (col. 3701). - **Stimolo iniziale dell'ipertrofia cardiaca** (col. 3702). - **Basi molecolari dell'ipertrofia cardiaca** (col. 3702). - **Struttura interstiziale e ipertrofia** (col. 3703). - **Modificazioni nella funzione sistolica e diastolica** (col. 3704). - **Note di ecocardiografia-Doppler** (col. 3705). - **Il cuore d'atleta** (col. 3707). - **Ipertrofia e cuore senile** (col. 3707).

Introduzione

L'ipertrofia del miocardio rappresenta il meccanismo di adattamento delle cellule cardiache come risposta compensatoria ad un sovraccarico di lavoro. Al di là dell'iniziale fattore scatenante meccanico, tale processo di adattamento appare virtualmente indipendente da una etiologia specifica, con finalità rivolte al mantenimento di favorevoli condizioni di lavoro. Inizialmente l'ipertrofia rappresenta un evento benefico, come favorevole adattamento fisiologico del cuore ad una condizione di patologia, ma non come malattia o evento patologico di per sé. Lo stiramento o

«stretch» della parete delle cellule cardiache determina l'innescare di una serie di eventi molecolari a livello citoplasmatico e nucleare, che danno luogo a particolari modificazioni sia qualitative che quantitative nell'espressione di proteine contrattili, strutturali e a funzione enzimatica, che caratterizzano il fenotipo della cellula muscolare cardiaca ipertrofica.

Il miocardiocita, cellula pienamente differenziata, non risulta in grado di rispondere agli stimoli mitogeni con l'avvio di processi di divisione cellulare: problema tuttora non compiutamente definito sulla base degli eventi molecolari sopra accennati. La crescita di tipo ipertrofico in assenza di iperplasia, pur volta inizialmente a mantenere una efficiente funzione contrattile, risulta a lungo termine inadeguata a prevenire l'instaurarsi dello scompenso cardiaco.

Stimolo iniziale dell'ipertrofia cardiaca

Negli ultimi tempi sono stati presi in considerazione gli agenti causali che possono rivestire il ruolo di stimoli inducenti l'ipertrofia miocellulare, come il cambiamento o «shift» nella produzione di isoenzimi miosinici, l'espressione di fattori di crescita e l'aumentato *turnover* proteico a livello molecolare. Appare attualmente evidente che il principale fattore, inducente la cascata di eventi che conducono all'ipertrofia cardiaca, sia il segnale *meccanico*, seppur modulato dalla interazione di vari ormoni e peptidi. Il ruolo svolto in tal senso dallo stimolo meccanico, attraverso un aumento dello «stretch» parietale, appare ben stabilito; non altrettanto definite sono le conoscenze su come lo stimolo meccanico è convertito in un segnale intracellulare capace di modificare l'espressione genetica nel nucleo della cellula. È stata valutata l'esistenza di canali ionici sensibili allo «stretch» e capaci di dare inizio alla cascata di eventi molecolari che conducono all'ipertrofia; sembra implicato in proposito un coinvolgimento dell'attività autocrina e paracrina di fattori liberati dalle cellule sottoposte a «stretch», essendo così possibile postulare che alcuni fattori prodotti localmente, come fattori di crescita (v.*; v.**), endotelina (v. ENDOTELIO**), angiotensina II, svolgono un effettivo ruolo nello sviluppo dell'ipertrofia miocardica anche quando il loro tasso ematico non aumenta. Peraltro, anche l'aumento in circolo di catecolamine e l'attivazione del sistema renina-angiotensina (v. RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE SISTEMA, XIII, 639) vengono comunemente osservati nell'ipertrofia miocardica indotta sperimentalmente.

La riespressione del programma fetale in corso di ipertrofia miocardica è una reminiscenza della capacità di proliferare in risposta ad uno stimolo mitogeno, osservabile anche in cellule differenziate in forma terminale come quelle miocardiche.

L'attivazione precoce di geni e l'espressione di proto-oncogeni (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**), quali ad es. *cFos* e *cMyc*, è implicata in entrambi i processi sia di proliferazione che di ipertrofia, come si osserva nello sviluppo fetale del cuore.

Nel corso dell'ipertrofia compensatoria, i recettori del sistema nervoso autonomo sono sottoregolati, come dimostrato dal calo del rapporto densità/superficie degli stessi, non come espressione di modificazioni del codice genetico, ma a seguito di un calo della concentrazione per un fenomeno di «diluizione».

Basi molecolari dell'ipertrofia cardiaca

L'ipertrofia del m. è un fenomeno quantitativo e qualitativo caratterizzato da modificazioni nella sintesi proteica e dei costituenti miocardici. Un aspetto essenziale dell'ipertrofia cardiaca è rappresentato da uno «switch» nella espressione di *isoforme* delle proteine contrattili. L'espressione di dif-

ferenti isoforme di un singolo gene, attraverso un riarrangiamento a livello del DNA, è il meccanismo prevalente nel cuore ed è documentato per α e β tropomiosina, troponina T e catene pesanti di miosina (MHC).

Sulla base della mobilità elettroforetica sono identificate tre isoforme della MHC: V1 ($\alpha\alpha$), V2 ($\alpha\beta$), V3 ($\beta\beta$), cioè tre isoforme che sono omodimeri o eterodimeri delle catene α e β , prodotte da geni individuati come localizzazione a livello cromosomico nell'uomo. L' α MHC, o isoforma veloce V1 caratterizzata da una elevata attività ATPasica, è l'isoforma miosinica predominante nel ratto; in questo animale lo stimolo ipertrofizzante induce la rapida formazione di proteine β MHC, cioè l'isoforma lenta V3 con bassa attività ATPasica, in parallelo con l'incremento della massa miocardica. Nell'uomo, β MHC è l'isoforma prevalentemente presente a livello ventricolare; non è quindi possibile lo spostamento verso l'isoforma V3, o «switch» verso il «programma fetale» attraverso una regolazione trascrizionale, derivandone meccanismi adattativi di definizione tuttora incerta. Per contro, la somministrazione di T3 (triiodotironina) induce la riespressione di isoforme α MHC, anche se il ruolo dell'ormone tiroideo non sembra preminente nello sviluppo dell'ipertrofia cardiaca. Sotto il profilo funzionale si può speculare se la ridotta attività ATPasica dell'isoforma β MHC, associata ad una ridotta velocità di accorciamento della miocellula, può essere utile in condizioni di elevato stress parietale con elevato consumo di ossigeno, con il vantaggio di una meno costosa attività energetica per il cuore. Nei cardiomiociti sottoposti a sovraccarico sono state osservate altre modificazioni nell'espressione delle proteine contrattili, a carico delle catene leggere di miosina, del sistema troponina-tropomiosina e di altre proteine ad attività di membrana, quali $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasi}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasi}$ e creatinchinasi.

V. anche: MUSCOLO*; RIMODELLAMENTO MUSCOLARE**; RIMODELLAMENTO VENTRICOLARE**.

Struttura interstiziale ed ipertrofia

Oltre alla componente muscolare e vascolare, il m. è costituito da tessuto connettivo, cellule e fibre collagene. Queste ultime sono formate da una famiglia di proteine prodotte da specifiche sequenze geniche, ma con differenti proprietà fisiche e biochimiche (V. COLLAGENE, IV, 500; *1788). Nel cuore prevalgono il collagene tipo I e III, sintetizzato dai fibroblasti nell'interstizio; il collagene tipo IV è il maggior componente della membrana basale dei miociti, che possiedono gli strumenti di sintesi per tale tipo di collagene. Al processo isolato di ipertrofia miocitica, si associa iperplasia della componente cellulare non miocitica, in particolare l'attivazione dei fibroblasti con accumulo di collagene tipo I e III nell'interstizio e nell'avventizia dei rami coronarici, con incremento della muscolatura liscia della parete vascolare; tutto questo conduce ad un rimodellamento della geometria ventricolare (V. RIMODELLAMENTO VENTRICOLARE**).

Dalla nascita all'età adulta, la frazione di collagene rimane costante in proporzione all'aumento della massa cardiaca. Nell'uomo il connettivo aumenta significativamente in corso di ipertrofia cardiaca sia da ipertensione arteriosa che da stenosi aortica, ma non altrettanto in corso di ipertrofia fisiologica da esercizio fisico. In vari modelli sperimentali, l'incremento del connettivo provoca una riduzione della distensibilità ventricolare sinistra, fenomeno descritto in corso di ipertensione arteriosa ma non in corso di ipertrofia associata ad ipertiroidismo, permanendo non definiti i rapporti fra connettivo, ipertrofia ed alterazione della funzione diastolica. Il collagene regredisce con la somministrazione di ACE-inibitori (V. ANGIOTENSINA, INIBITORI DELL'ENZIMA DI CONVERSIONE DELLA**), ma non con vari tipi di vasodilatatori; peraltro, la rimozione dello stimolo ipertrofizzante è in grado

di indurre una regressione della ipertrofia miocitaria, ma non sempre del connettivo, almeno in alcuni modelli sperimentali a differenza di altri. Nell'uomo la quota di collagene non si modifica a breve e a lungo termine dopo sostituzione valvolare in pazienti con stenosi aortica.

Modificazioni nella funzione sistolica e diastolica

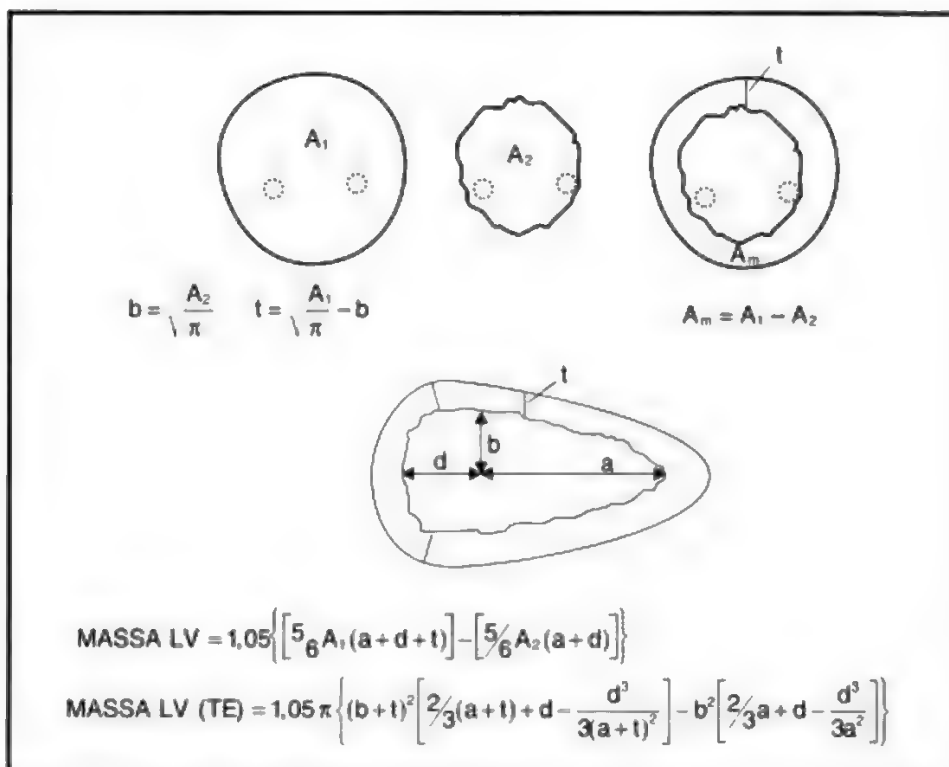
Nelle fasi precoci dell'ipertrofia, la *funzione sistolica* permane clinicamente inalterata. Sperimentalmente, a livello miofibrillare, la velocità di accorciamento è ridotta, ma nell'organismo *in vivo* la prestazione sistolica, ad es. la frazione di eiezione ventricolare, è mantenuta normale ad opera di vari meccanismi compensatori che includono il meccanismo di Starling e l'attivazione della regolazione simpatica; ne deriva nella pratica clinica l'impossibilità di una reale definizione diagnostica della funzione del muscolo cardiaco disgiunta dalla funzione di pompa.

I parametri analitici della *funzione diastolica* sono i più precoci ad essere anche isolatamente alterati nello sviluppo del processo di ipertrofia cardiaca. Le quattro successive fasi che comprendono il periodo diastolico possono essere interessate: sia le due prime, cioè il rilasciamento isovolumetrico ed il riempimento rapido, legate a meccanismi attivi da consumo energetico e come tali definibili dal fisiologo come facenti parte integrante della sistole nel suo complesso quali eventi terminali, sia la diastasi passiva ed il riempimento dovuto alla contrazione atriale. Per il cardiologo clinico, nella comune accezione della fase diastolica, lo studio ecocardiografico-Doppler mette in evidenza un certo grado di alterazione del riempimento diastolico legato all'incremento della massa miocardica, ma che può anche precedere un quadro documentabile di ipertrofia ventricolare. L'alterata prestazione diastolica può derivare da modificazioni sia delle miocellule che del tessuto connettivo. Risulta dimostrabile una ridotta distensibilità miocardica nell'ipertrofia indotta sperimentalmente, con aumento della rigidità muscolare, prima del riscontro di modificazioni del tessuto connettivo. Questo suggerisce una ridotta «compliance» dovuta ad un processo miocitario attivo, come il persistere di una attività basale dell'apparato contrattile durante la diastole. Tale meccanismo non sembra predominare in ogni tipo di ipertrofia, ma risulta più marcato ad es. nell'ipertrofia da sovraccarico pressorio, rispetto all'ipertrofia cosiddetta «fisiologica». Lo stesso carico pressorio è in grado di indurre un incremento della concentrazione in collagene o un rimodellamento del collagene stesso. Esiste una dimostrazione sperimentale del ruolo dell'aldosterone e dell'angiotensina II nella genesi della fibrosi miocardica. Per contro, nell'ipertrofia da sovraccarico di volume, pur in presenza di modificazioni quantitative nella composizione delle isoforme di collagene, la concentrazione complessiva di collagene rimane inalterata.

In corso di ipertrofia cardiaca, la riduzione del processo di rilasciamento attivo va in parallelo con il calo della velocità di accorciamento miocellulare; tale dato dimostra che il sovraccarico cardiaco cronico è sostanzialmente associato con un calo nella densità di $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasi}$ del reticolo sarcoplasmatico. Il potenziamento dell'attività atriale assume un significato compensatorio del ridotto riempimento ventricolare. Il m. atriale normale contiene pressoché *in toto* l'isoforma miosinica veloce V1; in corso di ipertrofia si realizza uno spostamento isogenico verso l'isoforma lenta V3. Questa modificazione è correlata con la dimensione atriale e fornisce una ragionevole giustificazione del processo attivo atrio-dipendente di potenziamento del riempimento ventricolare.

V. anche: CIRCOLATORIO APPARATO, III, 2297-2318; *1563-1576.

Fig. 1. Illustrazione schematica che presenta il metodo di misurazione della massa ventricolare sinistra con la tecnica area-lunghezza (AL) e dell'ellissoide tronco (TE). Prospetto ventricolare in asse corto, a livello dei muscoli papillari, con la superficie miocardica (A_m) ricavabile dalla differenza fra le aree contenute nei perimetri pericardico (A_1) ed endocardico (A_2); t = spessore miocardico; b = raggio in asse corto ricavabile da A_1 . In asse lungo, a = distanza da b all'apice; d = distanza da b al piano mitralico.



Note di ecocardiografia-Doppler

L'ecocardiografia (v.*; v.***) bidimensionale consente di visualizzare la presenza, l'entità e la distribuzione dell'ipertrofia miocardica. L'esame *M-mode* rimane una affidabile metodica di misurazione quantitativa dello spessore parietale, che tuttavia può essere valutato in misura affidabile con l'esame bidimensionale, ad es. in proiezione parasternale «asse corto», con una buona definizione dell'endocardio. La fig. 1 illustra la tecnica raccomandata per calcolare la massa ventricolare sinistra, oltre al volume cavitario; la combinazione dell'immagine parasternale «asse corto» con la proiezione apicale a «quattro camere» per la lunghezza

della cavità consente di misurare la massa miocardica con la tecnica area-lunghezza e dell'ellissoide tronco. Lo spessore parietale e le dimensioni della cavità possono essere combinati con la pressione arteriosa per ottenere una misura dello stress parietale del ventricolo sinistro ipertrofico.

L'esame ecocardiografico-Doppler, utilizzato per valutare il riempimento diastolico ventricolare attraverso l'analisi del flusso transmitralico mediante tecnica ad onda pulsante, è in grado di definire la funzione diastolica, ma non in termini assoluti e per di più non specifici, quando questa viene esaminata in presenza di ipertrofia-dilatazione del cuore (fig. 2).

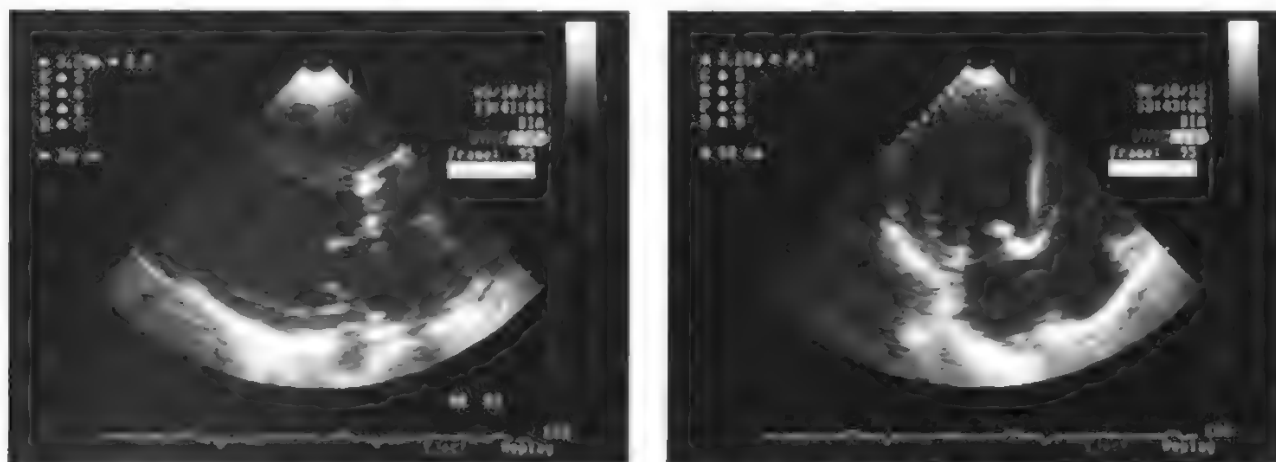


Fig. 2. Ecocardiogramma bidimensionale nelle proiezioni parasternale asse lungo ed apicale a «quattro camere» in un paziente con ipertrofia e dilatazione ventricolare sinistra.

Il cuore d'atleta

L'ipertrofia cardiaca nell'atleta può essere considerata come una risposta fisiologica ad un sovraccarico di lavoro pressorio o volumetrico che si sviluppa a lungo termine. Un sovraccarico pressorio si realizza nell'atleta sottoposto a stress isometrico, come i sollevatori di pesi, con un incremento del post-carico e sviluppo di ipertrofia concentrica. Per contro, lo stress isotonic dello sport di «endurance» richiede un prolungato incremento della portata cardiaca, con limitato o nessun aumento del post-carico; tale carico volumetrico induce una dilatazione armonica delle camere cardiache e segnatamente del ventricolo sinistro. Nelle due condizioni, la valutazione ecocardiografica consente di verificare un proporzionale assetto cavitario, con valori di stress parietale miocardico normalizzato in relazione alla legge di Laplace (v. IX, 1629). Sotto questo profilo, lo spessore parietale ed il diametro cavitario possono essere incrementati, ma generalmente permangono entro limiti armonici; a fronte di ciò, la prestazione contrattile ed in particolare la funzione diastolica rimangono conservate nell'ambito di una ipertrofia «fisiologica», a differenza di quanto rilevabile in altre condizioni di patologia cardiaca.

V. anche: **SPORT, MEDICINA DELLO, Sport e apparato cardiovascolare. Il cuore d'atleta**, XIV, 896-910.

Ipertrofia e cuore senile

Il cuore dell'anziano esente da malattie cardiovascolari non va incontro ad un aumento della massa contrattile, contrariamente all'opinione comune di un aumento del peso cardiaco con l'età. Si osserva peraltro un calo del numero di miociti, cioè una perdita di unità contrattili, con ipertrofia compensatoria di quelle residue. La correlazione di segno negativo, tra il numero di cellule della parete ventricolare ed età, si accentua quando all'invecchiamento si associa un processo di ipertrofia. La frazione di collagene nel cuore senile sembra rimanere costante coll'avanzare dell'età: sono tuttavia riscontrabili piccoli focolai di fibrosi sostitutiva, associata alle frequenti e varie cause di distruzione miocitaria. Accanto alle alterazioni strutturali, sia miocitarie che interstiziali, con progressivo incremento dello stress nelle cellule residue, nel cuore senile specie se ipertrofico si associano modificazioni funzionali derivanti da un diverso assetto nella risposta agli stimoli neuroumorali, che possono giustificare, almeno in parte, l'alterata prestazione ventricolare ed in particolare diastolica.

La quota di β MHC (v. sopra) aumenta con la senescenza, quale possibile evento adattativo nell'espressione genetica, con ridotta espressione di Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico. L'età sembra comportare, almeno sotto il profilo sperimentale, un calo nella espressione di protoncogeni ed un aumento della quota di isoforme β MHC in risposta ad uno stimolo ipertrofizzante.

Bibliografia

- Anversa P., Hiler B., Ricci R. et al., *J.A.C.C.*, 1986, **8**, 1441.
 Astori E., Olivetti G., *Heart and Circulation*, 1992, **1**, 5.
 Boluyt M. O., O'Neill L., Meredith A. L. et al., *Circ. Res.*, 1994, **75**, 23.
 Chevalier B., Callens El Amrani F., Heymes C. et al., *Am. J. Cardiol.*, 1994, **73**, 10C.
 Gorza L., Mercadier J. J., Schwartz K. et al., *Circ. Res.*, 1984, **54**, 1.
 Gorza L., Padoa-Schioppa C., Padoa M. et al., *Eur. Heart J.*, 1993, **14**, 40.
 Mercadier J. J., Padoa-Schioppa C., Gorza L. et al., *Circ. Res.*, 1983, **53**, 52.
 Mondry A., Swingedauw B. et al., *Eur. Heart J.*, 1995, **16** (1), 64.
 Morkin E., *Circulation*, 1993, **87**, 1151.
 Olivetti G., Melissari M., Balbi L. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1994, **24** (1), 140.
 Olivetti G., Melissari M., Capasso J. et al., *Circ. Res.*, 1991, **68**, 160.
 Olpe L. H., *Il cuore, fisiologia e metabolismo*, 1993, Hoepli, Milano.

- Pollack P. S., Houser S. R., Budjak R. et al., *J. Cell. Biochem.*, 1994, **54**, 78.
 Puri P. L., Natoli G., Avataggiati M. L. et al., *Ann. Ital. Med. Int.*, 1994, **9**, 160.
 Schiaffino S., Samuel J. L., Sassoon D. et al., *Circ. Res.*, 1989, **64**, 694.
 Schiller N. B., *Circulation*, 1991, **84** (suppl. 1), 280.
 Schwartz K., Chassagne C., Bohelac K. L. et al., *J.A.C.C.*, 1993, **22** (A), 30.
 Swinghedauw B., *Physiol. Rev.*, 1989, **66**, 710.
 Takahashi T., Schunkert H., Itoyama A. et al., *J. Clin. Invest.*, 1992, **89**, 939.
 Visioli O., La Canna G., in Teodori U. e Gentilini P. eds., *Trattato di Medicina Interna*, 1993, vol. I, Universo, Roma, p. 591.
 Weber K. T., Brilla C. G., *Circulation*, 1991, **83**, 1849.

EDUARDO VISIOLI E ETTORE ASTORRI

MIOCARDIOPATIE (Cardiomiopatie) [v. vol. IX, coll. 1646-1744; Agg. I, coll. *5165-5179]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3708). - **Definizione e classificazione** (col. 3708): *Cardiomiopatia dilatativa*. - *Cardiomiopatia ipertrofica*. - *Cardiomiopatia restrittiva*. - *Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro*. - *Cardiomiopatie non classificate*. - *Cardiomiopatie specifiche*. - **Genetica e biologia molecolare** (col. 3710): *Cardiomiopatia ipertrofica*. - *Cardiomiopatia dilatativa*. - *Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro*.

Introduzione

All'interno dell'argomento generale delle cardiomiopatie [c.], sono stati prodotti, negli ultimi anni, importanti contributi soprattutto in tema di classificazione, nosografia e genetica molecolare.

La definizione ed i criteri di classificazione delle c. sono stati recentemente rivisti dalla Organizzazione Mondiale della Sanità e dalla International Society and Federation of Cardiology (Report WHO/ISFC, 1995). Rispetto al precedente documento, che risale al 1984 (Report WHC/ISFC, 1984), le variazioni sono numerose e significative. La «classica» definizione di c. faceva infatti espresso riferimento alla «assenza di una causa nota e/o di una malattia sistemica» nell'ambito della quale riferire la malattia miocardica. Si distinguevano tre forme di c. (ipertrofica, dilatativa e restrittiva) ed una lunga serie di «malattie specifiche del miocardio» definite viceversa dalla presenza di una causa nota a cui ascrivere la malattia. Tale sistema classificativo è entrato progressivamente in crisi negli ultimi anni in seguito ad alcune circostanze e precisamente:

a) il progresso delle conoscenze nel campo della biologia molecolare, che ha consentito di identificare una base genetica, e quindi una probabile causa, nella maggioranza dei casi di c. ipertrofica ed in un terzo circa dei pazienti con c. dilatativa;

b) l'identificazione di una «nuova» c., prevalentemente a carico del ventricolo destro, con sostituzione adiposa o fibroadiposa del miocardio e ad estrinsecazione clinica prevalentemente aritmica (la *cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro*; v. MIOCARDIOPATIE*, coll. *5177-5179);

c) l'uso sempre più esteso nella comunità medica del termine «*cardiomiopatia*» per indicare qualsiasi condizione clinica con esteso e importante deficit funzionale del miocardio ventricolare, indipendentemente dall'esistenza o meno di una causa identificabile.

Definizione e classificazione

Nell'attuale proposta di classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e della International Society and Federation of Cardiology (Report WHO/ISFC, 1995) l'«assenza» della definizione di c. non consiste più nella mancanza di una causa nota. Molto più pragmaticamente le *cardiomiopatie* sono definite come *malattie miocardiche as-*

sociate a disfunzione cardiaca, e classificate in quattro forme: *cardiomiopatia dilatativa*, *cardiomiopatia ipertrofica*, *cardiomiopatia restrittiva* e *cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro*.

Cardiomiopatia dilatativa

È caratterizzata da dilatazione e ridotta contrattilità del ventricolo sinistro o di entrambi i ventricoli. Può essere idiopatica, familiare-genetica, virale e/o immune, tossica-alcolica. L'istologia è non specifica. Il quadro clinico di presentazione è più spesso lo scompenso cardiaco, generalmente progressivo. Le aritmie, i fenomeni tromboembolici e la morte improvvisa sono comuni e possono accompagnare tutte le fasi della malattia.

Cardiomiopatia ipertrofica

È caratterizzata da ipertrofia del ventricolo sinistro e/o del ventricolo destro, più spesso con interessamento asimmetrico del setto interventricolare. Tipicamente il volume della cavità ventricolare sinistra è normale o ridotto. Le aritmie ventricolari e la morte improvvisa sono frequenti.

Cardiomiopatia restrittiva

È caratterizzata da un quadro di riempimento ventricolare di tipo restrittivo e da un ridotto volume diastolico ventricolare (destro e/o sinistro) in presenza di funzione sistolica e di spessori parietali dei ventricoli normali o pressoché normali.

Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro

Si caratterizza per la progressiva sostituzione fibroadiposa del miocardio ventricolare destro con una distribuzione inizialmente distrettuale ma che, nelle fasi successive, può divenire globale ed interessare eventualmente anche il ventricolo sinistro. È frequente la presentazione clinica con aritmie ventricolari oppure con morte improvvisa giovanile (v. MIOCARDIOPATIE*, coll. *5177-5179).

Cardiomiopatie non classificate

Sotto la dizione di c. non classificate, l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la International Society and Federation of Cardiology includono i rari casi non inquadrabili all'interno delle quattro forme precedentemente elencate, spesso per la coesistenza di caratteristiche proprie di più di una c.

Cardiomiopatie specifiche

Il termine c. specifiche viene usato per indicare quelle forme di c. associate a specifiche malattie cardiache o sistemiche (le «malattie specifiche del miocardio» della precedente classificazione). Vengono riportate di seguito le principali forme e la relativa definizione:

- *cardiomiopatia ischemica*: situazione a tipo c. dilatativa in cui il deficit contrattile appare sproporzionato in eccesso rispetto all'entità della coronaropatia e del danno ischemico;

- *cardiomiopatia valvolare*: caratterizzata dalla presenza di disfunzione ventricolare sproporzionata in eccesso rispetto al sovraccarico emodinamico;

- *cardiomiopatia ipertensiva*: caratterizzata da ipertrofia ventricolare sinistra associata a manifestazioni di scompenso cardiaco con fisiopatologia ventricolare di tipo «dilatativo» o «restrittivo»;

- *cardiomiopatia infiammatoria*: definita dalla presenza di miocardite in associazione a disfunzione cardiaca. Si riconoscono forme infiammatorie idiopatiche, autoimmuni e infettive;

- *cardiomiopatie metaboliche*: *endocrine* (ad es. tireotossicosi, ipotiroidismo, insufficienza corticale surrenale, feo-

cromocitoma, diabete mellito), nell'ambito di *malattie familiari infiltrative o da accumulo* (emocromatosi, glicogenosi, sindrome di Hurler, di Refsum, malattia di Niemann-Pick, di Hand-Schüller-Christian, di Fabry-Anderson, di Morquio-Ullrich), da *amiloidosi* (primaria, secondaria, familiare, senile, febbre familiare mediterranea);

- *cardiomiopatie nell'ambito di malattie sistemiche* (ad es. connettiviti, sarcoidosi, leucemie);

- *cardiomiopatie associate a distrofie muscolari*: malattia di Duchenne, malattia di Becker (v. DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI [v.; v.*; v.**]) e distrofie miotoniche (v. MIOTONICHE SINDROMI**);

- *cardiomiopatie associate a malattie neuromuscolari*: l'elenco comprende l'atassia di Friedreich, la sindrome di Noonan e la lentiginosi multipla;

- *cardiomiopatie tossiche o allergiche*: forme alcoliche, da antracicline, da irradiazione, etc.;

- *cardiomiopatia peripartum*: gruppo eterogeneo con manifestazioni cliniche nell'ultima fase della gravidanza o nel primo periodo dopo il parto (v. PARTO*, *cardiomiopatia dilatativa peripartum*, col. *5715).

Genetica e biologia molecolare

Cardiomiopatia ipertrofica

L'incidenza familiare rappresenta uno degli aspetti della c. ipertrofica noti da più tempo. Un classico studio ecocardiografico relativo a 60 famiglie indicava, nel 1984, una base genetica nel 56% dei casi con una modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante ed una elevata penetranza (Maron *et al.*, 1984).

Di fronte ad una malattia a trasmissione eredo-familiare sono possibili, in linea generale, due approcci per l'identificazione dell'esatta base genetica: il *functional cloning* ed il *positional cloning* (Schwartz *et al.*, 1995). Il *functional cloning* presuppone la conoscenza preliminare del difetto biochimico alla base della malattia. Da qui si passa all'individuazione della proteina anomala, primo passo per la identificazione del gene responsabile e delle sue mutazioni. In mancanza di informazioni sul deficit biochimico specifico, come nel caso della c. ipertrofica, la biologia molecolare offre la possibilità dell'*analisi di linkage*. La tecnica presuppone la disponibilità di vasti nuclei familiari con una chiara distinzione fra membri affetti e membri non affetti. Lo scopo è la dimostrazione che, all'interno del nucleo familiare, la malattia è coereditata assieme ad una particolare porzione del DNA (*marker* polimorfico) di cui è nota la localizzazione all'interno di un determinato cromosoma (cosegregazione). Se il *marker* è situato in prossimità del gene responsabile tenderà ad essere trasmesso assieme alla malattia. Se il *marker* è fisicamente lontano dal gene tenderà a venire separato durante la meiosi dai numerosi processi di *crossover* e di ricombinazione. Una volta identificato il *locus* cromosomico geneticamente associato alla malattia, il passo successivo è rappresentato dalla ricerca, all'interno del *locus*, dello specifico gene responsabile (*positional cloning*).

La c. ipertrofica è stata la prima malattia miocardica ad essere affrontata con le moderne tecniche della biologia molecolare. Nell'arco degli ultimi anni i tentativi di identificare l'esatta base genetica della c. ipertrofica hanno dato i primi risultati concreti. Nel 1989, per la prima volta, il gruppo di biologi molecolari della Harvard Medical School di Boston (USA) ha identificato nel cromosoma 14(14q1) il primo *locus* genetico coinvolto nella trasmissione della malattia (Jarcho *et al.*, 1989). Lo stesso gruppo di ricercatori, l'anno successivo, ha identificato, come gene responsabile, il gene che codifica per le catene pesanti β della miosina

MIOCARDIOPATIE

cardiaca (Geisterfer-Lowance *et al.*, 1990). Si tratta di un gene particolarmente lungo, comprendente 40 esoni che codificano una proteina di 1936 aminoacidi con massa molecolare di 220 kd. Negli ultimi 4 anni sono state identificate, a livello di tale gene, circa 40 singole mutazioni (tutte tranne una di tipo *missense*) responsabili di altrettante forme familiari di c. ipertrofica (Schwartz *et al.*, 1995). Dal 1993 ad oggi sono stati identificati altri 5 geni responsabili della codifica di altrettante proteine mutanti (tab. I): α -tropomiosina (15q2), troponina T (1q3), proteina C che lega la miosina (11p11) ed inoltre 2 distinti geni che codificano per le catene leggere della miosina (Spirito *et al.*, 1997).

Nel complesso emergono due considerazioni di carattere generale:

a) la c. ipertrofica è una malattia geneticamente eterogenea con eterogeneità sia intragenica (differenti possibili mutazioni all'interno di uno stesso gene), sia eterogenica (differenti geni coinvolti);

b) la c. ipertrofica può essere considerata come una malattia del sarcomero in quanto tutte le proteine mutanti sino ad ora identificate sono componenti strutturali del sarcomero.

Avere identificato alcune delle mutazioni geniche alla base delle forme familiari della malattia non significa necessariamente essere riusciti a delineare la concatenazione degli eventi che dalla proteina mutante conduce alla piena espressione fenotipica della c. Partendo dalla constatazione dell'esistenza di una proteina contrattile mutante (e ad efficienza meccanica ridotta), è legittimo ipotizzare che l'ipertrofia si sviluppi in via secondaria o compensatoria e che tale processo sia modulato da altri sistemi di regolazione, ambientali e genici (ad es. il sistema genico dell'enzima di conversione dell'angiotensina).

Poiché la c. è una malattia altamente eterogenea sotto il profilo sia genotipico sia fenotipico è legittimo ipotizzare la possibilità di correlazioni fra genotipo e fenotipo. Le ricerche in tale campo sono però ad un livello iniziale e non è possibile attualmente associare ad un determinato gene mutante o ad una determinata mutazione puntiforme un corrispettivo, costante quadro fenotipico. Le principali conoscenze già acquisite sulla correlazione genotipo-fenotipo riguardano la prognosi della malattia. Si sa ad esempio che alcune mutazioni nel gene della β -miosina (ad es. Arg249Gln o Arg453Cys) comportano un'elevata mortalità

mentre altre si associano ad una aspettativa di vita pressoché normale o solo lievemente ridotta. Si sa inoltre che le forme dovute a mutazione della proteina C che lega la miosina sono a penetranza ridotta. In altri termini, l'espressione fenotipica della malattia può avvenire solo dopo il quarto-quinto decennio di vita (Niimura *et al.*, 1998).

Quadri ecocardiografici ed elettrocardiografici del tutto tipici di c. ipertrofica sono stati inoltre riscontrati in altre malattie eredo-familiari quali la sindrome di Noonan (v. NOONAN, SINDROME DI**), la «sindrome leopard» (v. LENTIGINE, VIII, 1417), l'atassia di Friedreich (v. FRIEDREICH, MALATTIA DI**).

Cardiomiopatia dilatativa

Le conoscenze sulla patogenesi e sulla genetica della c. dilatativa sono nel complesso inferiori rispetto a quelle accumulate per la c. ipertrofica.

Nell'arco degli ultimi 10 anni, grazie a studi ecocardiografici e clinici dei familiari dei pazienti affetti, è divenuto comunque sempre più evidente che una percentuale compresa fra il 20% e il 30% delle forme di c. dilatativa presenta una chiara familiarità per la stessa malattia, più spesso con modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante (Mestroni *et al.*, 1995). Contemporaneamente è stata documentata l'esistenza di forme trasmesse attraverso il cromosoma X e di forme trasmesse attraverso il DNA mitocondriale.

L'unica proteina mutante identificata (nel caso delle forme *X-linked*) è la *distrofina*, che lega il citoscheletro del sarcomero alla matrice extracellulare.

L'ipotesi che proteine mutanti del sarcomero potessero essere implicate nella genesi della c. dilatativa è stata presa in considerazione ma sino ad ora smentita. Viceversa è ritenuto probabile il coinvolgimento di altre proteine strutturali del citoscheletro, di supporto rispetto alle proteine contrattili (Leiden, 1997).

1. *Cardiomiopatia dilatativa autosomica dominante*. – Il primo locus della malattia ad essere identificato è stato mappato a livello del cromosoma 9 (q13-q22) (Krajinovic *et al.*, 1995). Sono stati successivamente identificati perlomeno altri 2 loci: 1q31-32, 10q21-q23.

I casi riconducibili a tali loci presentano le classiche caratteristiche cliniche, elettrocardiografiche ed ecocardiografiche della c. dilatativa. In alcuni nuclei familiari (nel complesso rari) la comparsa di dilatazione-ipocinesia del ventricolo sinistro è invece preceduta da blocco atrio-ventricolare avanzato. In tali forme il locus genetico coinvolto nella trasmissione della malattia è stato identificato nella regione centromerica del cromosoma 1 (1p1-q1) e nel cromosoma 3 (3p22-p25) (Mestroni *et al.*, 1995).

2. *Cardiomiopatia dilatativa X-linked*. – È noto da tempo che alcuni pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne o di Becker presentano, accanto alla tipica distrofia progressiva della muscolatura scheletrica (v. DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI**), una vera e propria cardiomiopatia dilatativa, in alcuni casi responsabile dell'*exitus* del paziente. Negli ultimi anni è stata documentata l'esistenza di una cardiomiopatia familiare *X-linked* in soggetti senza alcun segno di compromissione dei muscoli scheletrici, cioè con diminuzione della distrofina nel muscolo cardiaco ma con normale distrofina nei muscoli scheletrici. Si tratta di soggetti di sesso maschile che sviluppano in età giovanile una forma spesso rapidamente progressiva di c. dilatativa. Le portatrici di sesso femminile possono presentare una forma più sfumata della c. dilatativa con esordio più tardivo e progressione più lenta.

Il gene responsabile della malattia è quello della *distrofina*, proteina del citoscheletro che svolge un ruolo importante per la stabilità della membrana cellulare e la trasmissi-

TAB. I. GENETICA DELLA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA FAMILIARE.

Simbolo delle varianti	MIM No.*	Cromosomi	Locus/Gene	Difetto
CMH1	192600	14q11	<i>MYH7</i>	Catene pesanti β della miosina cardiaca
CMH2	115195	1q3	<i>TNNT1</i>	Troponina T
CMH3	115196	15q2	<i>TPM1</i>	α -tropomiosina
CMH4	115197	11p11.2	<i>MYBP-C</i>	proteina C che lega la miosina cardiaca
CMH5	115198	?		
CMH6		7q3		

* Dati ripresi da McKusick V. A., *Mendelian Inheritance in Man* (MIM), 12 ed., 1998, Johns Hopkins University Press, Baltimore.

sione della forza contrattile. Anche in questo caso è già stata identificata più di una mutazione (eterogeneità intragenica) (Mestroni *et al.*, 1995; Leyden, 1997; Muntoni *et al.*, 1995).

Tra le c. dilatative *X-linked* è da segnalare la *sindrome di Barth* (Barth, 1983) che è stata mappata nella porzione distale del cromosoma Xq28 (v. BARTH, SINDROME DI**, coll. **712-714). Il gene corrispondente (G.4.5) è stato identificato (Bione *et al.*, 1996): sembra poter codificare per 10 diverse proteine, dette *tafazzine*. I pazienti presentano c. dilatativa, neutropenia, miopatia scheletrica e bassa statura. La maggior parte dei bambini maschi affetti muoiono nei primi mesi di vita per arresto cardiaco o per infezioni.

3. *Cardiomiopatie mitocondriali*. – Il DNA mitocondriale è caratterizzato dalla provenienza esclusivamente materna, dalla assenza di introni, dalla assenza di sistemi di autoriparazione del DNA, da una elevatissima frequenza di mutazioni (circa 10 volte superiore rispetto al DNA nucleare).

Le sindromi mitocondriali sono caratterizzate, oltre che dalla trasmissione matrilineare, dall'interessamento contemporaneo di numerosi organi ed apparati. Lo sviluppo di una c. (generalmente con ipertrofia parietale, dilatazione ed ipocinesia ventricolare) è un evenienza frequente in molte di tali sindromi, ad es. la MELAS (encefalomiopatia, acidosi lattica, episodi *stroke-like*), la MERF (epilessia mioclonica con lacerazioni delle fibre rosse muscolari), la sindrome di Kearns-Sayre (v. MITOCONDRI [v.*; v.**]; MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**).

Delezioni multiple del DNA mitocondriale sono state descritte in casi con forme apparentemente isolate di c. dilatativa anche se il significato patogenetico di tale dato non è univoco (Mestroni *et al.*, 1995; Leiden, 1997).

Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro

In almeno un terzo dei soggetti affetti è documentabile una trasmissione familiare della malattia. Tre *loci* sono stati visti cosegregare con la c. aritmogena in grandi nuclei familiari: due differenti *loci* sul cromosoma 14 (14q23-q24 e 14q12-q22) ed uno sul cromosoma 1 (1q42-q43) (Rampazzo *et al.*, 1994; Rampazzo *et al.*, 1995; Severini *et al.*, 1996). Anche questa forma di c., pertanto, appare eterogena sotto il profilo genetico.

Pertanto l'etiopatogenesi della malattia è nel complesso ancora interamente sconosciuta. Nessuno specifico gene è stato identificato. In alcuni casi il tipico substrato istologico di infiltrazione fibroadiposa si associa a segni di infiammazione miocardica; è frequente inoltre il riscontro di intensa apoptosi dei miociti.

Bibliografia

- Barth P. G. *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 1983, **62**, 327-355.
Bione S. *et al.*, *Nature Genetics*, 1996, **12** (4), 385-389.
Geisterfer-Lowrance A. T. *et al.*, *Cell*, 1990, **62**, 99-100.
Krajcinovic *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, **57**, 846-852.
Jarcho J. A. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1989, **321**, 1372-1378.
Leiden J. M., *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 1080-1081.
Maron B. J. *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 1984, **53**, 1087-1094.
Mestroni M. L. *et al.*, *Eur. Heart J.*, 1995, **16** (Suppl.), 5-9.
Muntoni F. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1995, **96**, 693-699.
Numura H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (18), 1248-1257.
Rampazzo A. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1994, **3**, 959-962.
Rampazzo A. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1995, **4**, 2151-2154.
Report of the WHO/ISFC Task Force, *Circulation*, 1995, **93**, 841-842.
Report of the WHO/ISFC Task Force, *Br. Heart J.*, 1984, **44**, 672-673.
Schwartz K. *et al.*, *Circulation*, 1995, **91**, 532-540.
Severini G. M. *et al.*, *Genomics*, 1996, **31**, 193-200.
Spirito P. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (11), 775-785.
Wynne J., Braunwald E., *The Cardiomyopathies and Myocarditis*, in Braunwald E., *Heart Disease*, 5 ed., 1997, Saunders, Philadelphia, pp. 1404-1434.

BRUNO MAGNANI, CLAUDIO RAPEZZI E FABIO COCCOLO

MIOGLOBINE [v. vol. IX, coll. 1751-1759; Agg. 1, coll. *5180-5182]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3714). - Aspetti strutturali (col. 3714). - Aspetti funzionali (col. 3714). - Ruolo antiossidante della mioglobina (col. 3715). - Metodi per la determinazione della mioglobina (col. 3716).

Introduzione

La mioglobina è una emoproteina respiratoria presente nelle fibre muscolari la cui funzione principale è quella di facilitare il trasporto dell'ossigeno dai capillari ai mitocondri. Inoltre, negli animali polmonati adattati alla vita acquatica, tale emoproteina svolge la funzione di riserva dell'ossigeno.

Aspetti strutturali

A tutt'oggi, è stata determinata la sequenza di 88 m. monomeriche appartenenti a specie diverse. Inoltre, è stata ottenuta la struttura tridimensionale, mediante la diffrazione dei raggi X, della forma nativa e di alcuni mutanti delle m. monomeriche umana, del cavallo, del maiale, della foca, del capodoglio, del tonno, della tartaruga marina *Caretta caretta*, e del gasteropode marino *Aplysia limacina*, in assenza ed in presenza dei leganti del ferro dell'eme. In particolare, recenti osservazioni spettroscopiche indicano che il monossido di carbonio si lega pressoché perpendicolarmente al ferro dell'eme, non soltanto nel caso dei composti modello, ma anche della m. di capodoglio, e non in modo angolato, come osservato per l'ossigeno.

Le m. monomeriche appartenenti a specie animali molto distanti nella scala evolutiva, pur mostrando una omologia della sequenza aminoacidica a volte inferiore al 20%, presentano una struttura tridimensionale molto simile, caratterizzata da sette od otto regioni di α -elica. I residui aminoacidici strettamente conservati in tutte le m. note sono soltanto due: l'istidina prossimale (HisF8), direttamente coordinata al ferro emico, ed il residuo di fenilalanina in posizione CD1, tangente alla porfirina nella zona compresa fra le eliche C e D della proteina (v. anche IX, 1755, fig. 2). Il corretto ripiegamento della sequenza aminoacidica della m., ed in parte la sua stabilità, dipendono dalla presenza di circa 30 aminoacidi di natura apolare, conservati nel corso dell'evoluzione, presenti nel cuore della proteina e di circa altrettanti residui polari, presenti in siti definiti sulla superficie della molecola.

Oltre alle m. monomeriche, presenti nei vertebrati e negli invertebrati, sono state identificate recentemente m. omodimeriche (caratterizzate, cioè, da due subunità identiche, ciascuna dotata di un centro di reazione del tipo eme) nei muscoli di alcuni molluschi della sottoclasse *Prosobranchia*, quali la *Nassa mutabilis*, il *Cherithidea rhizophorarum* ed il *Busycon canaliculatum*. Le m. omodimeriche appartenenti alla sottoclasse *Prosobranchia* presentano una notevole omologia di sequenza fra loro (maggiore del 50%). L'omologia di sequenza scende fino al 20% circa se si considerano le m. monomeriche dei vertebrati e dei molluschi appartenenti alla sottoclasse *Opisthobranchia* (quali l'*Aplysia juliana*, l'*Aplysia kurodai*, l'*Aplysia limacina* e la *Dolabella auricularia*). Pertanto, le due sottoclassi di molluschi *Prosobranchia* e *Opisthobranchia* sono molto vicine dal punto di vista evolutivo.

Aspetti funzionali

Le m. monomeriche presentano generalmente una elevata affinità per l'ossigeno ($P_{50} \approx 1$ mmHg). Ciò implica che tali emoproteine siano in grado di rilasciare soltanto una mo-

MIOGLOBINE

desta quota dell'ossigeno legato nelle normali condizioni metaboliche, in quanto la pressione parziale dell'ossigeno in una cellula difficilmente scende al di sotto di 2 mmHg, a meno che non intervengano fattori di regolazione (quali il lattato, il citrato, il fosfato inorganico, i fosfati organici ed i protoni).

L'affinità della m. di capodoglio e di cavallo per l'ossigeno risulta ridotta di dieci e tre volte, rispettivamente, per azione del lattato, un effetto che si esplica prevalentemente con la diminuzione della velocità di associazione dell'ossigeno a tali emoproteine monomeriche. Tale comportamento, che permette di considerare la m. come una proteina monomerica allosterica (cioè caratterizzata dalla coesistenza di almeno due stati, la cui predominanza è regolata dalla presenza di molecole effettrici, quali il lattato), è in accordo con osservazioni dinamiche che hanno messo in evidenza la presenza di una transizione strutturale rapida di tipo terziario, che accompagna la dissociazione del monossido di carbonio dalla m. di capodoglio. Tale evento, seppur contenuto dal punto di vista strutturale, può essere considerato analogo a quello osservato nelle catene del tetramero dell'emoglobina.

La dipendenza dell'affinità dell'ossigeno per la m. di capodoglio e di cavallo da parte di metaboliti, quali il lattato, è di notevole interesse, soprattutto per quanto concerne la fisiologia degli animali che compiono una rilevante attività fisica in condizioni di apnea, quali i mammiferi adattati alla vita acquatica. Infatti, in condizioni anaerobiche lattacide (v. LAVORO MUSCOLARE, VIII, 1245), il lattato che si accumula nei muscoli induce una diminuzione dell'affinità dell'ossigeno per la m., ovvero un aumento del rilascio del medesimo. Ciò consentirebbe una adeguata sintesi di ATP da parte dei mitocondri anche in condizioni di ipossia.

A differenza delle m. monomeriche, le m. omodimeriche dei molluschi presentano una minore affinità per l'ossigeno, ovvero valori della P_{50} pari a circa 5 mmHg, ed in genere una marcata cooperatività ($n = 1.5$). Ciò potrebbe suggerire che l'evoluzione della emoglobina tetramerică sia avvenuta a partire dalle m. ed emoglobine monomeriche passando attraverso le m. e le emoglobine dimeriche cooperative. Infatti, le m., le emoglobine e le eritrocruorine (v. V, 1394) monomeriche e dimeriche presentano proprietà strutturali e funzionali simili. Tuttavia, l'aggregazione delle catene mioglobiniche ed emoglobiniche negli omodimeri non ricalca necessariamente la struttura quaternaria riscontrata nel tetramero dell'emoglobina.

Infine, merita menzionare che, a tutt'oggi, le m. monomeriche sono fra le macromolecole esaminate maggiormente mediante mutagenesi sito-specifica. Tali studi hanno rappresentato uno dei primi esempi di analisi dettagliata genetico-funzionale di una proteina ed hanno consentito di attribuire ai singoli residui aminoacidici il ruolo specifico svolto nella modulazione della reattività verso i leganti.

Ruolo antiossidante della mioglobina.

La m., al pari dell'emoglobina, può essere considerata una proteina multifunzionale. Infatti, oltre a garantire un flusso costante di ossigeno all'interno del muscolo (facilitandone l'immagazzinamento e la diffusione dai capillari ai mitocondri), la m. è implicata nei meccanismi di difesa della fibra muscolare, contribuendo all'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (15, 16, 17), ed in particolare del perossido di idrogeno (H_2O_2) che è attualmente considerato uno dei più importanti e dannosi prodotti dell'attività metabolica. Infatti, la *metamioglobina* (Mb^{III}) e la *ossimioglobina* ($Mb^{III}O_2$), sebbene quest'ultima con una velocità molto inferiore, riducono l' H_2O_2 formando *ferrimioglobina* (Mb^{IV}). La ferrimioglobina è una specie estremamente dannosa perché capace di ossidare le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici.

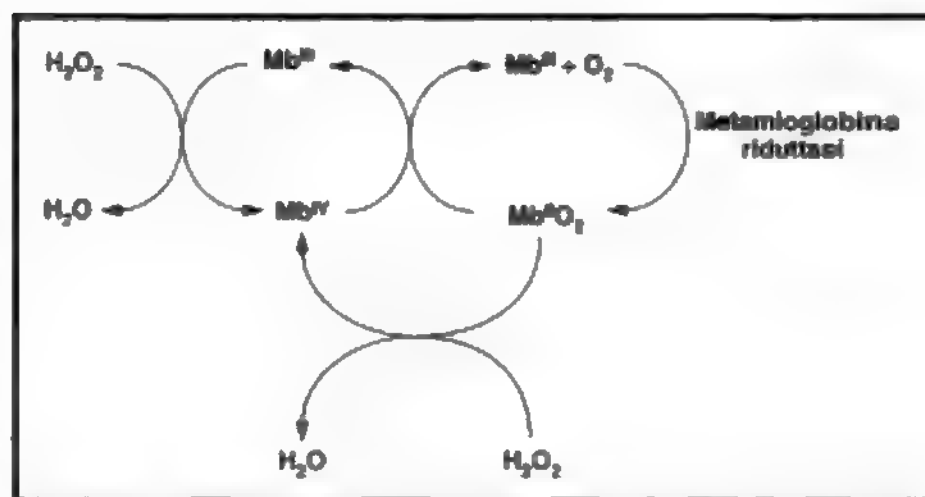


Fig. 1. Schema relativo all'eliminazione del perossido di idrogeno (H_2O_2) da parte della metamioglobina (Mb^{III}) e dell'ossimioglobina ($Mb^{III}O_2$), sebbene quest'ultima con una velocità molto inferiore. La metamioglobina e la ossimioglobina riducono l' H_2O_2 formando la ferrimioglobina (Mb^{IV}). La ferrimioglobina reagisce con la ossimioglobina rigenerando la metamioglobina, che a sua volta è ridotta ad ossimioglobina ad opera dell'enzima metamioglobina riduttasi.

In condizioni fisiologiche, la ferrimioglobina reagisce con la ossimioglobina rigenerando la metamioglobina, che a sua volta è ridotta ad ossimioglobina ad opera dell'enzima metamioglobina riduttasi (fig. 1).

Metodi per la determinazione della mioglobina

Il tessuto muscolare, miocardio incluso, è ricchissimo di m., la cui concentrazione media è di circa 4 mg per grammo di tessuto. Fisiologicamente, piccole quantità di m. vengono normalmente rilasciate dal tessuto muscolare nel siero, dove la concentrazione della emoproteina (*mioglobinemia*) è di circa 0,01-0,08 mg/L. Un aumento della mioglobinemia, e quindi la comparsa della *mioglobinuria*, è la diretta conseguenza di stati patologici a carico dei muscoli scheletrici e/o del cuore. Fra questi, merita menzionare l'infarto del miocardio, le polimiositi e la distrofia muscolare (tab. I). Per quanto riguarda l'infarto miocardico (v.; v.*; v.**), l'aumento del livello ematico della m. (concentrazioni superiori a 0,1 mg/L sono ritenute significative) è attualmente considerato un indice estremamente sensibile e precoce del danno cardiaco, anche in pazienti con quadri elettrocardiografici nei limiti della norma. È stato, inoltre, dimostrato

TAB. I. PRINCIPALI CAUSE DI IPERMIOGLOBINEMIA E MIOGLOBINURIA

Cause genetiche
- Deficienza della carnitina palmitil-transferasi
- Deficienza della fosfofruttochinasi
- Distrofia muscolare
- Deficienza della fosforilasi
- Ipertermia maligna
Cause metaboliche
- Miopatia alcolica
- Intossicazione da monossido di carbonio
- Ipotassiemia
- Malattia di McArdle
Cause traumatiche ed ischemiche
- Sindromi rabdomiolitiche
- Necrosi muscolare su base ischemica
Cause autoimmuni
- Dermatomiositi
- Polimiositi

che l'aumento della m. sierica precede anche quello dell'enzima CK-MB (creatinchinasi di origine cardiaca) che è tuttora considerato un indice patognomonico dell'infarto del miocardio. Queste caratteristiche (precocità e sensibilità) fanno del dosaggio della m. sierica un test di fondamentale importanza nella diagnosi e quindi nella terapia e prognosi dell'infarto del miocardio. Infatti, la terapia trombolitica, che ha significativamente ridotto la mortalità conseguente all'infarto del miocardio, deve essere instaurata entro poche ore dall'insorgenza del danno miocardico e per far ciò occorrono test diagnostici precoci e sensibili.

Fino a quattro o cinque anni fa, i metodi elettivi per il dosaggio della m. nel siero erano o saggi radioimmunologici o test di agglutinazione al latex. I primi, sebbene estremamente sensibili, sono poco adatti per il laboratorio d'urgenza in quanto estremamente lunghi, complessi e costosi. I secondi, sono dei saggi semiquantitativi, con una scarsa attendibilità diagnostica per l'alta frequenza di falsi negativi. Attualmente, nella comune pratica di laboratorio, il dosaggio della m. nel siero e nelle urine viene effettuato con metodi immunoturbidometrici ed immunonefelometrici (v. *3639; v. anche CHIMICA CLINICA**) che accoppiano ad una elevata sensibilità (paragonabile a quella dei metodi radioimmunologici) una facilità e rapidità d'esecuzione.

V. anche: EMOGLOBINE [v.; v.*; v.**]; MIOGLOBINE [v.; v.*]; MUSCOLO [v.; v.*].

Bibliografia

- Ansari A., Jones C. M., Henry E. R. et al., *Biochemistry*, 1994, 33, 5128.
 Baroch A., Boeckmann B., *Nucl. Acids Res.*, 1991, 19, 2247.
 Bashford D., Chothia C., Lesk A. M., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196, 199.
 Castaldo A. M., Ercolini P., Forino F. et al., *Eur. J. Chem. Clin. Biochem.*, 1994, 32, 349.
 Chiancone E., Verzili D., Boffi A. et al., *Biophys. Chem.*, 1990, 37, 287.
 Galaris D., Cadenas E., Hochstein P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1989, 273, 497.
 Giardina B., Ascenzi P., Clementi M. E. et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 16999.
 Giulivi C., Davies K. J. A., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 19453.
 Hamilton R. W., Hopkins M. R., Shihabi Z. K., *Clin. Chem.*, 1989, 35, 1713.
 Ivanov D., Sage J. T., Keim M. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 4139.
 Lim M., Jackson T. A., Anfinsen P. A., *Science*, 1995, 269, 962.
 Mordente A., Santini S. A., Miggiano G. A. D. et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 27394.
 Nardini M., Tarricone C., Rizzi M. et al., *J. Mol. Biol.*, 1995, 247, 459.
 Parente A., Verde C., Malorni A. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1162, 1.
 Ray G. B., Li X.-Y., Ibers J. A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 162.
 Springer B. A., Sligar S. G., Olson J. S. et al., *Chem. Rev.*, 1994, 94, 699.
 Vinogradov S. N., Walz D. A., Pohajdak B. et al., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 106B, 1.

PAOLO ASCENZI, MARTINO BOLOGNESI,
 MASSIMO COLETTA, FRANCESCA CUTRUZZOLÀ,
 ALVARO MORDENTE E BRUNO GIARDINA

MIOTONIA CONGENITA: V. MIOTONICHE SINDROMI**.

MIOTONICHE SINDROMI

E. syndromes miotoniques. - 1. myotonic syndromes. - 1. myotonische Syndromen.

SOMMARIO

INTRODUZIONE E CLASSIFICAZIONE col. 3718
 SINDROMI MIOTONICHE DISTROFICHE: DISTROFIA MIOTONICA col. 3718
 Clinica (col. 3718). - Fisiopatologia (col. 3721). - Genetica (col. 3721). - Terapia (col. 3722).

SINDROMI MIOTONICHE NON DISTROFICHE E PARALISI PERIODICHE

col. 3722

Classificazione (col. 3722). - Miotonia congenita di Thomsen (col. 3723). - Miotonia congenita generalizzata di Becker (col. 3723). - Fisiopatologia dei canali del cloro (col. 3723). - Genetica dei canali del cloro (col. 3723). - Terapia delle miotonie congenite di Thomsen e di Becker (col. 3723). - Paralisi periodica iperkaliemica (col. 3724). - Paramiotonia congenita (col. 3724). - Paralisi periodica normokaliemica (col. 3724). - Altre miotonie dei canali del sodio (col. 3724): Miotonia fluttuante. - Miotonia permanente. - Miotonia responsiva ad acetazolamide. - Fisiopatologia dei canali del sodio (col. 3725). - Genetica dei canali del sodio (col. 3725). - Terapia delle miotonie dei canali del sodio (col. 3725). - Paralisi periodica ipokaliemica (col. 3725): Genetica. - Terapia. - Paralisi periodiche secondarie (col. 3726). - Miotonia da farmaci (col. 3726). - Sindrome di Schwartz-Jampel (col. 3726).

INTRODUZIONE E CLASSIFICAZIONE

Le sindromi miotoniche (Streib, 1987) sono un gruppo eterogeneo di malattie del muscolo scheletrico in cui il sintomo e segno clinico comune è la miotonia.

La miotonia è un fenomeno determinato da un ritardato rilasciamento del muscolo dopo contrazione volontaria (miotonia d'azione), più facilmente rilevabile nel momento del rilasciamento dopo chiusura a pugno della mano, o dopo percussione del ventre muscolare (miotonia da percussione). In genere il freddo tende a peggiorare tale sintomo. Essa migliora dopo ripetute contrazioni muscolari (fenomeno *warm-up*) (Cooper et al., 1988); vi è anche una miotonia che invece peggiora ed è chiamata paradossa. La miotonia non si accompagna con dolore.

Le sindromi miotoniche, ad eccezione della distrofia miotonica, sono rare. Vengono distinte fondamentalmente in forme distrofiche e non distrofiche (tab. I).

SINDROMI MIOTONICHE DISTROFICHE: DISTROFIA MIOTONICA

Clinica

La distrofia miotonica (o miotonia atrofica [v.], o malattia di Steinert) è la più comune distrofia muscolare dell'adulto con una incidenza approssimativa di 1:7500 (Harper, 1994). È una malattia multisistemica, a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da miotonia, atrofia muscolare, cataratta, difetti della conduzione cardiaca. Mostra una notevole variabilità di espressione clinica sia per quanto concerne la gravità che il numero di sistemi coinvolti. I sintomi compaiono per lo più nella seconda decade; è difficile però spesso stabilire una data di insorgenza in quanto il fenomeno miotonico di solito non è percepito dal paziente come un disturbo. Ad allarmare il paziente è invece la comparsa di debolezza muscolare che è più tardiva. I bambini talora possono essere esaminati la prima volta per uno scarso sviluppo intellettivo.

La miotonia d'azione delle mani (cfr. fig. 1 in MIOTONIA ATROFICA, IX, 1780) è il sintomo preminente nelle prime fasi della malattia; può essere assente negli stadi avanzati. La miotonia da percussione è più facilmente evocabile sull'eminanza thenar; talora è evocabile anche sulla lingua. Non è usuale una miotonia generalizzata, più comune nelle forme non distrofiche; non si rileva il fenomeno miotonico con la chiusura stretta delle palpebre. Un esercizio muscolare ripetuto riduce la miotonia (fenomeno *warm-up*).

La distribuzione del coinvolgimento muscolare è assai differente da quella riscontrabile nelle altre distrofie muscolari progressive; l'atrofia interessa prima e soprattutto i muscoli distali degli arti: piccoli muscoli delle mani e piedi, estensori del polso, dorsiflessori dei piedi. Per tale motivo i pazienti hanno difficoltà a sollevare la punta dei piedi nel cammino (marcia steppante) e la forza di prensione delle

MIOTONICHE SINDROMI

TAB. 1. CLASSIFICAZIONE E GENETICA DELLE SINDROMI MIOTONICHE

Sindromi	Ereditarietà	Locus coinvolto
Sindromi distrofiche		
Distrofia miotonica	Autosomica dominante	cromosoma 19q13
Sindromi non distrofiche		
Miotonia congenita	Autosomica dominante	cromosoma 7q35
- M. di Thomsen	Autosomica recessiva	cromosoma 7q35
- M. generalizzata di Becker		
Paralisi periodica		
- ipokaliemia	Autosomica dominante	cromosoma 1q31-32
- normo-iperkaliemica	Autosomica dominante	cromosoma 17q23-25
Paramiotonia congenita	Autosomica dominante	cromosoma 17q23-25
Miotonia fluttuante	Autosomica dominante	cromosoma 17q23-25
Miotonia permanente	Autosomica dominante	cromosoma 17q23-25
Miotonia responsiva ad acetazolamide	Autosomica dominante	cromosoma 17q23-25
Miotonia condrodistrofica (sindrome di Schwartz-Jampel)	Autosomica recessiva	non noto
Miotonia acquisita		
- indotta da farmaci		
- associata con tumore		

mani è ridotta. La muscolatura prossimale degli arti è colpita più tardivamente; ciò consente ai pazienti di rimanere deambulanti nel corso della vita. Raramente un paziente è costretto in carrozzella. Vi è solitamente una ptosi palpebrale modesta; debolezza ed atrofia dei muscoli masseteri, dei temporal, dello sternocleidomastoideo e dell'orbicolare della bocca. Il coinvolgimento muscolare è molto variabile: si va dalla debolezza generalizzata grave del neonato (bambino ipotónico) all'assenza di debolezza muscolare delle persone anziane. I sistemi coinvolti nella malattia, oltre alla muscolatura scheletrica, sono molteplici: occhi, miocardio, sistema gastroenterico, sistema endocrino, cute, cervello e polmoni.

Una *cataratta*, rilevabile con la lampada a fessura, è quasi sempre presente dopo i 20 anni di età. Non si riscontra in altre sindromi miotoniche. Le alterazioni più specifiche ed iniziali sono costituite da molteplici piccole opacità multicolorate localizzate nella capsula posteriore del cristallino. Col tempo la cataratta può peggiorare e determinare disturbi visivi. Nelle fasi avanzate essa non è distinguibile da quella secondaria ad altre cause. Negli anziani l'unico segno di distrofia miotonica può essere costituito dalla sola presenza di una cataratta.

La maggior parte dei pazienti presenta *alterazioni elettrocardiografiche* che documentano il coinvolgimento del sistema di conduzione (Olofsson *et al.*, 1988). La più frequente alterazione dell'ECG è il blocco di conduzione di I grado che col tempo può evolvere verso gradi più gravi. Ci possono essere morti improvvise. Episodi di aritmia potenzialmente seri, non correlabili con la gravità della patologia neuromuscolare possono essere evidenziati con un ECG dinamico (Forsberg *et al.*, 1988). Per questi motivi sono necessari periodici controlli ECG nel corso della vita. Vi è la possibilità che qualche paziente necessiti dell'applicazione di un *pace-maker* cardiaco.

Le *anormalità endocrinologiche* sono costituite dalla possibile presenza di iperinsulinismo e da atrofia testicolare. L'iperinsulinismo è probabilmente secondario ad una ridotta funzionalità dei recettori tissutali dell'insulina (Moxley *et al.*, 1989). Nessuna mutazione nei recettori e nel gene dell'insulina tuttavia è stata rilevata. Raramente comunque tale anomalia assume un significato clinico.

L'*atrofia testicolare* è determinata da una degenerazione tubulare primaria con le cellule di Leydig relativamente

preservate e quindi con funzione endocrina testicolare conservata. Il testosterone sierico è leggermente ridotto mentre gli ormoni gonadotropi, specie FSH, sono aumentati. Nelle femmine si riscontra un'alta frequenza di aborti spontanei, idramnios, prolungamento della prima fase del travaglio, placenta ritenuta, emorragie post-partum ed aumento della mortalità neonatale.

Il *coinvolgimento respiratorio* è dato da una ipoventilazione alveolare probabilmente secondaria ad interessamento del diaframma ed in minor misura dei muscoli intercostali.

I *disturbi gastroenterici* sono determinati dal coinvolgimento della muscolatura liscia. Possono esserci disturbi della deglutizione; una riduzione della peristalsi esofagea e della motilità del colon, con dolori tipo colon spastico nei bambini; talora riscontro di megacolon; frequenti le calcoli biliari per ipomotilità della colecisti; anomalie di azione degli sfinteri anali nei bambini.

Il *coinvolgimento cutaneo* è espresso da una precoce calvizie frontale.

Indicazioni del *coinvolgimento del sistema nervoso centrale* derivano dalla presenza assai comune di ipersonnia (Ono *et al.*, 1995); dal riscontro di deficit intellettivi di grado variabile, da atteggiamenti di apatia e di inerzia (Malloy *et al.*, 1990).

L'*indagine elettromiografica* (EMG) rivela la presenza di scariche miotoniche più evidenti nei muscoli delle mani, mentre i muscoli prossimali degli arti spesso non presentano tali scariche. Esse sono registrabili in tutti i pazienti con miotonia clinica, mentre sono frequentemente assenti prima dei 10 anni di età. Vi sono associati segni di miopatia quali potenziali di unità motoria di piccola ampiezza e breve durata ed un aumento dei potenziali polifasici.

Le alterazioni istologiche del tessuto muscolare (fig. 1) sono caratterizzate da variabilità di diametro delle fibre, internalizzazione dei nuclei subsarcolemmali, da anomalie strutturali quali fibre ad anello e masse sarcoplasmatiche. Può esserci un aumento del connettivo endomisiale; molto rari i fenomeni di necrosi cellulare. Le fibre a metabolismo preminentemente ossidativo e fisiologicamente a contrazione lenta (fibre istochimicamente di tipo I) sono maggiormente coinvolte dal processo atrofico. Talora l'unico elemento patologico riscontrabile nella distrofia miotonica è l'atrofia delle fibre di tipo I.

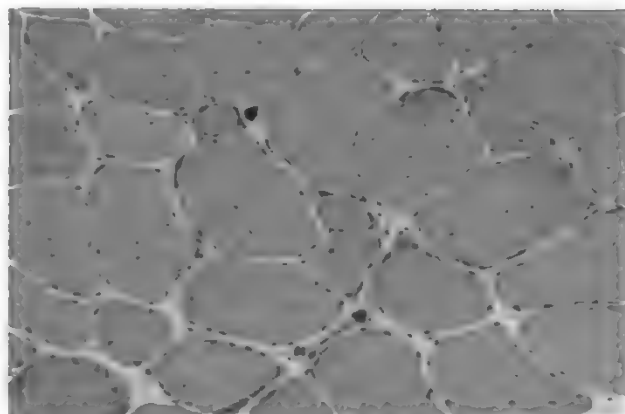


Fig. 1. Quadro istologico di distrofia miotonica.

La forma congenita è associata con ipotonia neonatale, debolezza nel suckiare e deglutire, distress respiratorio. Una debolezza bilaterale della muscolatura facciale con labbro superiore sollevato «a tenda» è un aspetto molto frequente. La mortalità è elevata, specie per il coinvolgimento del diaframma e dei muscoli intercostali. Non vi è miotonia clinica. La maggior parte dei bambini che sopravvivono hanno un ritardo motorio e mentale. Più avanti negli anni sviluppano la forma tipica della malattia. Essa è ereditata esclusivamente dalla madre; il sospetto diagnostico di malattia in un neonato ipototonico può essere posto se si esamina la madre. Il rischio di una donna affetta di avere un figlio congenitamente affetto è correlato al suo stato clinico: bambini nati da madri senza coinvolgimento muscolare non presentano una forma congenita.

V. anche: MIOTONIA ATROFICA (IX, 1779-1782).

Fisiopatologia

Le sindromi miotoniche da tempo sono ritenute secondarie a disturbi dell'eccitabilità della membrana muscolare poiché la miotonia non è modificata dal blocco del nervo o della giunzione neuromuscolare col curaro (Rudel e Lehman-Horn, 1985). Il meccanismo tuttavia che determina le scariche ripetute nella distrofia miotonica non è noto. Esso differisce comunque da quello, relativamente compreso, che opera nelle forme non distrofiche. Le recenti acquisizioni della genetica molecolare sembrano indicare una relazione fra difetto di membrana e attività di una protein-kinasi ed è noto che protein-kinasi influenzano la funzione dei canali ionici (Yang e Barchi, 1990).

Genetica

È recente la scoperta di una mutazione specifica che determina la distrofia miotonica (Brook *et al.*, 1992). La malattia è il risultato di una amplificazione di una sequenza instabile di citosina-timidina-guanina (CTG) nella regione 3' non traslata di un gene codificante una protein-kinasi (denominata miotoin-protein-kinasi o MT-PK), localizzato sulla banda q 13.3 del cromosoma 19.

La gravità della malattia dipende, almeno in parte, dalla grandezza dell'espansione (CTG)_n. Negli individui normali sono presenti meno di 30 copie di tale sequenza. Nella distrofia miotonica il numero varia da 50 ad oltre 2000. L'espansione delle triplette CTG correla con l'insorgenza precoce e gravità maggiore della distrofia miotonica e rende ragione del fenomeno dell'anticipazione genetica (insorgenza più precoce e gravità maggiore di malattia col succedersi

delle generazioni) (Tsiflidis *et al.*, 1992). Pertanto i casi congeniti sono associati con un'ampia espansione della sequenza instabile (v. TRINUCLEOTIDI INSTABILI**), mentre nei soggetti anziani con sola cataratta è riscontrabile una piccola espansione CTG di 50 o più copie. L'analisi genetica della sequenza (CTG)_n nel gene codificante la MT-PK costituisce attualmente la base per la diagnosi molecolare della distrofia miotonica, ottenuta mediante tre sonde molecolari derivate dallo stesso gene cDNA (complementary DNA) (Shelbourne *et al.*, 1993; Ptáček *et al.*, 1993). La diagnosi prenatale è possibile attraverso la biopsia dei villi coriali. In pazienti adulti l'analisi molecolare è d'aiuto in casi in cui ci sia miotonia ma non debolezza muscolare o in casi con sola cataratta; nelle forme congenite per confermare il sospetto clinico. Quando l'analisi molecolare mostra la presenza dell'espansione specifica non vi è dubbio diagnostico.

È stata descritta anche una forma di distrofia miotonica che presenta una normale espansione (CTG)_n ma nella quale il coinvolgimento muscolare è prossimale (Ricker *et al.*, 1994). La scoperta di questo tipo di mutazione genetica associa la distrofia miotonica ad un gruppo di altre malattie determinate da una nuova classe di mutazioni dinamiche costituite dall'amplificazione di sequenze trinucleotidiche specifiche: la sindrome del cromosoma X-fragile (v. X-FRAGILE, SINDROME [v.*; v.**]), la corea di Huntington (v. COREE [v.; v.*; v.**]), l'atrofia muscolare bulbo-spinale *X-linked* (v. MOTONEURONE, MALATTIA DEL **), l'atassia spinocerebellare tipo I (v. ATASSIE SPINOCEREBELLARI**).

Terapia

Assai raramente i pazienti con distrofia miotonica avvertono la miotonia come un disturbo per il quale chiedere una terapia. Utili nel ridurre la miotonia sono il chinino, la dintoina, la procainamide.

SINDROMI MIOTONICHE NON DISTROFICHE E PARALISI PERIODICHE

Classificazione

Una nuova classificazione di queste sindromi è andata sviluppandosi negli ultimi anni grazie ai progressi della fisiologia e della biologia molecolare dei canali ionici voltaggio-dipendenti del muscolo scheletrico. Sono emerse due nuove classi di malattie: quelle associate con mutazioni nel gene

TAB. II. SINDROMI MIOTONICHE NON DISTROFICHE E PARALISI PERIODICHE

(modificata da Hudson A. J., *Brain*, 1995)

1. Malattie del canale del cloro

- a) miotonia congenita di Thomsen
- b) miotonia generalizzata di Becker
- c) miotonia *levior*?

2. Malattie del canale del sodio

- a) paralisi periodica iperkaliemica
- b) paramiotonia congenita
 - 1. tipica
 - 2. paralisi iperkaliemica e paramiotonia (paralisi periodica paramiotonica)
 - 3. miotonia indotta dal freddo senza debolezza
- c) miotonia fluttuante
- d) miotonia permanente
- e) miotonia responsiva ad acetazolamide

3. Malattie del canale del calcio

- a) paralisi periodica ipokaliemica

MIOTONICHE SINDROMI

del canale del cloro (*CHLCNI*) e quelle associate con mutazioni nel gene che codifica la subunità alfa del canale del sodio (*SCN4A*) (tab. II) (Hudson *et al.*, 1995; Rudel e Lehman-Horn, 1994).

Miotonia congenita di Thomsen

È una malattia dei canali del cloro. Il sintomo principale è la miotonia, non peggiorata dal freddo né associata con dolore. È presente nella maggior parte dei muscoli, compresi quelli della faccia; l'incapacità di riaprire gli occhi durante il pianto può essere il primo segno in un bambino; talora la miotonia delle palpebre può causare un blefarospasmo invalidante. La rigidità miotonica è più pronunciata all'inizio del movimento, dopo un breve periodo di riposo. Essa si riduce o scompare dopo la ripetizione continua del movimento. Talora un rumore improvviso può determinare una rigidità generalizzata e la conseguente caduta a terra del paziente.

I disturbi compaiono di solito nell'infanzia. Non è progressiva. Frequentemente si associa un'ipertrofia muscolare ed alcuni pazienti hanno un aspetto atletico (cfr. fig. 14, V, 463). L'EMG registra scariche miotoniche diffuse. Non vi sono alterazioni di tipo distrofico nella biopsia muscolare che è caratterizzata invece dall'assenza delle fibre 2B. Il CPK sierico è di solito nella norma.

Dal punto di vista genetico, il locus interessato, è localizzato nel cromosoma 7q35. V. MIOTONIA CONGENITA (IX, 1782-1785).

Miotonia congenita generalizzata di Becker

È anch'essa una malattia dei canali del cloro.

Il quadro clinico è simile a quello della forma di Thomsen. La miotonia è però più grave e colpisce soprattutto e dapprima gli arti inferiori. Si manifesta tra i 4 ed i 12 anni. In molti pazienti compare una debolezza transitoria durante una contrazione muscolare forte, dopo un periodo di riposo; essa migliora dopo alcuni minuti di esercizio continuo. Spesso tale debolezza può essere generalizzata e manifestarsi al mattino nell'alzarsi dal letto. Vi è di solito un'ipertrofia muscolare che risparmia gli avambracci; è raro riscontrarla nelle femmine. La sintomatologia può peggiorare per alcuni anni e poi rimanere stabile. Nella maggior parte dei pazienti vi è un certo grado di debolezza muscolare. Il CPK è normale e l'EMG registra scariche miotoniche diffuse. Nella biopsia muscolare si possono riscontrare alcune alterazioni di tipo distrofico.

Fisiopatologia dei canali del cloro

La ipereccitabilità della membrana muscolare è considerata conseguenza di una ridotta conduttanza al cloro nel sistema dei tubuli trasversi della fibra muscolare. Nella miotonia congenita recessiva (miotonia di Becker) è stata anche riscontrata un'anormale riapertura dei canali del sodio.

Genetica dei canali del cloro

Il gene umano del canale del cloro (*CHLCNI*) è localizzato sul cromosoma 7q35. Differenti mutazioni nel gene possono causare la miotonia recessiva (malattia di Becker) o quella dominante (malattia di Thomsen).

Terapia delle miotonie congenite di Thomsen e di Becker

La rigidità miotonica risponde a farmaci che riducono l'aumentata eccitabilità di membrana interferendo con i canali del sodio. I più utilizzati sono il chinino, la fenitoina, la procainamide e la mexiletina. Quest'ultima riduce relativamente anche la debolezza transitoria della miotonia di Becker. Anche il dantrolene, bloccante il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmico è un antagonista della rigidità mioto-

nica. La tocainide è efficace ma può causare depressione midollare e fibrosi interstiziale polmonare.

Paralisi periodica iperkaliemica

Questa forma, insieme con la paramiotonia congenita e la miotonia dei canali del sodio (miotonia fluttuante), viene classificata anche come *complesso adinamia-paramiotonia*.

La sintomatologia si manifesta nella prima decade della vita ed è caratterizzata da episodi di paralisi flaccida della durata di circa 10 min-1 h, di solito al mattino, prima di colazione. Gli attacchi sono precipitati dal digiuno, dal riposo dopo esercizio fisico, dall'assunzione orale di potassio (usata anche come test provocativo). La frequenza degli attacchi di debolezza varia: da molto rari nell'arco della vita a pressoché quotidiani.

La paralisi periodica iperkaliemica può manifestarsi in tre forme: senza miotonia, con associata miotonia clinica o elettrofisiologica, con paramiotonia. La miotonia clinica è di solito molto lieve. La forma associata con paramiotonia è caratterizzata da attacchi di debolezza generalizzata e miotonia paradossa. Di solito i membri di una famiglia hanno lo stesso tipo di manifestazioni cliniche.

Nonostante la designazione «iperkaliemica» il livello di potassio sierico può rimanere normale nel corso dell'attacco paralitico. Solo raramente comunque l'aumento del potassio raggiunge valori cardiotossici. Talora si rileva una transitoria ipokaliemia alla fine dell'attacco. Il quadro istologico può essere normale nei casi di recente insorgenza; è presente una miopatia vacuolare con degenerazioni focali nei casi di lunga durata.

V. anche: PARALISI FAMILIARE PERIODICA (*iperkaliemica*, XI, 977-980); PARALISI FAMILIARE PERIODICA**.

Paramiotonia congenita

Fu descritta la prima volta nel 1886 da Eulenburg. Compare nella prima decade di vita. Principali caratteristiche sono: la miotonia è provocata e peggiorata nettamente dal freddo; si manifesta durante l'esercizio fisico e si accentua con la prosecuzione dell'esercizio (miotonia paradossa). Interessa soprattutto i muscoli della faccia, del collo e quelli distali degli arti superiori. Molti pazienti hanno difficoltà a riaprire le palpebre dopo ripetute contrazioni degli orbicolari degli occhi. Può non esserci una miotonia da percussione o d'azione agli arti. Solitamente non vi è atrofia o ipertrofia muscolare. L'esecuzione di un esercizio muscolare al freddo determina spesso la comparsa di una paralisi flaccida che può persistere alcune ore dopo il ritorno in ambiente caldo. Vi sono famiglie che presentano sia paramiotonia congenita che attacchi di paralisi periodica iperkaliemica. L'EMG registra scariche miotoniche diffuse. Il CPK è spesso aumentato. Le anomalie istologiche riscontrate sulla biopsia muscolare sono modeste (variazione di diametro delle fibre, nuclei interni, qualche fibra vacuolata).

Paralisi periodica normokaliemica

In questa forma gli attacchi paralitici possono durare alcuni giorni. Si tratta, verosimilmente, di una variante del complesso adinamia-paramiotonia.

V. PARALISI FAMILIARE PERIODICA (*normokaliemica*, XI, 981); PARALISI FAMILIARE PERIODICA**.

Altre miotonie dei canali del sodio

Sotto questo termine vengono raggruppate alcune malattie che clinicamente rassomigliano alla miotonia congenita ma che sono determinate da mutazioni del gene del canale del sodio.

Miotonia fluttuante

Le caratteristiche cliniche di questa forma (Ricker *et al.*, 1994) sono date dalle fluttuazioni del fenomeno miotonico che è indotto dall'esercizio ma compare con un certo ritardo; assenza di paralisi dopo esposizione al freddo o dopo ingestione di potassio; presenza del fenomeno *warm-up*. La rigidità miotonica varia grandemente: può non essere rilevabile in alcuni giorni. L'ingestione di potassio peggiora significativamente la rigidità muscolare (dove il nome di miotonia congenita potassio-sensibile). L'uso di mexiletina previene la rigidità. La trasmissione genetica è di tipo autosomico dominante.

Miotonia permanente

È molto simile alla miotonia fluttuante ma la miotonia è permanente e più grave.

Miotonia responsiva ad acetazolamide

È una forma simile alla malattia di Thomsen ma la rigidità muscolare è dolorosa. Il digiuno e l'ingestione di potassio provocano la miotonia che invece è ridotta dai carboidrati. L'acetazolamide è efficace nel ridurre la sintomatologia (Trudell *et al.*, 1987).

Fisiopatologia dei canali del sodio

Gli elementi distintivi fra paralisi periodica iperkaliemica e paramiotonia congenita sono i differenti fattori che precipitano l'attacco paralitico: l'aumento del potassio extracellulare nel primo caso; la particolare sensibilità al freddo nel secondo. I meccanismi successivi sono simili. Vi è una mancata inattivazione (chiusura) dei canali del sodio, che rimangono aperti con conseguente elevato ingresso di sodio nelle cellule. La membrana sarcolemmale permane eccessivamente depolarizzata, la fibra muscolare ineccitabile e si ha la paralisi muscolare. L'utilizzo di tetrodotossina, un bloccante dei canali del sodio, può prevenire ed invertire la depolarizzazione nella paralisi periodica iperkaliemica, mentre può solo prevenirla nella paramiotonia.

Genetica dei canali del sodio

Il gene umano *SCN4A*, che codifica la subunità alfa dei canali del sodio nel muscolo scheletrico adulto, è localizzato sul cromosoma 17 q23. Il numero di mutazioni attualmente conosciute è 13. Tutte le mutazioni risultano nel cambiamento di un singolo aminoacido nel canale proteico del sodio, alterandone la funzione. La paralisi periodica iperkaliemica è stata la prima malattia in cui sia stato determinato un difetto genetico dei canali ionici.

Terapia delle miotonie dei canali del sodio

Gli attacchi paralitici nella paralisi periodica iperkaliemica si possono prevenire in vari modi: con pasti frequenti e ricchi di carboidrati; con una dieta a basso contenuto di potassio; evitando uno strenuo esercizio fisico, l'esposizione al freddo ed il digiuno; continuando un esercizio in modo leggero. Si può ottenere un effetto favorevole assumendo un diuretico tiazidico o l'acetazolamide. I diuretici agiscono probabilmente abbassando il livello sierico di potassio. Nelle forme paramiotoniche la miotonia e la debolezza indotte dal freddo possono essere prevenute con la mexiletina. Può essere efficace anche l'inalazione di salbutamolo. La maggior parte dei pazienti con paramiotonia congenita non richiede un trattamento.

Paralisi periodica ipokaliemica

È una malattia dei canali del calcio clinicamente omogenea. Gli attacchi di debolezza possono coinvolgere un singolo

muscolo come tutta la muscolatura, determinando una paralisi generalizzata. Inizialmente sono rari; possono diventare quotidiani. Compaiono nella seconda metà della notte o al risveglio. La debolezza migliora durante il giorno ma può perdurare 2-3 giorni. L'attività fisica intensa o un pasto ricco di carboidrati del giorno precedente sono fattori scatenanti. Nel corso dell'attacco, il livello sierico di potassio diminuisce a valori inferiori della norma.

Genetica

La malattia è trasmessa in modo autosomico dominante; un terzo dei casi è tuttavia sporadico. Recenti studi (Ptáček *et al.*, 1994) hanno stabilito che il gene è il recettore muscolare scheletrico della diidropiridina, localizzato sul cromosoma 1q31-32. Questo recettore funziona come un canale del calcio voltaggio-dipendente.

Terapia

La somministrazione di cloruro di potassio blocca l'attacco paralitico. I metodi per prevenire l'attacco consistono nell'evitare strenui esercizi fisici e l'ingestione di pasti ricchi di carboidrati; anche l'assunzione di acetazolamide è utile come sistema preventivo.

V. anche: PARALISI FAMILIARE PERIODICA (ipokaliemica, XI, 974-977); PARALISI FAMILIARE PERIODICA**.

Paralisi periodiche secondarie

Si può avere ipokaliemia nelle tireotossicosi; in seguito a perdita di potassio per via urinaria o gastroenterica; con l'ingestione accidentale di un sale di bario assorbibile.

La paralisi iperkaliemica può manifestarsi quando il livello di potassio supera le 7 mmol/l; ciò può accadere in corso di insufficienza renale o surrenale, durante febbri malariche, dopo somministrazione di spironolattone.

Miotonia da farmaci

La miotonia può essere indotta nell'uomo da sostanze utilizzate per trattare l'ipercolesterolemia come il 20,25 diazocolesterolio; il clofibrato e il tripazonolo la inducono nell'animale. La miotonia può essere aggravata da farmaci β -adrenergici e diuretici (Kwieceński *et al.*, 1988).

Sindrome di Schwartz-Jampel

È una malattia molto rara che si manifesta entro i 3 anni di vita, nota anche come miotonia condrodistrofica. La rigidità muscolare è particolarmente evidente alle cosce ed ai muscoli della faccia. Questa assume un'espressione particolare per la presenza di blefarospasmo, labbra aggrottate, miocimie al mento. Vi sono inoltre deformità scheletriche multiple, contratture articolari, bassa statura e miopia. Non ha un decorso progressivo.

All'EMG si rileva un'attività elettrica spontanea e continua definita come «scariche pseudomiotoniche». Il CPK è normale e la biopsia muscolare dimostra alterazioni aspecifiche. La patogenesi è ignota.

La trasmissione della malattia è di tipo autosomico recessivo; tuttavia alcuni *pedigree* suggeriscono anche una trasmissione dominante.

Bibliografia

- Brook J. D. *et al.*, *Cell*, 1992, **68**, 799.
Cooper R. G. *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1988, **51**, 1134.
Forsberg H. *et al.*, *Cardiology*, 1988, **75**, 241.
Harley H. G. *et al.*, *Lancet*, 1992, **339**, 1125.
Harper P. S., *Myotonic dystrophy*, 2 ed., 1989, Saunders, Philadelphia.
Harper P. S., Rudel R., *Myotonic Dystrophy*, in Engel A. G., Franzini Armstrong C. eds, *Myology*, 2 ed., 1994, McGraw-Hill, New York.
Harper P. S., *Myotonic Dystrophy and others Autosomal Muscular*

MIOTONICHE SINDROMI

- Dystrophies*, in Scriver C. S. et al. eds., *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. III, 1995, McGraw-Hill, New York, pp. 4227-4251.
- Hudson A. J. et al., *Brain*, 1995, **118**, 547.
- Kwiecinski A. et al., *Muscle & Nerve*, 1988, **11**, 576.
- Mahadevan M. et al., *Science*, 1992, **255**, 1253.
- Malloy P. et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1990, **53**, 1011.
- Moxley R. T. et al., *Ann. Neurol.*, 1984, **15**, 157.
- Olofsson B. O. et al., *Br. Heart J.*, 1988, **59**, 47.
- Ono S. et al., *J. Neurol. Sci.*, 1995, **128**, 225.
- Pláček L. J., Johnson K. J., Griggs R. C., *New Engl. J. Med.*, 1993, **328** (7), 482-489.
- Pláček L. J. et al., *Cell*, 1994, **77**, 863.
- Ricker K. et al., *Arch. Neurol.*, 1995, **52**, 25.
- Ricker K. et al., *Arch. Neurol.*, 1994, **51**, 1095.
- Rudel R., Lehman-Horn F., *Physiol. Rev.*, 1985, **65**, 310.
- Shelbourne P. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 471.
- Streib E. W., *Muscle & Nerve*, 1987, **10**, 603.
- Trudell R. G. et al., *Neurology*, 1987, **37**, 488.
- Tsilhdt C. et al., *Nature Genet.*, 1992, **1**, 192.
- Yang J., Barchi R., *J. Neurochemistry*, 1990, **54**, 954.

GIULIANO TOMELLERI

MITOCONDRI [v. vol. IX, coll. 1787-1799; Agg. I, coll. *5182-5196; v. anche MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**]

SOMMARIO

MALATTIE MITOCONDRIALI col. 3727
Introduzione (col. 3727). - **Aspetti genetici delle mitocondriopatie** (col. 3727). - **Aspetti clinici delle mitocondriopatie** (col. 3730). - **Classificazione biochimica delle mitocondriopatie** (col. 3732): **Difetti del trasporto mitocondriale**. - **Difetti di utilizzazione del substrato**. - **Difetti del ciclo di Krebs**. - **Difetti della catena respiratoria mitocondriale**. - **Difetti delle vie metaboliche mitocondriali non coinvolte nel sistema di produzione dell'energia**.

MALATTIE MITOCONDRIALI

Introduzione

Le mitocondriopatie formano un complesso eterogeneo di malattie, la cui scoperta è relativamente recente. Possono essere multi-sistemiche o interessare prevalentemente un solo organo o tessuto.

La maggior parte delle malattie mitocondriali note sono di natura ereditaria. Sono state peraltro identificate alcune forme acquisite di patologia primitiva mitocondriale: la deplezione di DNA mitocondriale in soggetti sottoposti a prolungata terapia con 3'-azido-2',3'-dideossitimidina (AZT o zidovudina), la diminuzione dell'attività della citocromo ossidasi nella miocardiopatia da adriamicina, un farmaco antitumorale; la diminuzione della attività della piruvato deidrogenasi nelle carenze di tiamina e della piruvato-carbossilasi in quelle di biotina; la diminuzione dell'attività delle deidrogenasi degli acidi grassi, soprattutto a lunga e media catena, nella carenza di riboflavina. Si può anche verificare un difetto mitocondriale secondario ad alterazioni genetiche che interessano il trasporto intestinale di ioni, come ad esempio quello del rame nella sindrome di Menkes (v. MENKES, MALATTIA DI). La deficienza di rame causa una diminuzione dell'attività della citocromo ossidasi che è un enzima rame-dipendente.

Aspetti genetici delle mitocondriopatie

A differenza degli altri organelli sub-cellulari, le proteine dei mitocondri [m.] sono codificate da geni costituenti due genomi distinti, localizzati, rispettivamente, nel nucleo e nei mitocondri stessi (v. sotto col. 3730). Le proteine codificate da geni nucleari sono sintetizzate nei ribosomi citoplasmatici e devono quindi essere importate nei mitocondri.

Sono stati identificati due sistemi di importazione. Il primo e principale è utilizzato da quelle proteine che sono

sintetizzate con una pre-sequenza specifica amino terminale, ricca di aminoacidi basici.

Queste proteine appena sintetizzate sul ribosoma vengono legate da proteine dette *chaperonine* la cui funzione è quella di evitare che la proteina nativa acquisisca la configurazione terziaria definitiva, configurazione che ostacolerebbe il trasporto attraverso le membrane mitocondriali. Il complesso proteine-chaperonina si lega a proteine recettoriali, localizzate sulla membrana mitocondriale esterna. Il trasporto attraverso le membrane esterna ed interna del mitocondrio, avviene nei siti dove le due membrane mitocondriali sono a contatto ed è dipendente dal potenziale ($\Delta\psi$) della membrana interna e dalla disponibilità di ATP. Una volta entrata nella matrice mitocondriale, la proteina precursore viene legata da altre chaperonine ed è attaccata da proteasi altamente specifiche che staccano la presequenza.

Questa elaborazione è indispensabile per l'assemblaggio del peptide importato nei complessi polimerici degli enzimi della matrice, per l'inserimento del peptide nella membrana interna o per il suo retrotrasporto nello spazio fra le membrane mitocondriale interna ed esterna.

Il secondo sistema di importazione è utilizzato dalle proteine che sono sintetizzate senza la presequenza specifica come, ad esempio, l'ADP/ATP traslocasi e l'apocitocromo c_1 . Il citocromo c_1 può passare attraverso la membrana mitocondriale esterna, indipendentemente da proteine recettoriali e dal potenziale della membrana interna. L'apocitocromo tende spontaneamente ad inserirsi in una membrana lipidica. L'indirizzo preciso per la sua localizzazione è probabilmente fornito dalla citocromo-c-eme-liasi che lega covalentemente il gruppo eme all'apocitocromo. La identificazione dei meccanismi del trasporto delle proteine nei mitocondri di mammiferi ne permetterà di chiarire i difetti molecolari. È stata, ad esempio, recentemente descritta una mitocondriopatia in cui la carenza nei mitocondri della proteina-Fe-S di Rieske si accompagnava all'accumulo nel citoplasma del suo precursore. Inoltre è stata descritta una deficienza di piruvato deidrogenasi E1 α dovuta ad una mutazione puntiforme che determinava la sostituzione, nelle sequenze di aminoacidi basici mitocondrio-specifiche, di un'arginina con una prolina. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che tale mutazione determina una riduzione della velocità di importazione di proteine nella matrice mitocondriale. Infine, in una malattia mitocondriale sistemica, è stata dimostrata una diminuzione di una chaperonina (Hsp60) nei fibroblasti dei pazienti.

Il DNA mitocondriale umano (2-10 molecole per mitocondrio) è una molecola circolare costituita da una catena pesante ed una leggera per un totale di 16.569 paia di basi (v. MITOCONDRI*). Codifica per due RNA ribosomali (12S e 16S), 22 RNA transfer e 13 RNA messaggeri. I 13 peptidi codificati dal DNA mitocondriale sono tutti costituenti della *catena respiratoria*. In particolare, 7 subunità (1, 2, 3, 4L, 4, 5, 6) del complesso I, una subunità (apocitocromo b) del complesso III, tre subunità maggiori (I, II, III) del complesso IV e due subunità (6, 8) del complesso V. Non esistono subunità del complesso II codificate dal DNA mitocondriale.

Le malattie mitocondriali possono essere causate da uno dei seguenti meccanismi riportati in tab. I.

Data l'esistenza di due genomi, i meccanismi di trasmissione ereditaria sono duplici: *ereditarietà di tipo mendeliano* (di solito di tipo autosomico recessivo o legato al sesso) ed *ereditarietà di tipo materno*. In quest'ultimo tipo di trasmissione ereditaria il difetto viene trasmesso solo dalla madre e colpisce sia maschi che femmine, dal momento che tutti i

TAB. 1. MECCANISMI PATOGENETICI DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI

A) Alterazioni delle proteine codificate da geni nucleari
- alterazione dei geni strutturali
- alterazione dei meccanismi di trascrizione e traduzione
- alterazione dei meccanismi post-traduzionali che regolano l'importazione dei peptidi a sintesi citoplasmatica nei mitocondri (recettori mitocondriali, interazione del peptide con i recettori, traslocazione attraverso le membrane mitocondriali, proteolisi della presequenza, alterazioni delle <i>chaperonine</i>)
B) Alterazioni delle proteine codificate dai geni del DNA mitocondriale
- alterazione dei geni strutturali
- alterazione dei geni degli RNA-transfer (tRNA)
C) Alterazione dei geni nucleari che controllano i geni mitocondriali

mitocondri presenti nello zigote sono derivati dalla cellula uovo.

La ereditarietà mitocondriale ha anche due ulteriori importanti caratteristiche che derivano dal fatto che, nella maggioranza dei casi, le cellule sono eteroplasmiche, cioè contengono m. con DNA normale e m. con DNA alterato. La prima caratteristica è la segregazione mitotica. Durante i processi di divisione cellulare, la distribuzione dei mitocondri con DNA normale e di quelli con DNA alterato nelle cellule figlie è stocastica, cioè di tipo casuale (cfr. a tal proposito la fig. 3 della voce MITOCONDRI*, coll. *5189-5190). Nelle cellule figlie, quindi, la percentuale di mitocondri con DNA alterato è molto variabile.

Il processo di segregazione mitotica ha importanti conseguenze. Quando si verifica nella divisione meiotica dell'uovo, determina una variabilità nelle manifestazioni fenotipiche della malattia nei figli della stessa madre portatrice. Quando si verifica durante le divisioni mitotiche delle cellule somatiche dell'embrione, ha come conseguenza un grado diverso di deficit funzionale nei vari organi.

Deve essere tuttavia tenuto presente che l'interessamento differenziale degli organi può essere anche messo in relazione all'esistenza di forme molecolari diverse (isoforme) di sub-unità che sono codificate dal DNA nucleare, come nel caso della citocromo-ossidasi. I geni per queste isoforme sono sotto un controllo specifico sia per il tipo di tessuto che per lo stadio del differenziamento. La segregazione mitotica del DNA mitocondriale ha anche altre conseguenze. Se, ad esempio, una cellula figlia riceve una quantità di DNA alterato elevata e incompatibile con la sua fisiologia, la cellula muore ed il difetto genetico tende ad essere eliminato. Questo fenomeno è riscontrabile soprattutto nei tessuti costituiti da cellule in attiva moltiplicazione e, *in vitro*, nelle colture cellulari. È infatti raro che tessuti costituiti da cellule con elevata attività mitotica, come il midollo emopoietico, presentino deficit funzionali dei mitocondri. Esistono tuttavia malattie in cui anche questo tessuto è colpito, come ad esempio la *sindrome di Pearson*. Questa malattia è caratterizzata da alterazioni epatiche, renali e del pancreas esogeno oltre che da pancitopenia con anemia sideropenica refrattaria. Sono state riportate delezioni del DNA mitocondriale nei linfociti di questi pazienti.

Una seconda importante caratteristica della eteroplasmia cellulare per il DNA mitocondriale è rappresentata dall'effetto soglia. Una cellula può dimostrare sofferenza per l'alterazione del DNA mitocondriale quando la quantità di DNA mitocondriale normale è sotto una soglia cri-

tica per la fisiologia della cellula stessa. Ad es., è stato osservato che è sufficiente una quantità di DNA normale pari a circa il 10-20% del totale nelle cellule di pazienti con MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*, v. sotto; v. anche: MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**) per renderli asintomatici. Va tuttavia osservato che il DNA mitocondriale ha un tasso di mutazione che è un ordine di grandezza più elevato rispetto al tasso di mutazione del DNA nucleare, probabilmente perché, a differenza di quello nucleare, il DNA mitocondriale non possiede sistemi riparativi. Inoltre, durante il loro metabolismo, i m. producono in grande quantità radicali liberi dell'ossigeno che danneggiano il DNA. È stato proposto che l'accumulo di alterazioni del DNA mitocondriale durante la vita porta ad un progressivo deficit mitocondriale, soprattutto nei tessuti costituiti da cellule che hanno perduta la capacità mitotica, come il tessuto muscolare. Effettivamente, una diminuzione progressiva dell'attività della catena respiratoria dei m. muscolari è stata osservata nell'invecchiamento.

Nei pazienti con mitocondriopatie è possibile che, nei primi anni di vita, la quantità di DNA normale, soprattutto nelle cellule muscolari e nervose sia superiore alla soglia critica e quindi i pazienti sono asintomatici. Data la progressiva alterazione del DNA normale per i motivi sopraelencati, nel corso della vita la quantità di DNA normale si riduce fino a scendere sotto la soglia critica con conseguente inizio della sintomatologia. Quanto maggiore è la quantità di DNA normale alla nascita tanto più prolungato è il periodo asintomatico. Una correlazione fra quantità di DNA normale e l'età di insorgenza della sintomatologia è stata osservata in pazienti con MERRF.

È da tenere infine presente che i geni nucleari codificano anche per proteine che regolano la replicazione e la trascrizione del DNA mitocondriale. Recentemente è stata identificata una miopia mitocondriale caratterizzata da delezioni del DNA mitocondriale, ma che è trasmessa come un carattere mendeliano autosomico dominante. È stato proposto che il gene nucleare alterato sia un gene codificante per una delle proteine che regolano la replicazione del DNA mitocondriale.

Aspetti clinici delle mitocondriopatie

In generale le malattie mitocondriali presentano una sintomatologia che dipende dall'interessamento, nell'ordine, del sistema nervoso centrale, del muscolo scheletrico, del cuore, dei reni e del fegato. Tale gerarchia dipende dalla diversa richiesta di metabolismo mitocondriale nei vari tessuti.

Se la malattia compare nei primi mesi di vita, si può verificare un ritardo nello sviluppo psicomotorio con compromissione della crescita dell'encefalo e conseguente microcefalia. Se la sintomatologia compare in età adulta, si può determinare demenza.

La sintomatologia, per quanto riguarda il sistema nervoso, è, prevalentemente, di tipo motorio (incoordinazione, ipotonìa, alterazione dei riflessi con Babinski positivo, ptosi e oftalmoplegia) e di quello sensoriale (vista ed udito). Per quanto riguarda l'apparato visivo, si ha atrofia ottica, degenerazione pigmentaria della retina. A carico della muscolatura scheletrica, si ha atrofia e debolezza muscolare, mentre per quanto riguarda il cuore si ha una cardiomiopatia con possibili alterazioni della conduzione dell'impulso e frequenti alterazioni del ritmo fino al blocco completo. Il coinvolgimento renale porta ad alterazioni tubulari.

Se la malattia compare precocemente ed è multisistemica, si ha frequentemente un rallentamento della crescita corporea con esito in bassa statura.

Il quadro ematochimico più frequente nelle malattie mitocondriali è rappresentato dalla acidosi lattica con aumento anche dell'acido piruvico e dell'alanina. Tali composti aumentano anche nelle urine e nel liquido cefalorachidiano. Nelle forme da alterazione della catena respiratoria mitocondriale il rapporto lattato/piruvato è di solito molto elevato. Nel caso di acidosi tubulare renale si hanno anche aminoaciduria generalizzata, glicosuria e fosfaturia.

Dal punto di vista istopatologico, una alterazione caratteristica del muscolo scheletrico, soprattutto nelle malattie da alterazioni della catena respiratoria, è la presenza delle *ragged red fibers*, letteralmente fibre rosse sfilacciate (v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE E ENCEFALOMIOPATIE**). Al microscopio elettronico, i m. presentano variazioni nelle dimensioni, alterazioni strutturali della membrana interna con aumento o diminuzione delle criste, presenza di precipitati ed inclusioni paracrystalline. Tuttavia non tutte le forme di patologia mitocondriale sono accompagnate da alterazioni morfologiche. Ad es. nella deficienza di carnitina-palmitil transferasi non si evidenziano alterazioni morfologiche apprezzabili.

La introduzione nella pratica clinica della Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) e della Tomografia a Emissione di Positroni (PET), permette lo studio non invasivo delle alterazioni del sistema nervoso centrale.

È stato visto che le alterazioni cerebrali possono essere diffuse o localizzate; sono particolarmente colpiti i gangli basali, come il *putamen*, il nucleo caudato e pallido. Può esistere una certa selettività delle aree cerebrali colpite, ad es. nella MELAS (*Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*) di solito è colpita la corteccia cerebrale posteriore, mentre nella sindrome di Leigh i nuclei della base, il tronco cerebrale ed il cervelletto.

La trattazione delle sindromi specifiche mitocondriali è svolta nelle sedi qui sotto indicate:

a) sindrome di Leigh o encefalomiopatia necrotizzante subacuta: v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3749);

b) malattia di Alpers o polidistrofia infantile progressiva: v. ALPERS, MALATTIA DI** (coll. **241-243);

c) sindrome di Kearns-Sayre: v. KEARNS-SAYRE, SINDROME DI*; v. anche MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**;

d) epilessia miotonica con *ragged red fibers* (MERRF: *Myoclonus Epilepsy with Ragged Red Fibers*): v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3744);

e) miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica ed episodi apoplettici (MELAS: *Mitochondrial Myopathy, Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes*): v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3744);

f) malattia di Leber o neuropatia ottica ereditaria (LHON: *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*): v. LEBER, MALATTIA DI (v.; v.*); MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (**3747);

g) sindrome caratterizzata da ipostenia muscolare neurogena, atassia e retinite pigmentosa (NARP: *Neurogenic muscle weakness, Ataxia, Retinitis Pigmentosa*): v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3745);

h) oftalmoplegia cronica progressiva esterna (CPEO: *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*): v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3748);

i) oftalmoplegia cronica progressiva a trasmissione autosomica dominante (AD-CPEO): v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3742);

l) deplezione tessuto-specifica del DNA-mitocondriale: v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE** (col. **3748).

Classificazione biochimica delle mitocondriopatie

I difetti genetici mitocondriali possono essere classificati sulla base delle alterazioni delle singole reazioni biochimiche interessate. Va tenuto conto, tuttavia, che un difetto primitivo può essere accompagnato da alterazioni secondarie di altri peptidi e, questo, è più frequente nei complessi eteropolimerici. È noto infatti che il catabolismo di una subunità di un complesso aumenta qualora il suo assemblaggio nel complesso è inibito per alterazioni di una o altre subunità costituenti lo stesso complesso. Infine, possono essere interessati molti complessi della catena respiratoria mitocondriale nel caso in cui l'alterazione genetica comporti un difetto della traduzione del DNA mitocondriale *in toto*, come avviene nelle sindromi di MERRF, MELAS e Kearns-Sayre.

Si possono distinguere sei classi di difetti genetici mitocondriali:

1) difetti del trasporto mitocondriale dei substrati;

2) difetti di utilizzazione del substrato;

3) difetti del ciclo di Krebs;

4) difetti della fosforilazione ossidativa;

5) difetti della catena respiratoria mitocondriale (v. MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**; col. **3748);

6) difetti di cicli metabolici non legati al meccanismo di produzione di energia.

Difetti del trasporto mitocondriale

La membrana mitocondriale contiene una serie di trasportatori specifici per i vari substrati (piruvato, acidi grassi e aminoacidi), nucleotidi (ATP, ADP) e coenzimi. Sono difetti non ancora ben caratterizzati se non per tre malattie: la malattia di Luft, la deficienza di carnitina-palmitil transferasi (v. MUSCOLO*, *miopatie mitocondriali*, coll. *5266-5267) e la malattia da alterato trasporto di FAD. È questa una malattia caratterizzata da alterata ossidazione degli acidi grassi, sensibile alla somministrazione di riboflavina. Dal momento che il FAD è un coenzima delle acilCoA deidrogenasi, dal punto di vista clinico la malattia è simile a quelle causate dal difetto delle acilCoA deidrogenasi.

Difetti di utilizzazione del substrato

1. *Alterazioni del metabolismo degli acidi grassi.* - Esistono varie mitocondriopatie dovute sia a difetti di una delle quattro deidrogenasi degli acilCoA (a molto lunga [l'unica delle quattro legata alla membrana], lunga, media e corta catena) che dei due trasportatori che ossidano il FADH e donano gli elettroni al coenzima Q (ETF ed ETF-DH).

La sintomatologia è caratterizzata da intolleranza al digiuno, vomito ricorrente, ipoglicemia e ipochetonemia durante le crisi, debolezza muscolare. I sintomi sono dovuti al fatto che, in condizioni di ipoglicemia, non può verificarsi nel tessuto nervoso l'aumento compensatorio dell'ossidazione degli acidi grassi e di produzione dei corpi chetonici. Si può verificare un aumento dell'omega-ossidazione degli acidi grassi nella frazione microsomale con conseguente aumento di produzione e di escrezione urinaria di acidi dicarbossilici, segno patognomonico di tali malattie.

2. *Alterazioni del metabolismo del piruvato.* - Due sono le forme principali di malattia dovute ad una alterato metabolismo del piruvato: la deficienza di piruvato deidrogenasi (PDH) e della piruvato carbossilasi (PC). La piruvato deidrogenasi è un complesso di 5 subunità (tre catali-

tiche e due regolative), che catalizza la conversione del piruvato ad acetilCoA e CO₂. La sintomatologia clinica è caratterizzata da acidosi lattica, difficoltà di crescita corporea, atassia, ritardo dello sviluppo psicomotorio, atrofia ottica, ipotonia generalizzata e morte entro i primi anni. Tuttavia la gravità della malattia è correlata con il livello dell'attività enzimatica residua. La deficienza di PDHC è stata associata alla sindrome di Leigh (vedi sotto).

La piruvato carbossilasi catalizza la conversione di piruvato ad ossalacetato. Esiste una forma dell'enzima nei mitocondri ed una nel citoplasma. Esistono condizioni in cui la proteina è del tutto assente e sono di solito le forme più gravi, che si manifestano più precocemente, già nel neonato, con mancato accrescimento corporeo, varie alterazioni neurologiche, convulsioni, marcata acidosi metabolica con elevato tasso ematico di acido lattico, beta-idrossibutirrico. Sono presenti anche iperammoniemia, citrullinemia, iperlisinemia e diminuzione dei livelli di aspartato. Nelle forme in cui è presente la proteina enzimatica la sintomatologia clinico-metabolica è di solito meno grave. Tuttavia i pazienti presentano una elevata morbilità e mortalità nel periodo neonatale e nell'infanzia.

Difetti del ciclo di Krebs

Sono malattie estremamente rare. È stata identificata una forma clinica da deficienza di fumarasi, l'enzima che converte il fumarato a malato. Il quadro clinico è quello di una polidistrofia infantile progressiva, con ritardo dello sviluppo, microcefalia, atrofia cerebrale ed ipotonia. Nel sangue si mette in evidenza una moderata acidosi lattica e, nelle urine, grandi quantità di ac. fumarico, succinico e citrico.

Un'altra forma morbosa è la deficienza di alfa-chetoglutarato deidrogenasi, che è caratterizzata da segni piramidali ed extrapiramidali, moderata acidosi lattica ed elevata escrezione urinaria di acido alfa-chetoglutarico.

Difetti della fosforilazione ossidativa

Per la trattazione si rinvia alla voce MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**, col. **3736.

Difetti della catena respiratoria mitocondriale

Esistono numerosi difetti che coinvolgono i vari complessi della catena respiratoria mitocondriale e nella maggior parte dei casi essi danno luogo a due forme cliniche: una forma in cui predomina l'interessamento muscolare scheletrico ed una forma encefalomiopatica in cui prevale l'interessamento del S.N.C. rispetto alle alterazioni muscolari.

1. Alterazioni del complesso I: NADH-coenzima Q (ubichinone) reduttasi.

2. Alterazioni del complesso II: succinato citocromo c reduttasi.

3. Alterazioni del complesso III: coenzima Q (ubichinone)-citocromo c reduttasi.

4. Alterazioni del complesso IV: citocromo c ossidasi.

5. Alterazioni del complesso V: Fo-F1 ATP-sintetasi.

L'argomento concernente i difetti della catena respiratoria mitocondriale è ampiamente sviluppato sotto la voce MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**.

Difetti delle vie metaboliche mitocondriali non coinvolte nel sistema di produzione dell'energia

1. Difetti del ciclo dell'urea. - Nella matrice mitocondriale sono presenti gli enzimi che catalizzano le prime due reazioni per la sintesi di urea: la carbamilfosfato sintetasi e l'ornitin-carbamil transferasi. La sintomatologia nella carenza di ciascuna dei due enzimi è simile. Malgrado tali attività siano espresse solo nei mitocondri epatici la sintomatologia è a carico soprattutto del sistema nervoso

centrale che è estremamente sensibile agli effetti tossici dello ione ammonio. I sintomi sono: episodi acuti di iperammoniemia, accompagnati da vomito, irritabilità e sonnolenza, seguita da letargia, convulsioni e coma. Può essere presente anche un grave ritardo psicomotorio. La carenza di carbamilfosfato sintetasi può manifestarsi molto precocemente, nel periodo neonatale, come una grave sindrome neurologica aggravata dall'alimentazione proteica. I bambini muoiono di solito entro il primo anno di vita. Una seconda forma compare più tardivamente ed è caratterizzata da ritardo mentale. La deficienza di ornitin-carbamil transferasi è trasmessa con una ereditarietà legata al sesso (il gene è stato localizzato sul braccio corto del cromosoma X, banda Xp21.1, vicino al gene per la distrofia di Duchenne).

2. Difetti del metabolismo dell'acido propionico e dell'utilizzazione dei corpi chetonici. - Nel primo caso i pazienti soffrono di episodi ricorrenti di chetoacidosi con gravi manifestazioni neurologiche. Il blocco di una tappa metabolica comporta l'accumulo del substrato a monte che viene escreto in grande quantità nelle urine, come ad esempio l'aciduria metilmalonica dovuta al difetto di metil-malonil-CoA mutasi. Nel secondo caso la sintomatologia è caratterizzata da acidosi metabolica insorgente nei primi mesi di vita e coinvolgimento variabile del S.N.C.

Bibliografia

- Cooper J. M. et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1990, **18**, 517-519.
DiMauro S., Moraes C. T., *Arch. Neurol.*, 1993, **40**, 1197-1208.
Goto Y. et al., *Nature*, 1990, **348**, 651-653.
Hartl F. U., Neupert W., *Science*, 1990, **247**, 930-938.
Martinus et al., *FASEB J.*, 1995, **9**, 371-378.
Poulton J., Holt I. J., *Nature genetics*, 1994, **8**, 313-315.
Schon E. A. et al., *Science*, 1989, **244**, 346-349.
Shapira A. H., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, **3**, 457-465.
Shoffner J. M. et al., *Cell*, 1990, **61**, 931-937.
Takakubo et al., *Am. J. Hum. Gen.*, 1995, **57**, 772-780.
Wallace D. C., *Trends in Genetics*, 1993, **3**, 128-133.
Zeviani M., Taroni, in *Balliere's Clinical Neurology*, Vol. 3, Harding A. E. ed., 1994, London: Balliere-Tindall, London.

GIOVANNI SALVIATI

MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE (Malattie da deficit biochimico della catena respiratoria mitocondriale)

F. *encéphalopathies et encéphalomyopathies mitochondriales*. - I. *mitochondrial encephalopathies and encephalomyopathies*. - T. *Mitochondrien Encephalopathien und Encephalomyopathien*. - S. *encefalopatias y encefalomiopatias mitochondriales*.

SOMMARIO

INTRODUZIONE E DEFINIZIONE	col. 3735
CONSIDERAZIONI GENETICHE	col. 3736
CONSIDERAZIONI CLINICHE	col. 3740
CONSIDERAZIONI BIOCHIMICHE E MORFOLOGICHE	col. 3741
CLASSIFICAZIONE	col. 3741
DIFETTI GENETICI DEL DNA MITOCONDRIALE	col. 3742
Encefalomiopatie mitocondriali associate a macroriarrangiamenti del mtDNA (col. 3742): Macroriarrangiamenti nella CPEO, nella sindrome di Kearns-Sayre, nella sindrome di Pearson. - Patogenesi molecolare dei riarrangiamenti del mtDNA. - Encefalomiopatie mitocondriali associate a mutazioni puntiformi del mtDNA (col. 3744): MERRF. - MELAS. - NARP. - LHON. - Patogenesi molecolare delle mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale.	
DIFETTI DI COMUNICAZIONE TRA DNA NUCLEARE E DNA MITOCONDRIALE	col. 3747
Orfalmoplegia cronica progressiva (col. 3748). - Deplezione tessuto-specifica del mtDNA (col. 3748).	

MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE

DIFETTI BIOCHIMICI DELLA CATENA RESPIRATORIA A ETIOLOGIA GENETICA SCONOSCIUTA

col. 3748

Difetti di geni nucleari (col. 3748). - **Patologia pediatrica** (col. 3748): *Forma miopatica*. - *Forma encefalomiopatica (malattia di Leigh)*. - **Patologia dell'adulto** (col. 3750).

CONSIDERAZIONI DIAGNOSTICHE

col. 3750

INTRODUZIONE E DEFINIZIONE

Le encefalopatie ed encefalomiopatie mitocondriali appartengono ad un più vasto gruppo di patologie umane, le malattie mitocondriali (Zeviani e Antozzi, 1992; Di Mauro e Moraes, 1993). Nonostante il mitocondrio sia sede di varie vie del metabolismo energetico (tra le quali il ciclo di Krebs, la β -ossidazione degli acidi grassi, il complesso della piruvico deidrogenasi, etc.), verranno qui considerate solo le sindromi associate ad un *deficit biochimico della catena respiratoria mitocondriale*. Si rimanda invece ad altri capitoli della presente opera (v. MITOCONDRI**, *malattie mitocondriali*) per una trattazione di altre malattie associate a difetti del metabolismo energetico.

La catena respiratoria mitocondriale rappresenta l'ultima tappa del metabolismo energetico aerobio. La fun-

zione della catena respiratoria consiste nella fosforilazione ossidativa dell'ADP (adenosindifosfato) in ATP (adenosintrifosfato), lo «scambiatore energetico» universale della cellula. La *fosforilazione ossidativa* si svolge nella membrana interna dei mitocondri, mediante una serie sequenziale di reazioni di ossidoriduzione effettuate dai primi quattro complessi respiratori (complesso I: NADH-ubichinone [coenzima Q] reduttasi; complesso II: succinato-ubichinone [coenzima Q] reduttasi; complesso III: ubichinol-citocromo c reduttasi; complesso IV: citocromo c ossidasi). L'energia liberata durante le reazioni di ossidoriduzione viene utilizzata per sostenere un gradiente protonico transmembrana, che fornisce l'energia per la fosforilazione di ADP in ATP, catalizzata dal complesso respiratorio V (ATP-sintetasi) (fig. 1).

CONSIDERAZIONI GENETICHE

Dal punto di vista genetico, la catena respiratoria ha caratteristiche uniche, in quanto è formata dalla complementazione di due diversi sistemi genetici, il *genoma nucleare* (DNA nucleare, nDNA) e il *genoma mitocondriale* (DNA mitocondriale, mtDNA). Il nDNA è responsabile della sintesi della maggior parte delle subunità proteiche costituenti gli enzimi della catena respiratoria, nonché delle molecole

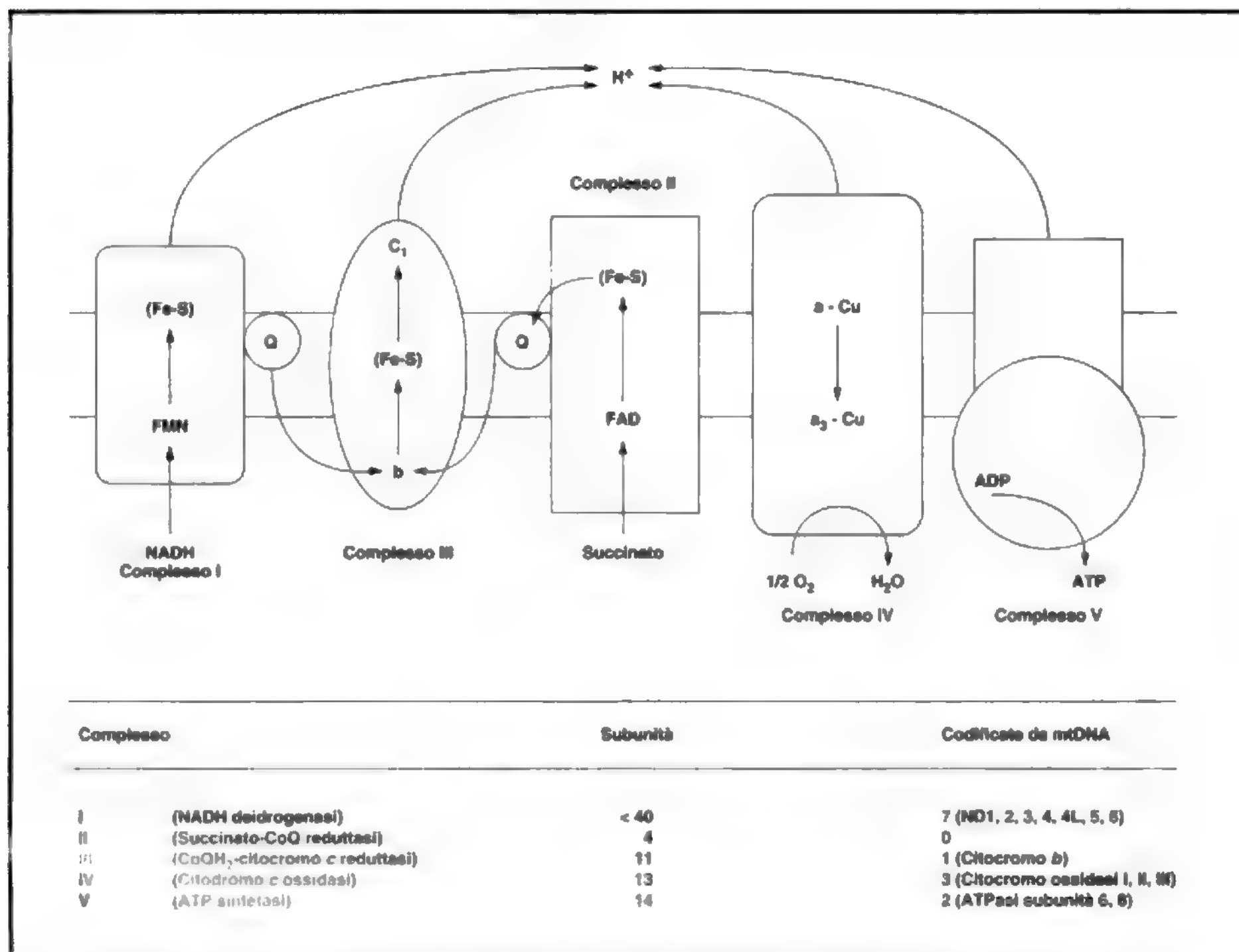


Fig. 1. Rappresentazione schematica dei cinque complessi della catena respiratoria e indicazione delle subunità codificate dal DNA mitocondriale.

necessarie al mantenimento della struttura e della funzione globale del mitocondrio stesso (replicazione, trascrizione e traduzione). Le proteine codificate dal nDNA devono essere importate nel mitocondrio dal citoplasma cellulare per esercitare la propria funzione. Ciò è possibile grazie ad un complesso sistema di trasporto specifico, che è in grado di riconoscere le proteine destinate all'importazione intramitocondriale per la presenza di una estensione oligopeptidica N-terminale che funge da «peptide segnale».

A sua volta, il mtDNA umano è invece un piccolo cromosoma circolare a doppia elica della lunghezza di 16,5 kilobasi, presente nella matrice mitocondriale in 2-10 copie per ciascun organello (Anderson *et al.*, 1981) (fig. 2). Il mtDNA è costituito da sequenze geniche codificanti gli RNA messaggeri (mRNA) che corrispondono a 13 subunità enzimatiche della catena respiratoria (7 subunità del complesso I, 3 subunità del complesso IV, 1 subunità del complesso III, 2 subunità del complesso V). Inoltre, il

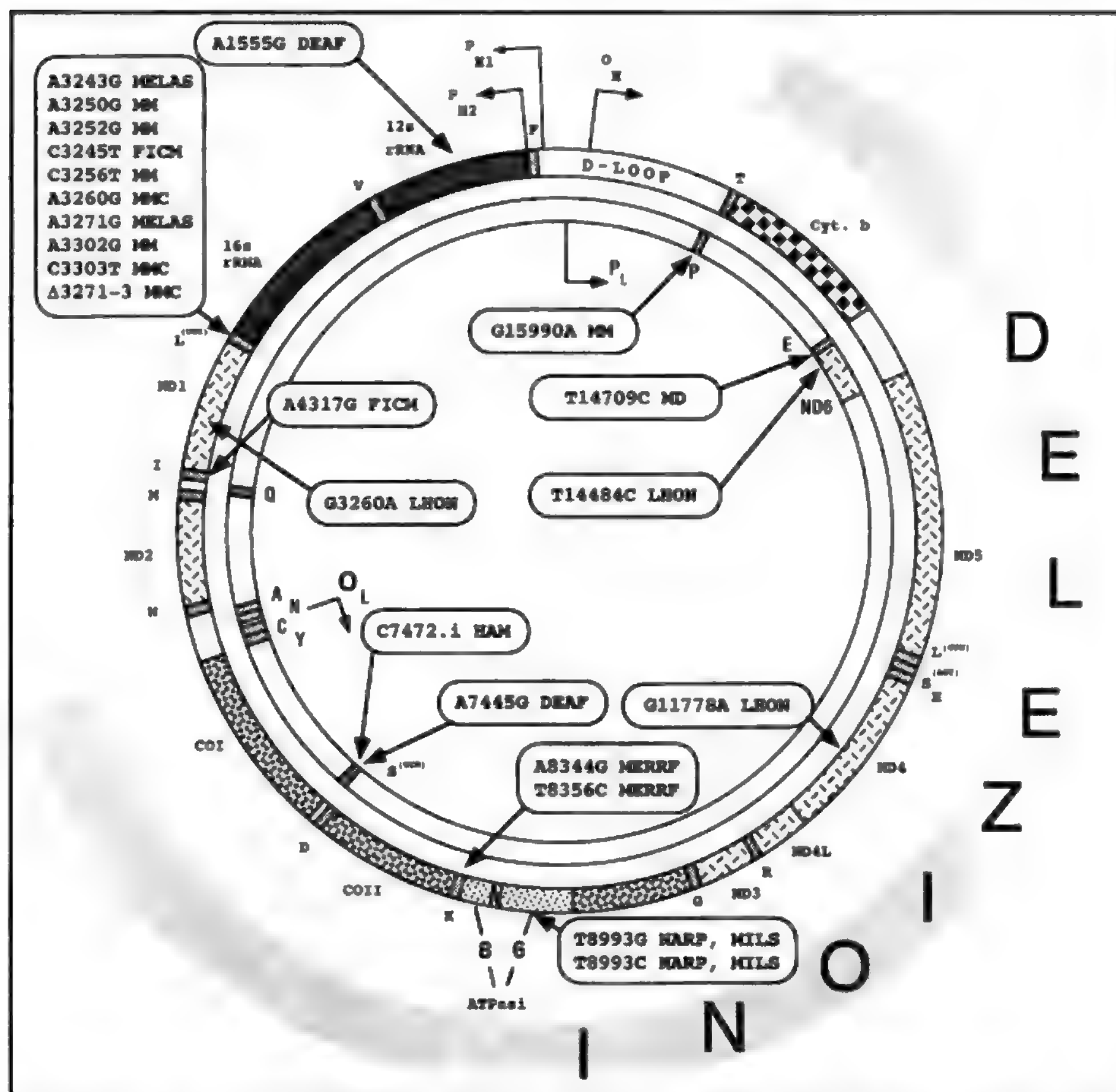


Fig. 2. Mappa del DNA mitocondriale umano e localizzazione delle relative alterazioni molecolari. P_{H1}: origine del promotore principale del filamento pesante; P_{H2}: origine del promotore secondario del filamento pesante; O_H: origine della replicazione del filamento pesante; O_L: origine della replicazione del filamento leggero; P_L: promotore del filamento leggero, 12S rRNA e 16S rRNA: RNA ribosomali mitocondriali; ND1-6: subunità della NADH-deidrogenasi; CO I-III: subunità della citocromo c ossidasi; Cyt. b: citocromo b; singole lettere maiuscole: sequenze geniche codificanti tRNA; semicerchio esterno: localizzazione delle macrodelezioni del mtDNA; MM: miopia mitocondriale; MMC: miopia-cardiomiopia mitocondriale, FICM: *fatal infantile cardiomyopathy*; MILS: *maternally inherited Leigh's syndrome*; DEAF: *deafness* (ipoacusia); MD: encefalomiopia, diabete; HAM: *hearing loss, ataxia, myoclonus*; MELAS, NARP, MERRF, LHON: cfr. testo.

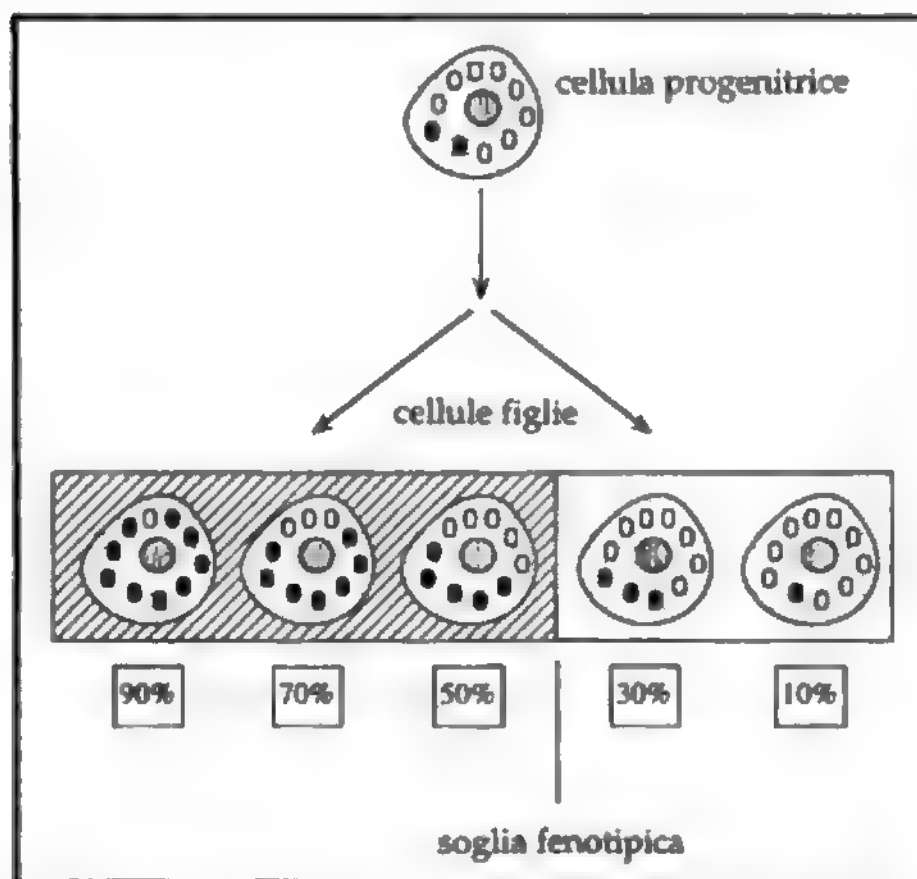


Fig. 3. Segregazione mitotica: distribuzione casuale dei mitocondri con DNA mitocondriale mutato nelle cellule figlie dopo la divisione cellulare ed espressione fenotipica in relazione alla percentuale di mtDNA mutato rispetto al normale.

mtDNA contiene i geni codificanti 22 RNA-transfer (tRNA) e 2 RNA ribosomali (rRNA), necessari per la traduzione del mtDNA stesso.

Dal punto di vista genetico, il mtDNA presenta le seguenti caratteristiche peculiari.

1) A differenza del nDNA, il mtDNA è trasmesso per *via matrilineare*, poiché tutto il patrimonio mitocondriale dello zigote deriva esclusivamente dalla cellula uovo: ne consegue che le madri affette o portatrici trasmetteranno la malattia a tutti i figli, ma soltanto le femmine trasmetteranno la malattia alle generazioni successive.

2) Il patrimonio genomico mitocondriale è poliploide. Dato che ciascuna cellula contiene centinaia di mitocondri e che ciascun mitocondrio contiene numerose copie di mtDNA, durante il ciclo mitotico i mitocondri e le molecole di mtDNA sono trasmesse secondo una distribuzione statistica. Ciò ha importanti conseguenze per la patologia mitocondriale.

Negli individui normali il genotipo mitocondriale è di regola composto da una singola specie di mtDNA, una condizione nota con il termine di *omoplasma*. Al contrario, è frequente che mtDNA mutato e mtDNA selvatico coesistano nelle cellule di un individuo affetto da una malattia mitocondriale, una condizione che viene definita con il termine di *eteroplasma*. Per effetto della distribuzione stocastica (cioè a caso) degli organelli, la proporzione delle diverse popolazioni di mtDNA può variare considerevolmente ad ogni successiva generazione. Questo fenomeno, fatto come *segregazione mitotica*, contribuisce a determinare vari livelli di eteroplasma osservabili in tessuti diversi nello stesso paziente, e ad aumentare la variabilità delle presentazioni cliniche osservabili in pazienti della stessa mutazione (fig. 3).

3) Infine, l'espressione fenotipica di una determinata mutazione (eteroplasma) del mtDNA, dipende dalla proporzione relativa di mtDNA mutato rispetto al normale, che deve superare un livello critico tale da alterare

in modo significativo il metabolismo energetico (il cosiddetto *effetto soglia*). Tale soglia è variabile da tessuto a tessuto e dipende dalle richieste energetiche proprie ad ogni tessuto, e dalla sua dipendenza dal metabolismo aerobico.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

La complessità degli aspetti biochimici e genetici della catena respiratoria rende ragione dell'estrema variabilità ed eterogeneità delle presentazioni cliniche delle malattie mitocondriali. In genere, i tessuti caratterizzati da una più elevata richiesta energetica aerobica, come il muscolo scheletrico, il miocardio e il sistema nervoso centrale, risultano i più colpiti. Ciascuno di questi tessuti può essere affetto da solo (miopatie, cardiomiopatie, o encefalopatie isolate), o in sindromi combinate (encefalo-miopatie ed encefalo-cardio-miopatie mitocondriali). Ad es., l'ipostenia degli arti, con o senza intolleranza all'esercizio, può essere la sola manifestazione clinica di una malattia mitocondriale, o può essere associata ad oftalmoplegia cronica progressiva (CPEO; v. sotto), ptosi, retinopatia, e ad alterazioni encefalopatiche che vanno dalla demenza, alle crisi epilettiche, all'epilessia mioclonica, all'atassia, o ad episodi di tipo ictale. Meno frequente è il coinvolgimento dei parenchimi renale, epatico, pancreatico, etc. Tuttavia, virtualmente ogni tessuto dell'organismo può essere affetto, singolarmente o in associazione ad altri. I principali sintomi e segni clinici osservabili nella patologia mitocondriale sono riportati in tab. I.

TAB. I. SINTOMI E SEGNI ASSOCIATI ALLA PATOLOGIA MITOCONDRIALE

Manifestazioni neurologiche:	- intolleranza all'esercizio, miopatia - oftalmoplegia progressiva - atassia - mioclono - epilessia - neuropatia ottica - ipoacusia neurosensoriale - decadimento mentale - episodi tipo <i>stroke</i> (nel giovane) - distonia - polineuropatia - emicrania - aumento delle proteine liquorali - calcificazioni gangli della base - alterazioni di segnale (RMN)
Manifestazioni extraneurologiche:	- cardiomiopatia - alterazioni del ritmo cardiaco - bassa statura - cataratta - retinopatia pigmentosa - nausea e vomito - acidosi lattica - diabete mellito - epatopatia - nefropatia - pancitopenia - pseudo-ostruzione intestinale - insufficienza pancreatica esocrina - ipoparatiroidismo

CONSIDERAZIONI BIOCHIMICHE E MORFOLOGICHE

La diagnosi di malattia mitocondriale si avvale di indagini morfologiche (biopsia muscolare), biochimiche (studio dell'attività degli enzimi della catena respiratoria) e genetiche (analisi molecolare del mtDNA). Nella maggior parte dei casi lo studio morfologico della biopsia muscolare mette in evidenza, con opportune colorazioni, le tipiche *ragged red fibres* (letteralmente «fibre rosse stracciate o sfilacciate»), ritenute espressione dell'accumulo di mitocondri strutturalmente anomali e di dimensioni alterate, al di sotto della membrana della cellula muscolare. Le anomalie strutturali degli organelli sono facilmente osservabili al microscopio elettronico. Le fibre *ragged red* mostrano spesso l'assenza della reazione istochimica per la citocromo c ossidasi (complesso IV della catena respiratoria) (fig. 4), ad indicare che la proliferazione mitocondriale rappresenta un tentativo inefficace di compensare un deficit funzionale. Lo studio biochimico, effettuabile sia su tessuto muscolare biotico che su fibroblasti in coltura, consente di identificare il deficit a carico di uno o più complessi della catena respiratoria.

In epoca più recente, alle indagini sopra citate si è aggiunta l'analisi molecolare, che consente di identificare la presenza di mutazioni a carico del mtDNA. Quest'ultima indagine è divenuta fondamentale, sia per il corretto inquadramento diagnostico di ogni singolo paziente, che per eventuali studi di carattere patogenetico.

CLASSIFICAZIONE

Nonostante siano state descritte sindromi ben definite dal punto di vista nosologico, il riscontro clinico non è sufficiente a delineare una classificazione esauriente delle mitocondriopatie, a causa della grande variabilità fenotipica e del frequente riscontro di pazienti con quadri clinici aspecifici o sovrapposti. Analogamente, al medesimo difetto biochimico della catena respiratoria, possono associarsi quadri clinici del tutto diversi, ed il riscontro morfologico delle

fibre *ragged red* può mancare in malattie identificabili come sicuramente mitocondriali mediante criteri biochimici e/o genetici. Infine, l'analisi molecolare del mtDNA non è informativa in tutti i pazienti.

Perciò, le classificazioni forse più utili delle mitocondriopatie tentano di collegare le presentazioni cliniche alle alterazioni biochimiche, morfologiche, genetiche e molecolari. Le malattie mitocondriali vengono qui divise in tre gruppi principali: 1) difetti genetici del mtDNA, 2) difetti della comunicazione tra nDNA e mtDNA, e 3) difetti biochimici della catena respiratoria mitocondriale a etiologia genetica sconosciuta.

DIFETTI GENETICI DEL DNA MITOCONDRIALE

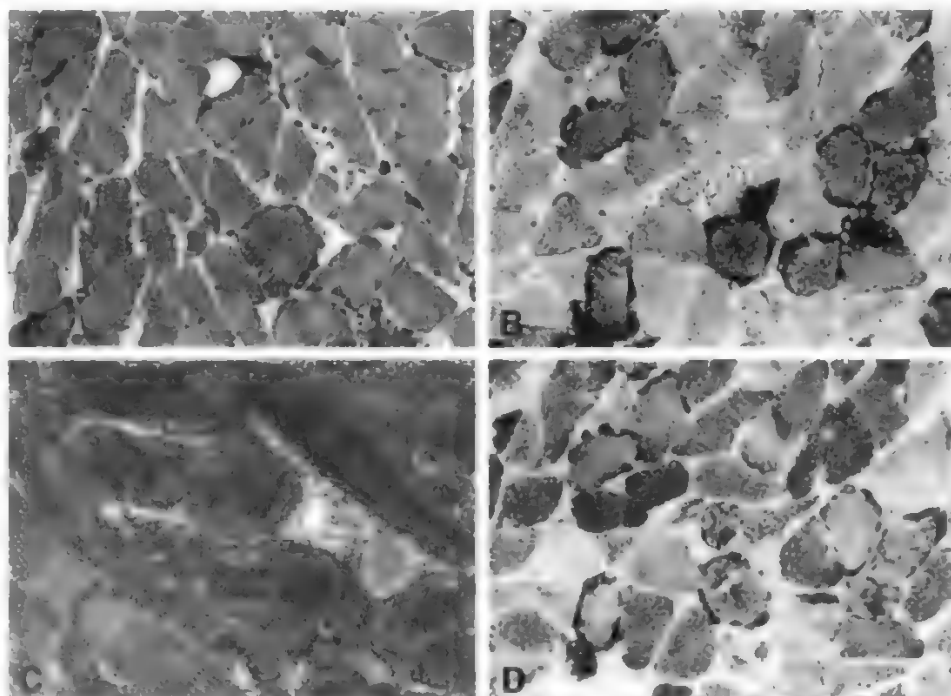
I difetti genetici del mtDNA vengono classificati in base alle caratteristiche molecolari della mutazione in causa. Si distinguono pertanto: a) encefalomiopatie mitocondriali associate a macroriarrangiamenti del mtDNA, e b) encefalomiopatie mitocondriali associate a mutazioni puntiformi del mtDNA.

Encefalomiopatie mitocondriali associate a macroriarrangiamenti del mtDNA

Macroriarrangiamenti nella CPEO, nella sindrome di Kearns-Sayre, nella sindrome di Pearson.

Per macroriarrangiamento si intende la delezione, o più raramente la duplicazione, di un frammento più o meno lungo di mtDNA. Tale alterazione molecolare è stata associata a circa il 50% dei pazienti affetti da *oftalmoplegia cronica progressiva* (CPEO, *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*), malattia sporadica che si manifesta con ptosi palpebrale bilaterale e progressiva riduzione dei movimenti oculari sia sul piano verticale che su quello orizzontale (Holt *et al.*, 1988; Zeviani *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1989). La CPEO è talvolta associata alla ridotta tolleranza allo sforzo, causata da una miopatia a distribuzione prevalente nei distretti muscolari prossimali degli arti.

Fig. 4. A) Sezione di tessuto muscolare (colorazione tricromica di Gomori modificata): si osservano fibre con marcato aumento della basofilia subsarcolemmale (fibre *ragged red*). B) (Colorazione istochimica per la succinico deidrogenasi): netto aumento della reattività in sede subsarcolemmale. C) In microscopia elettronica si osservano alterazioni strutturali dei mitocondri e presenza di inclusioni paracristalline. D) (Colorazione istochimica per la citocromo ossidasi): alcune fibre presentano assenza di reattività. (Per gentile concessione della Dr.ssa Marina Mora, Istituto Neurologico «C. Besta», Milano).



La stessa alterazione molecolare è inoltre riscontrabile nella maggior parte dei pazienti affetti da *sindrome di Kearns-Sayre* (v. KEARNS-SAYRE, SINDROME DI*), una malattia sporadica caratterizzata da oftalmoplegia progressiva, retinopatia pigmentosa, ed esordio entro i 20 anni. A questi segni obbligatori per porre la diagnosi si possono associare alterazioni della conduzione atrioventricolare, atassia cerebellare, iposviluppo somatico, miopatia scheletrica con fibre *ragged red*, ed aumento delle proteine liquorali. La malattia ha generalmente una prognosi infausta. Non esiste attualmente alcun trattamento efficace per questa patologia, a parte il posizionamento di *pacemaker* in caso di aritmia intrattabile.

Macroriarrangiamenti del mtDNA sono stati inoltre riportati nella *sindrome di Pearson*, una pancitopenia congenita associata a insufficienza pancreatica esocrina. Nonostante la *sindrome di Pearson* sia caratterizzata dal prevalente interessamento dell'emopoiesi e dell'apparato gastro-intestinale, possono essere presenti lesioni cerebrali tipiche delle encefalopatie mitocondriali, e i pazienti che sopravvivono alla grave pancitopenia e al malassorbimento, possono poi sviluppare una *sindrome di Kearns-Sayre*.

A sua volta, la CPEO sporadica può essere considerata una forma incompleta di *sindrome di Kearns-Sayre*. Perciò, la *sindrome di Pearson*, la *sindrome di Kearns-Sayre*, e la CPEO rappresentano espressioni cliniche di diversa gravità dello stesso difetto molecolare (Rotig *et al.*, 1990).

Macroriarrangiamenti del mtDNA sono stati inoltre descritti in diverse sindromi, come in alcuni casi di *sindrome di Wolfram* (diabete insipido, diabete mellito, atrofia ottica e sordità), in casi classificati come «leucodistrofia», e in alcuni casi di malassorbimento dell'infanzia con diarrea cronica. Come per la *sindrome di Pearson*, alcuni di questi pazienti hanno successivamente sviluppato una *sindrome di Kearns-Sayre*, a testimoniare l'importanza dell'indagine molecolare del mtDNA anche in casi clinicamente atipici o inusuali. Ciò è ulteriormente corroborato dalla recente individuazione di famiglie con diabete mellito e sordità a trasmissione matrilineare, associate a duplicazioni del mtDNA (Ballinger *et al.*, 1992).

Patogenesi molecolare dei riarrangiamenti del mtDNA

Lo scivolamento e l'appaiamento «illegittimo» tra sequenze ripetute identiche, o simili, lungo la molecola di mtDNA è il meccanismo comunemente accettato per la generazione delle delezioni mitocondriali (Schon *et al.*, 1989; Madsen *et al.*, 1993). Tale meccanismo è stato riprodotto *in vitro* e in sistemi in coltura.

La perdita di geni strutturali della catena respiratoria (mRNA), e di geni coinvolti nella traduzione del mtDNA (tRNA e più raramente rRNA) compresi nel frammento deletato, spiega perché, dal punto di vista biochimico, le malattie associate a delezioni del mtDNA siano caratterizzate da deficit multipli della catena respiratoria. La delezione del mtDNA è sempre eteroplasmica, cioè coesiste con una quota variabile di mtDNA normale. Quest'ultimo può correggere parzialmente la perdita di mRNA e tRNA e quindi complementare il difetto metabolico, che altrimenti sarebbe incompatibile con la sopravvivenza cellulare.

La grave compromissione funzionale agisce probabilmente da stimolo proliferativo sui mitocondri, determinando la trasformazione *ragged red* delle fibre muscolari.

Non è nota la ragione per cui le delezioni del mtDNA sono per lo più sporadiche e singole. È possibile che alcuni contenenti percentuali significative di mtDNA deletato non sopravvivano, impedendo così la trasmissione della lesione molecolare. Inoltre, la presenza di una singola delezione (o duplicazione) del mtDNA in ciascun individuo suggerisce

che un singolo evento mutazionale somatico venga, per motivi ancora ignoti, amplificato clonalmente durante lo sviluppo post-zigotico.

Encefalomiopatie mitocondriali associate a mutazioni puntiformi del mtDNA

Si tratta di quadri clinici associati a singole sostituzioni (o inserzioni/delezioni) nucleotidiche nella molecola del mtDNA. Tali mutazioni possono interessare sequenze codificanti tRNA, mRNA o rRNA. Tutte le mutazioni puntiformi vengono trasmesse per via matrilineare.

Nonostante la organizzazione estremamente compatta, la velocità evolutiva del mtDNA è assai elevata, e polimorfismi intraspecifici sono frequenti nelle varie popolazioni umane. Perciò, la rilevanza patogenetica di una mutazione puntiforme deve essere dimostrata sulla base di criteri quali la elevata conservazione filogenetica del nucleotide mutato, la segregazione specifica con la malattia, e la correlazione tra il grado di eteroplasmia, se presente, e la severità della compromissione clinica o metabolica. Solo le mutazioni che soddisfano questi criteri verranno qui prese in considerazione.

Riportiamo le principali sindromi cliniche associate a mutazioni puntiformi del mtDNA (un elenco aggiornato è riportato in tab. II).

MERRF

La mioclono epilessia con fibre *ragged red* (MERRF, *Myoclonus Epilepsy with Ragged Red Fibers*) è caratterizzata dall'associazione di mioclono, epilessia, ipostenia ed ipotrofia muscolare, atassia cerebellare, ipoacusia e deterioramento mentale. L'entità delle manifestazioni cliniche può essere estremamente variabile nell'ambito della stessa famiglia. Tale variabilità si ritiene sia in relazione alla quantità di mtDNA mutato rispetto al normale (eteroplasmia) ed alla variabile distribuzione tessutale della mutazione. La maggior parte delle linee materne affette da MERRF è portatrice di una transizione eteroplasmica A→G in posizione nucleotidica 8344 del mtDNA (Shoffner *et al.*, 1991). In alcune famiglie risultate negative per la precedente, è stata osservata una mutazione in posizione 8356. In entrambi i casi il gene colpito codifica il tRNA della lisina (Zeviani *et al.*, 1993).

MELAS

L'encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi ictali (MELAS, *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*) è caratterizzata dalla seguente «triade obbligatoria»: episodi ictali ricorrenti, reversibili o permanenti, con corrispondenti alterazioni encefaliche focali dimostrabili mediante TAC o Risonanza Magnetica Nucleare (v. sotto, fig. 5), acidosi lattica e/o presenza di fibre *ragged red* alla biopsia muscolare. Si associano frequentemente altri segni di interessamento del sistema nervoso centrale, come epilessia focale o generalizzata, cefalea, ipoacusia neurosensoriale, episodi di vomito ricorrente, e decadimento mentale. La malattia è stata associata a una sostituzione A→G in posizione nucleotidica 3243 del mtDNA, nel gene codificante il tRNA per la leucina (codone UUR) (Goto *et al.*, 1990). Altre mutazioni in questo e in altri tRNA sono state più raramente identificate in pazienti affetti da MELAS. Inoltre, la mutazione A3243G può talvolta causare una *sindrome CPEO*, complicata da segni centrali, o, eccezionalmente, una *sindrome* caratterizzata da diabete mellito e sordità, senza evidenti segni di miopatia o encefalopatia. Ricordiamo infine che non tutti i pazienti con fenotipo MELAS fino ad oggi studiati presentano una causa genetica nota.

MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE

TAB. II. MUTAZIONI PUNTIFORMI DEL mtDNA E FENOTIPI ASSOCIATI

(da *Neuromuscular Disorders*, Vol. 5, N. 5, settembre 1995)

Mutazione	Fenotipo	Gene interessato
A8344G	MERRF	tRNA ^{Lys}
T8356C	MERRF/MELAS	tRNA ^{Lys}
A3243G	MELAS, PEO, diabete-ipoacusia	tRNA ^{Leu(UUR)}
T3271C	MELAS	tRNA ^{Leu(UUR)}
T3291C	MELAS	tRNA ^{Leu(UUR)}
A3252G	Encefalomiopatia, MELAS	tRNA ^{Leu(UUR)}
T3250C	Miopia	tRNA ^{Leu(UUR)}
A3251G	Miopia, PEO	tRNA ^{Leu(UUR)}
C3256T	Miopia, PEO	tRNA ^{Leu(UUR)}
A3302G	Miopia	tRNA ^{Leu(UUR)}
C15590T	Miopia	tRNA ^{Pro}
A5692G	PEO	tRNA ^{Asn}
C5703T	PEO	tRNA ^{Asn}
T12311C	PEO	tRNA ^{Leu(CUN)}
A3260G	Miopia + cardiomiopia	tRNA ^{Leu(UUR)}
C3303T	Cardiomiopia	tRNA ^{Leu(UUR)}
T9997C	Cardiomiopia	tRNA ^{Gly}
A4269G	Cardiomiopia	tRNA ^{Ile}
G5549A	Demenza/corea	tRNA ^{Tryptophan}
T14709C	Encefalomiopia/diabete	tRNA ^{Glu}
T8993G	NARP, sindrome di Leigh	ATPasi 6
T8993C	NARP, sindrome di Leigh	ATPasi 6
A15923G	Sindrome multisistemica fatale congenita	tRNA ^{Thr}
A1555G	Ipoacusia da aminoglicosidi	12s rRNA
T7445C	Ipoacusia matrilineare	tRNA ^{Ser(UCN)}
T3394C	LHON	sub. 1 complesso I (ND1)
G3460A	LHON	sub. 1 complesso I (ND1)
T4160C	LHON	sub. 1 complesso I (ND1)
T4216C	LHON	sub. 1 complesso I (ND1)
A4917G	LHON	sub. 2 complesso I (ND2)
G5244A	LHON	sub. 2 complesso I (ND2)
G7444A	LHON	sub. I citocromo-ossidasi
G9438A	LHON	sub. III citocromo-ossidasi
G9804A	LHON	sub. III citocromo-ossidasi
G11778A	LHON	sub. 4 complesso I (ND4)
G13708A	LHON	sub. 5 complesso I (ND5)
T14484C	LHON	sub. 6 complesso I (ND6)
G15257A	LHON	citocromo b
G15812A	LHON	citocromo b
G14459A	LHON-distonia	sub. 6 complesso I (ND6)

NARP

La sindrome caratterizzata da ipostenia muscolare neurogena, atassia e retinite pigmentosa (NARP, *Neurogenic muscle weakness, Ataxia, Retinitis Pigmentosa*) è caratterizzata, oltre che dai suddetti segni, dalla possibile presenza di epilessia e decadimento mentale. La malattia ha in genere esordio in età adulta. A differenza delle patologie sopra descritte, la biopsia muscolare non mostra le tipiche fibre *ragged red*. La malattia è stata associata a due mutazioni puntiformi, entrambi interessanti il nucleotide 8993, nel

gene codificante la subunità 6 dell'ATPasi mitocondriale (complesso V della catena respiratoria) (Holt *et al.*, 1990; Tatuch *et al.*, 1992). Le stesse mutazioni, ma con un grado di eteroplasma nettamente più elevato rispetto al fenotipo NARP, sono state anche riscontrate in alcuni pazienti affetti da sindrome di Leigh matrilineare (*Maternally Inherited Leigh Syndrome*, MILS). Soggetti affetti da NARP possono coesistere nella stessa linea materna di soggetti affetti da MILS.

Altre mutazioni puntiformi che colpiscono geni mitocon-

driali sono state recentemente identificate, in individui singoli o in famiglie, affetti da diverse presentazioni cliniche, come miopatie, cardiomiopatie, encefalomiopatie, e sordità neurosensoriali spontanee o indotte da aminoglicosidi. Per motivi finora sconosciuti, la maggior parte di queste mutazioni si concentrano sul gene codificante il tRNA per la leucina (codone UUR).

LHON

Un posto a parte va riservato alla neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON, *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*). È questa una malattia ad esordio in età giovanile e netta prevalenza nel sesso maschile, caratterizzata dalla perdita acuta o subacuta della visione centrale con esito in atrofia ottica. Il deficit visivo, che a parte rari casi è permanente, costituisce in genere l'unica manifestazione della malattia che, raramente, può associarsi ad alterazioni del ritmo cardiaco (sindrome di pre-eccitazione ventricolare). Le caratteristiche alterazioni del fundus sono costituite principalmente da una microangiopatia teleangectasica peripapillare. Analogamente al fenotipo NARP, anche nella malattia di Leber la biopsia muscolare non evidenzia la presenza di fibre *ragged red*. La malattia è stata associata a numerose mutazioni puntiformi del mtDNA. Di queste, alcune vengono considerate come primarie in quanto osservate esclusivamente in pazienti affetti da LHON. Si tratta delle mutazioni dei nucleotidi 3460, 11778 e 14484 (che interessano rispettivamente le subunità ND1, ND4 e ND6 del complesso I della catena respiratoria) (Wallace *et al.*, 1988; Howell *et al.*, 1991; Mackey e Howell, 1992). Sono state descritte altre mutazioni puntiformi, definite mutazioni secondarie, l'importanza delle quali non è stata ancora definita. A differenza di altre mutazioni patogene, le mutazioni della LHON sono spesso omoplasmiche. Questa peculiarità, l'estrema specificità tessutale, e la netta prevalenza del sesso maschile, suggeriscono l'esistenza di altri fattori, mitocondriali ed extra-mitocondriali, che inducono e controllano l'espressione clinica della malattia. Ad esempio, è possibile che una seconda mutazione, in un gene sul cromosoma X, possa contribuire alla lesione del nervo ottico. In tal caso, verrebbero colpiti soprattutto i maschi emizigoti, ed una ridotta percentuale di femmine eterozigoti, caratterizzate dall'inattivazione prevalente del cromosoma X indenne. V. anche LEBER, MALATTIA DI (v.; v.*).

Patogenesi molecolare delle mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale

Un difetto generalizzato della traduzione, e la sintesi di polipeptidi «troncati», sono state dimostrate per diverse mutazioni puntiformi del tRNA. Tutte le mutazioni puntiformi si comportano in modo «recessivo», poiché la percentuale di mtDNA mutato necessaria per l'espressione fenotipica è sempre al di sopra dell'80-90%. Come per i macroarrangiamenti del mtDNA, i fenotipi clinici e biochimici possono essere influenzati da fenomeni di complementazione *in organulo* tra i genomi mutanti e selvatici. Non è noto il meccanismo in base al quale le alterazioni genetiche osservate siano in grado di determinare quadri clinici così diversi tra loro, nonostante il deficit biochimico della catena respiratoria mitocondriale sia lo stesso per diverse muta-

DIFETTI DI COMPLEMENTAZIONE TRA DNA NUCLEARE E DNA MITOCONDRIALI

Nonostante il genotipo mitocondriale sia trasmesso per via matrilineare, sono stati descritti quadri clinici associati a lesioni molecolari del mtDNA trasmessi in modo mendeliano.

Oftalmoplegia cronica progressiva

L'oftalmoplegia cronica progressiva a trasmissione autosomica-dominante (AD-CPEO) è una sindrome complessa, ad esordio in età adulta, caratterizzata, oltre alle alterazioni oculari già descritte (CPEO), da ipoacusia neurosensoriale, polineuropatia sensitivo-motoria, atassia, tremore, e moderata acidosi lattica. La biopsia muscolare evidenzia le tipiche fibre *ragged red*. Lo studio genetico delle famiglie affette ha documentato la presenza, nello stesso soggetto, di macrodelezioni multiple del mtDNA (Zeviani *et al.*, 1989). Dato che la trasmissione è di tipo autosomico dominante, si ritiene che la presenza di delezioni multiple sia la conseguenza di una mutazione a carico di geni nucleari ancora non identificati, ma presumibilmente importanti nel mantenimento dell'integrità del mtDNA stesso. Grazie all'analisi di *linkage*, sono stati recentemente identificati due loci genici (uno sul cromosoma 10q, l'altro sul cromosoma 3p) responsabili di questa malattia in famiglie diverse, e vi sono prove dell'esistenza di almeno un terzo locus, ancora non localizzato.

Deplezione tessuto-specifica del mtDNA

Recentemente sono state descritte, in pazienti in età pediatrica, numerose sindromi cliniche caratterizzate da deplezione tessuto-specifica del mtDNA (Moraes *et al.*, 1991). Si tratta di una patologia a trasmissione autosomica recessiva in cui il mtDNA nei tessuti affetti è ridotto a meno del 2% del normale. Dal punto di vista clinico, i pazienti presentano (a seconda del tessuto colpito) una grave miopia, o nefropatia, o epatopatia. La malattia ha esito infausto entro il primo anno di vita. Pazienti con deplezione di mtDNA meno grave presentano un esordio attorno al primo anno di vita ed un quadro clinico indicativo di una encefalomiopatia ad andamento progressivo. Si presume che l'alterazione molecolare interessi un gene nucleare coinvolto nei processi di replicazione del mtDNA.

DIFETTI BIOCHIMICI DELLA CATENA RESPIRATORIA A ETIOLOGIA GENETICA SCONOSCIUTA

Difetti di geni nucleari

In un solo caso è stato finora possibile individuare un difetto genetico di un gene nucleare della catena respiratoria (Bourgeron *et al.*, 1995). Si tratta di una mutazione puntiforme in una delle due subunità del complesso II, responsabile di un'encefalomiopatia mitocondriale simile alla sindrome di Leigh (v. sotto). In tutti gli altri casi l'alterazione molecolare alla base della sintomatologia è sconosciuta, e la classificazione di queste malattie è basata esclusivamente sul riscontro di un difetto biochimico della catena respiratoria (Di Mauro e Moraes, 1993). Come già accennato, la maggior parte delle subunità proteiche costituenti gli enzimi della catena respiratoria sono codificate dal nDNA. Nonostante non esista una prova diretta dell'origine nucleare del difetto genetico questa possibilità si basa sull'osservazione di casi familiari a trasmissione mendeliana (autosomica recessiva).

Analogamente ai quadri associati a mutazioni del mtDNA, i difetti nucleari della catena respiratoria presentano una notevole eterogeneità clinica, con esordio in età neonatale, infantile, giovanile e adulta.

Patologia pediatrica

Per quanto concerne la patologia pediatrica, sono state descritte sindromi multisistemiche complesse o gravi encefalomiopatie con prognosi generalmente infausta, caratterizzate da ritardo di crescita, ipotonia generalizzata, acidosi lattica e segni di scompenso cardiorespiratorio. I difetti bio-

chimici possono colpire ciascuno dei cinque complessi respiratori. Da segnalare, in ambito pediatrico per la loro relativa frequenza, i difetti del complesso IV (citocromo C ossidasi).

Pazienti con esordio più tardivo presentano un insieme di segni e sintomi di interessamento del sistema nervoso centrale e periferico, tra i quali frequenti sono atassia, epilessia, ipoacusia neurosensoriale, retinopatia pigmentosa, decadimento mentale, disturbi del movimento, polineuropatia.

Dal punto di vista clinico se ne riconoscono due forme principali, la forma miopatica e la forma encefalopatica.

Forma miopatica

È caratterizzata da acidosi lattica e grave ipostenia muscolare responsabile di insufficienza respiratoria, ad esito fatale in genere entro il primo anno di vita. Tale forma va distinta da una rara variante definita «benigna» e caratterizzata da un progressivo spontaneo miglioramento clinico fino alla remissione entro il terzo anno di vita.

Forma encefalopatica (malattia di Leigh)

La forma encefalopatica corrisponde alla malattia di Leigh (o encefalomiopatia necrotizzante subacuta) (Van Coster *et al.*, 1991). I bambini affetti presentano, dopo un iniziale sviluppo normale nei primi mesi di vita, un progressivo ritardo nello sviluppo psicomotorio, oftalmoplegia, vomito ricorrente, epilessia, segni di compromissione delle vie piramidali e del sistema extrapiramidale, difficoltà respiratoria, e marcata acidosi lattica. Particolarmente importante è lo studio dell'encefalo mediante Risonanza Magnetica Nucleare (fig. 6), che evidenzia tipiche alterazioni di segnale a livello del tronco encefalico, del talamo e dei cordoni posteriori del midollo spinale. Nella maggior parte dei pazienti la malattia è associata a deficit del complesso IV, o dell'enzima piruvico-deidrogenasi; più raramente è stata associata ad un difetto del complesso I, e recentemente, al-

cuni pazienti sono risultati portatori della mutazione NARP del mtDNA (Tatuch *et al.*, 1992). Va ricordato che in questi pazienti lo studio della biopsia muscolare non evidenzia fibre *ragged red*; nei casi associati a difetto del complesso IV, pur mancando le fibre *ragged red*, si osserva invece la negatività della reazione istochimica per la citocromo C ossidasi nel tessuto muscolare. V. NERVOSO TESSUTO** (col. **4003).

Patologia dell'adulto

Per quanto riguarda la patologia dell'adulto, non esistono dei quadri clinici tali da costituire entità nosologiche precise. Come accennato, si tratta generalmente di pazienti affetti da compromissione del tessuto muscolare e segni di interessamento del sistema nervoso centrale, in variabile combinazione tra loro. La diagnosi si basa essenzialmente sul riscontro delle alterazioni morfologiche muscolari e sul dosaggio biochimico dell'attività degli enzimi della catena respiratoria.

CONSIDERAZIONI DIAGNOSTICHE

La diagnosi di malattia mitocondriale si basa su informazioni di ordine clinico, morfologico, biochimico e genetico-molecolare. Un'osservazione clinica dettagliata è fondamentale per indirizzare correttamente il protocollo diagnostico da adottare in ogni paziente. Particolare attenzione va posta nei confronti di pazienti affetti da sindromi cliniche ben definite, specie se la storia familiare è compatibile con la trasmissione matrilineare, e se tra i segni clinici sono presenti CPEO, epilessia mioclonica «idiopatica», o episodi ictali. Altrettanto importante è il riscontro di una combinazione inusuale di segni e sintomi, indicativi del coinvolgimento di tessuti diversi, soprattutto in pazienti che presentano manifestazioni cliniche atipiche di non facile classificazione.

L'esame neuroradiologico mediante TAC o Risonanza Magnetica Nucleare può suggerire la diagnosi corretta (figg. 5 e 6) (Barkovich *et al.*, 1993). Lo studio morfologico e



Fig. 5. MELAS: (RMN encefalica) estesa lesione parieto-occipitale posteriore destra.

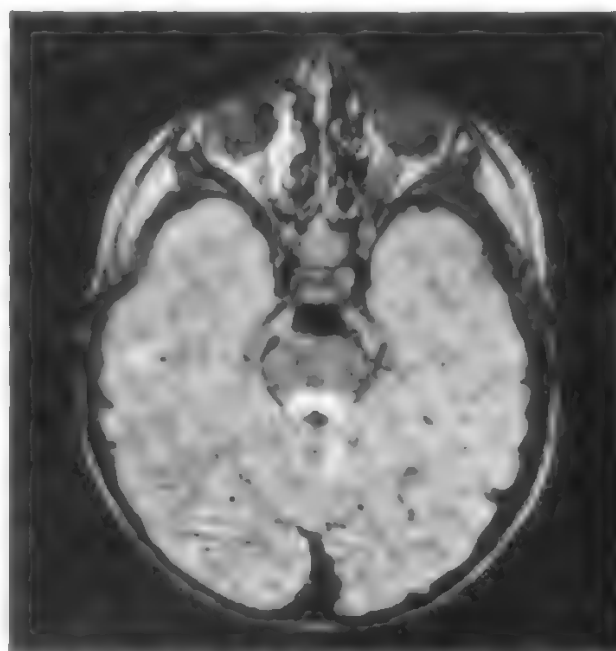


Fig. 6. Sindrome di Leigh: (RMN encefalica) tipica iperintensità di segnale in regione periacqueduttale.

biochimico su biopsia muscolare è spesso decisivo per confermare la diagnosi, tenendo comunque presente che la negatività del quadro non esclude necessariamente la diagnosi. Il prelievo biotico rappresenta inoltre una fonte di tessuto anche per le indagini genetico-molecolari. Tuttavia, per molte sindromi associate a mutazioni puntiformi del mtDNA, la diagnosi molecolare può essere fatta su sangue periferico. La diagnosi molecolare prenatale su tessuto placentare è stata effettuata in casi selezionati, anche se la variabilità «stocastica» dell'eteroplasmia rende il consiglio genetico per queste patologie molto indaginoso e aleatorio.

Ringraziamenti

Questo lavoro è dedicato al ricordo della Ds. Federica Dworzak, Istituto Nazionale Neurologico «C. Besta» Milano. Sringraziamo ARIN e Telethon Italia (Grant n. 767 al Dr. M. Zeviani) per il contributo e l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

Bibliografia

- Anderson S., Bankier A. T. et al., *Nature*, 1981, **290**, 457.
 Ballinger S. W., Shoffner J. M. et al., *Nature Genet.*, 1992, **1**, 11.
 Barkovich A. J. et al., *Am. J. Neuroradiol.*, 1993, **14**, 1119.
 Bourgeron T., Rustin P. et al., *Nature Genetics*, 1995, **11**, 144.
 Di Mauro S., Moraes C. T., *Arch. Neurol.*, 1993, **40**, 1197.
 Goto Y., Nonaka I. et al., *Nature*, 1990, **348**, 651.
 Holt I. J., Harding A. E., Morgan-Hughes J. A., *Nature*, 1988, **331**, 717.
 Holt I. J., Harding A. E. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, **46**, 428.
 Howell N., Bindoff L. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, **49**, 939.
 Madsen C. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 7671.
 Mackey D., Howell N., *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, **51**, 1218.
 Moraes C. T., Di Mauro S. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 1293.
 Moraes C. T., Shanske S. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, **48**, 492.
 Rotig A., Cormier V. et al., *J. Clin. Invest.*, 1990, **86**, 1601.
 Schon E. A., Rizzuto R. et al., *Science*, 1989, **244**, 346.
 Shoffner J. M., Lott M. T. et al., *Cell*, 1991, **61**, 931.
 Tatchell Y., Christodoulou J. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, **50**, 852.
 Wallace D. C., Gurbarkash S. et al., *Science*, 1988, **242**, 1427.
 Van Coster R., Lombes A. et al., *J. Neurol. Sci.*, 1991, **104**, 97.
 Zeviani M., Moraes C. T. et al., *Neurology*, 1988, **38**, 1339.
 Zeviani M., Servadei S. et al., *Nature*, 1989, **339**, 309.
 Zeviani M., Antozzi C., *Brain Pathol.*, 1992, **2**, 121.
 Zeviani M., Muntoni F., *Eur. J. Hum. Genet.*, 1993, **1**, 80.

MASSIMO ZEVIANI E CARLO ANTOZZI

MITOXANTRONE: v. TUMORI**, nuovi farmaci

MODIFICATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA

1. *biological response modifiers*.

MODIFICATORI DELLA RISPOSTA IMMUNE

SOMMARIO

Generalità e terminologia (col. 3751). - Criteri applicativi (col. 3752). - Meccanismo(i) d'azione (col. 3753). - Conclusioni (col. 3755).

Generalità e terminologia.

È noto come il sistema immunitario (v. IMMUNITÀ [v.; v.*; v.**]) svolga un ruolo cruciale ed imprescindibile nei meccanismi difensivi dell'organismo. Gli straordinari progressi registrati negli ultimi anni nel settore della fisiopatologia del sistema immunitario hanno consentito di espandere notevolmente le nostre conoscenze sulle basi biologiche di quel complesso groviglio di azioni e reazioni che ne regolano il funzionamento.

Appunto in ragione della sua essenziale attività difensiva, si è cercato da molto tempo (dapprima in maniera empirica e grossolana, e via via con metodiche sempre più razionali e sofisticate) di utilizzare lo stesso sistema immunitario come un potente strumento terapeutico. In realtà la manipolazione del sistema immunitario è oggi indicata soltanto in condizioni morbose selezionate e con risultati per lo più parziali e transitori.

Un aspetto limitante, comune alla gran parte delle so-

stanze impiegate nell'immunoterapia, è la loro aspecificità. Per es., i farmaci immunosoppressivi (corticosteroidi, citostatici), utilizzati nelle connettiviti con l'intento di modulare l'eccessiva reattività immunitaria, inibiscono sia le risposte immunitarie aberranti che quelle normali. Sul versante opposto, l'immunostimolazione di una reattività deficitaria o soppressa appare ancora più difficile e complessa da realizzare rispetto all'immunosoppressione, e si basa comunque sull'impiego di molecole (citochine, ormoni timici e così via) con meccanismo d'azione aspecifico. Poiché alcuni agenti immunoterapici, a seconda delle dosi impiegate e dello stato di immunocompetenza dell'ospite, possono sortire un effetto immunostimolante o per contro immunosoppressivo, si preferisce parlare di *immunomodulazione*, che prescinde ovviamente dal risultato funzionale conseguito.

Alcuni agenti immunoterapici sono in grado di agire direttamente sulla cellula bersaglio (ad es. gli anticorpi monoclonali nelle neoplasie), ma nella gran parte dei casi i loro effetti si manifestano attraverso l'attivazione della risposta immunitaria propria dell'ospite. Per questo motivo tali sostanze sono state incluse tra i cosiddetti «modificatori della risposta biologica» (BRM: *biological response modifiers*). Il termine BRM è ormai largamente impiegato e, nella sua accezione più ampia, è diventato impropriamente sinonimo di immunomodulante. L'elenco dei BRM è in continua espansione e comprende citochine (v. INTERLEUCINE**), farmaci, sostanze sintetiche, ormoni, batteri attenuati e prodotti di derivazione batterica. Nella tab. I abbiamo riportato una classificazione, ovviamente suscettibile di aggiunte e future integrazioni, dei BRM meglio noti o più estesamente studiati.

I *National Institutes of Health* (NIH) degli Stati Uniti mantengono attivo ed operante da diversi anni un programma di studio sui BRM, nonostante che con la gran parte di essi siano stati finora ottenuti risultati modesti o deludenti. Almeno per quanto riguarda il settore neoplastico, tali risultati si spiegano non soltanto con la generale complessità del sistema immunitario che si intende manipolare, ma anche con le ingiustificate aspettative riposte in alcuni procedimenti immunoterapici quando si pensi che il ruolo del sistema immunitario nella patogenesi neoplastica appare tuttora non ben definito. È ovvio come ben maggiori siano le potenzialità terapeutiche dei BRM in altre condizioni patologiche, tra le quali, in particolare, alcune malattie infettive, alcune immunodeficienze e alcune connettiviti.

Criteri applicativi

Un aspetto poco conosciuto di molti BRM riguarda l'estrema complessità delle interazioni immunologiche da essi indotte che, in determinate condizioni ed a certi dosaggi, possono tradursi in effetti paradossi o negativi. Un esempio emblematico in questo senso è rappresentato dall'interferone- γ , che può aggravare la sclerosi multipla. Dal punto di vista quantitativo, non sempre alle dosi più elevate i BRM sortiscono i migliori risultati (*more is not always better*). Infatti, mentre per alcuni BRM l'effetto ottimale coincide con la massima dose tollerata, per altri la curva dose-risposta segue un andamento a campana (*bell-shaped*).

Nonostante il medico, come si evince dalla tab. I, abbia oggi a disposizione un ampio ed eterogeneo pannello di BRM, la loro validazione clinica, anche quando sostenuta da solide basi sperimentali ed incoraggianti risultati preclinici, è stata per lo più scandita dall'alternanza di luci ed ombre. L'eterogeneità, e talora l'imprevedibilità degli effetti si spiegano d'altronde con la «pretesa» di voler interferire e modificare la risposta immunitaria dell'ospite utilizzando gli stessi BRM in situazioni di patologia diverse l'una dall'altra.

TAB. I. MODIFICATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA (BRM)

1) Anticorpi Immunoglobuline umane per uso endovenoso Monoclonali Immunotossine Radioimmunoconiugati	6) Poliipeptidi e prodotti sintetici Tuftsin Levamisolo
2) Citochine Interferoni Interleuchine 1-16 Altre	7) Ormoni timici Timopentina Timostimolina
3) Fattori di crescita Eritropoietina G-CSF GM-CSF Trombopoietina	8) Poliribonucleotidi Poli I:C Poli A:U
4) Cellule Cellule LAK Cellule TIL Cellule staminali emopoietiche	9) Vaccini Lisati tumorali
5) Microorganismi BCG e suoi derivati <i>Corynebacterium parvum</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (estratto glicoproteico)	10) Agenti immunosoppressivi Ciclosporina FK 506 Azatioprina Ciclofosfamide Clorambucil

Poiché questa voce si propone soltanto di fornire un inquadramento generale dei problemi connessi alle possibilità di modulare la risposta immunitaria dell'ospite, non possiamo soffermarci sulle singole sostanze che si fanno rientrare fra i BRM e rinviando per ulteriori informazioni alle voci IMMUNOTERAPIA (v.; v.*); IMMUNOSOPPRESSIVI AGENTI (v.) e alle altre specifiche voci. È importante comunque sottolineare che, in particolare (ma non soltanto) nella patologia neoplastica, l'utilizzazione immunoterapica dei BRM non viene necessariamente intesa come procedimento isolato, bensì come aggiunta o integrazione ad altre modalità terapeutiche, con l'intento di conseguire effetti complementari e sinergici. Inoltre, sempre con particolare riferimento alla patologia tumorale, il ricorso a certi BRM si basa sul concetto di *biomodulazione*, vale a dire sull'esaltazione dell'attività anti-neoplastica di un agente citostatico o effettore da parte di una sostanza biomodulante, che di per sé possiede scarsa o nessuna attività anti-proliferativa.

Meccanismo(i) d'azione

L'estrema eterogeneità strutturale dei BRM e le loro potenziali applicazioni a condizioni di patologia molto disparate implicano ovviamente, anche in ragione del pleiotropismo a cui abbiamo accennato, che il meccanismo d'azione sia diverso per i singoli agenti. Inoltre, uno stesso BRM può esercitare effetti variabili ed agire con modalità differenti a seconda delle dosi impiegate e della finalità che si vuole conseguire.

Un tipico esempio è quello della terapia con immunoglobuline per uso endovenoso (IGEV; v. IMMUNOGLOBULINE*). L'indicazione più ovvia è quella immunosostitutiva, come accade nell'agammaglobulinemia tipo Bruton e nell'immunodeficienza comune variabile. Le stesse IGEV si possono tuttavia utilizzare in pazienti con porpora trombocitopenica idiopatica. In questo caso, l'incremento della conta piastrinica indotto dalla loro infusione sembra doversi attribuire ad un complesso meccanismo (tab. II), nel quale il ruolo prevalente spetta all'azione di blocco del sistema reticoloendoteliale (SRE): le IGEV saturerebbero i recettori per

TAB. II. POSSIBILI MECCANISMI D'AZIONE DELLE IMMUNOGLOBULINE PER USO ENDOVENOSO NELLA PORPORA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA

- 1) Blocco dei recettori per l'Fc presenti sulle cellule del sistema reticoloendoteliale («splenectomia chimica transitoria»)
- 2) Presenza di anticorpi anti-idiotipo nei preparati e conseguente regolazione «negativa» della sintesi di anticorpi anti-piastrine
- 3) Interferenza delle immunoglobuline infuse nelle interazioni tra piastrine e anticorpi anti-piastrine
- 4) Soppressione della sintesi di immunoglobuline policlonali e quindi degli autoanticorpi anti-piastrine
- 5) Induzione di elevati livelli di interleuchina 6

l'Fc presenti sulle cellule del SRE, impedendo che le stesse cellule catturino e distruggano precocemente le piastrine rivestite di anticorpi IgG.

Un altro esempio calzante della complessità e del pleiotropismo d'azione dei BRM riguarda il sistema interferone (IFN; v. INTERFERONE [v.; v.*]), del quale sono state ben studiate le molteplici attività biologiche: antivirale, immunomodulante, antiproliferativa su cellule in attiva replicazione, litica, inibente sull'espressione di oncogeni cellulari, differenziativa. Per quanto riguarda in particolare l'azione immunomodulante, la tab. III riassume i variabili effetti che gli IFN possono esercitare sulla risposta immunitaria, di segno positivo o negativo a seconda della loro dose e del periodo di somministrazione. Come è noto, una indicazione elettiva all'impiego dell'IFN- α riguarda le epatiti croniche attive da HCV e HBV (v. EPATITI DA VIRUS**). In queste condizioni morbose, il decremento fino alla normalizzazione delle transaminasi, la riduzione della viremia e talora il miglioramento del quadro istologico sono imputabili soprattutto all'effetto anti-virale dell'IFN- α . Se invece consideriamo un'altra peculiare indicazione di questo BRM, qual è la leucemia mieloide cronica, la normalizzazione ematologica e la frequente scomparsa del cromosoma *Philadelphia* sono state attribuite soprattutto (anche se non

TAB. III. EFFETTI DELL'INTERFERONE SUL SISTEMA IMMUNITARIO

Inibizione	Stimolazione
Linfociti T (proliferazione e produzione di alcune linfocine)	Linfociti T (attivazione di citotossicità)
Linfociti B (proliferazione, sintesi di anticorpi)	Linfociti B (sintesi di anticorpi)
Differenziazione da monociti a macrofagi	Macrofagi (citotossicità verso cellule virus-infette o tumorali, fagocitosi, diffusione)
Migrazione dei granulociti	Neutrofili (fagocitosi, citotossicità)
Espressione di alcuni antigeni	Cellule NK (attivazione)
Proliferazione di alcune cellule staminali	Cellule Killer (citotossicità anticorpo-dipendente)
Sensibilità delle cellule bersaglio all'azione citotossica delle cellule NK	Basofili (rilascio di istamina)
Ipersensibilità di tipo ritardato	Espressione di antigeni (antigeni di istocompatibilità, antigeni associati alla trasformazione)

MODIFICATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA

esclusivamente) agli effetti anti-proliferativo e differenziale dell'IFN- α sulle cellule bersaglio, ai quali si sommano effetti indiretti di ripristino o immunoregolazione del network delle citochine.

Conclusioni

Gli interessanti ed innovativi approcci della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica all'immunologia hanno consentito di mettere a disposizione del medico molecole di indubbia validità, grazie alle quali l'immunoterapia (v. TUMORI**; immunoterapia) si fonda attualmente su più solide e razionali basi scientifiche. Tuttavia, non esiste ancor oggi alcuna malattia per la quale l'impiego dei BRM sia in grado di indurre da solo effetti stabili e risolutivi. E proprio da questa constatazione scaturisce la necessità di ricercare forme sempre nuove di immunoterapia.

In fondo, la convalidazione clinica dei BRM, per lo meno delle sostanze più nuove e promettenti, deve necessariamente percorrere quello stesso difficile e tortuoso itinerario che la chemioterapia dei tumori va compiendo da oltre 20 anni, fatto di combinazioni terapeutiche, di variabili dosaggi e di studi clinici controllati.

Bibliografia

- Baseler M. W., Urba W. J., *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.*, 1991, **12**, 231.
Clark J. W., *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.*, 1991, **12**, 193.
Dammacco F. et al., *Immunoterapia: realtà e fantasia*, Relazione al 96° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna, Roma 12-15 ottobre 1995, Edizioni Luigi Pozzi, Roma, 1995.
Foon K. A., *Cancer Res.*, 1989, **49**, 1621.
Herberman R. B., *Drug Rev.*, 1987, **37**, 246.
Oldham R. K., *J. Biol. Resp. Modif.*, 1982, **1**, 81.
Oldham R. K., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1983, **70**, 789.
Rees R. C., *J. Clin. Pathol.*, 1992, **45**, 93.

FRANCO DAMMACCO

MONOAMINOSSIDASI, INIBITORI DELLE: v. ANTIDEPRESSIVI FARMACI** (coll. **437-438); **MONOAMINOSSIDASI, INIBITORI DELLE** (IX, 1862-1868).

MONOCLONALI ANTICORPI [v. vol. IX, coll. 1870-1877; Agg. I, coll. *5200-5205]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3755). - **Impiego in diagnostica di laboratorio** (col. 3756). - **Impiego in diagnostica clinica** (col. 3757). - **Sviluppi tecnologici per l'impiego di anticorpi monoclonali in terapia** (col. 3759). - **Impiego in terapia** (col. 3760). - **Anticorpi monoclonali prodotti da batteri** (col. 3765).

Introduzione

Sono trascorsi poco più di vent'anni dalla pubblicazione del lavoro di George Kohler e Cesar Milstein, che descriveva per la prima volta la tecnica di produzione degli anticorpi monoclonali [a. m.]. L'uso di questa tecnologia ha progressivamente permesso di chiarire i meccanismi di numerosi processi biologici e di approntare sofisticate tecniche diagnostiche e terapeutiche, grazie alla estrema specificità e riproducibilità di questi reagenti rispetto agli antisieri convenzionali.

L'ottenimento di anticorpi monoclonali da splenociti di topo immunizzato con uno specifico antigene e una linea cellulare di mieloma murino, è stato determinante per lo sviluppo degli a. m. Gli «ibridomi» così generati vengono portati a crescere *in vitro*, dopo diluizione a singola cellula, permettendo l'immortalizzazione del singolo clone B linfocitario con produzione dell'immunoglobulina monoclonale desiderata.

Alla prima generazione di a. m. era correntemente apportata una serie di modificazioni abbastanza semplici della molecola anticorpale nativa prodotta dagli ibridomi: la coniugazione ad enzimi e fluorocromi, la marcatura con isotopi radioattivi e l'immobilizzazione su supporti insolubili (permettendo l'identificazione e la purificazione di un antigene da una soluzione). I prodotti di seconda generazione hanno spesso subito modifiche più complesse, come la produzione di frammenti anticorpali mediante digestione enzimatica e anticorpi bispecifici (con due siti combinatori diversi).

L'applicazione della tecnologia del DNA ricombinante (v. INGEGNERIA GENETICA*) alla produzione degli a. m. ha successivamente permesso lo sviluppo di molecole di terza generazione. La possibilità di clonare e manipolare i geni codificanti gli anticorpi ha permesso di introdurre delezioni, addizioni, mutazioni, in modo selettivo all'interno delle varie regioni che caratterizzano le immunoglobuline; inoltre, è stato possibile «trapiantare» i siti combinatori di a. m. su altre proteine e sviluppare «librerie» anticorpali. Tutte queste possibilità stanno portando all'ottimizzazione, sia delle proprietà biologiche degli a. m. riguardo allo scopo per il quale vengono progettati, sia dei processi produttivi.

Una menzione a parte meritano i cosiddetti anticorpi catalitici (v. CATALITICI ANTICORPI**), cioè in grado di mimare una funzione enzimatica in processi di sintesi chimica (Schultz e Lerner, 1995). Lo sviluppo di questi reagenti è stato possibile dal momento che il sito combinatorio di un anticorpo ha circa la stessa dimensione del sito attivo di un enzima. Inoltre la forte specificità di un enzima per il substrato determina la formazione di un complesso simile al complesso antigene-anticorpo. L'azione di un enzima si manifesta quando il substrato si trova in uno stato di transizione instabile e catalizza il passaggio al prodotto finale; un a. m. catalitico viene generato mediante immunizzazione con un composto che mima lo stato di transizione del substrato e viene selezionato in relazione alla sua attività enzimatica, che può essere anche superiore a quella dell'enzima originale.

Impiego in diagnostica di laboratorio

Molte malattie hanno beneficiato, sia da un punto di vista diagnostico che di *follow-up* clinico dell'uso di a. m.

Uno degli esempi più eclatanti riguarda l'uso degli a. m. per identificare gli antigeni della serie CD (dall'inglese *Cluster Determinant*, determinante di gruppo) che hanno permesso di classificare le sottopopolazioni di leucociti in classi fenotipiche e funzionali, con la possibilità di valutare lo stato immunologico di un paziente in base alla rappresentazione delle varie sottoclassi nel sangue periferico (v. LINFOCITI*). Gli a. m. marcati con una sostanza fluorescente permettono l'identificazione e l'enumerazione delle varie sottopopolazioni leucocitarie mediante analisi al citofluorimetro (v. CITOMETRIA A FLUSSO*). Questo consente di monitorare l'evoluzione di malattie estremamente complesse come l'AIDS (v. SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA**) e le malattie autoimmuni in maniera molto precisa e precoce, consentendo l'applicazione tempestiva di terapie adeguate.

Gli antigeni CD hanno anche permesso di studiare l'emoipoiesi, definendo i marcatori dei precursori midollari delle varie sottopopolazioni (Morrison et al., 1995). Questi studi consentono oggi di purificare selettivamente dal midollo osseo e anche dal sangue periferico, i precursori di una sottopopolazione rendendo possibili anche interventi di terapia e trapianti (Dunbar, 1996).

Un altro fondamentale progresso apportato dagli a. m. alla diagnostica di laboratorio è stato lo sviluppo di più sofisticati sistemi immunoenzimatici (ELISA) e radioim-

munologici (RIA), che permettono l'identificazione e la titolazione di uno specifico antigene (di natura infettiva, tumorale o ormonale) presente nel sangue ed in liquidi biologici a concentrazioni anche bassissime (v. IMMUNODIAGNOSTICA**).

Anche l'immunistoichimica ha beneficiato dell'impiego degli a. m. nella definizione degli infiltrati cellulari e nella rivelazione di antigeni di varia natura in sezioni di tessuto.

Impiego in diagnostica clinica

Mentre l'impiego degli a. m. nella ricerca sperimentale e nella diagnostica *in vitro* si è sviluppato molto velocemente negli anni '80, l'utilizzazione di questi reagenti nella pratica clinica (*in vivo*), ovviamente, ha trovato notevoli limiti e difficoltà. Infatti, l'impiego nell'uomo di a. m. murini è estremamente difficile dal momento che il sistema immunitario umano, una volta a contatto con le immunoglobuline di topo, sviluppa una risposta anticorpale contro queste proteine eterologhe. Gli anticorpi anti-immunoglobuline di topo (definiti HAMA: *Human Anti-Mouse Antibodies*) così indotti, possono compromettere l'azione degli a. m. murini quando somministrati ripetutamente.

Un campo nel quale gli a. m. vengono già ampiamente utilizzati nell'uomo è quello dell'immunodiagnostica delle neoplasie mediante tecniche di *imaging* (Torchilin, 1995). Questa tecnica permette oggi, nel caso di tumori per i quali esista un a. m. specifico, di identificare precocemente localizzazioni neoplastiche secondarie. Il principio sul quale si basa questo strumento diagnostico è quello di veicolare un isotopo radioattivo mediante l'a. m. sul tumore, in modo tale che questo possa essere rivelato da un esame radiografico.

I primi tentativi con a. m. marcati hanno rivelato che solo una piccola frazione dell'a. m. iniettato viene fissato sul tumore, mentre l'a. m. coniugato al radioisotopo continua a circolare nel sangue e nei tessuti normali per lungo tempo, compromettendo la specificità dell'esito diagnostico (Goldenberg, 1995). Anche con l'utilizzazione di frammenti Fab (*Fragment antigen binding*: frammento che lega l'antigene) che hanno una emivita plasmatica più breve degli anticorpi integri, non si hanno risultati migliori in quanto anche in questo caso, il rapporto tumore/tessuti normali non è abbastanza alto da permettere una buona sensibilità diagnostica.

Queste osservazioni hanno aperto la strada all'idea di pre-marcare il tumore con un a. m. modificato in maniera tale da legare il radionuclide somministrato separatamente e sfruttando il momento in cui il rapporto tra anticorpo legato al tumore e quello non legato ha raggiunto il valore massimo. La strategia migliore a tutt'oggi è basata sull'utilizzazione del sistema avidina-biotina, già largamente usato in sistemi diagnostici *in vitro* per provocare la formazione di complessi macromolecolari su specifiche molecole bersaglio in modo da renderle identificabili con sistemi fisici o chimici. La biotina, infatti, può essere facilmente coniugata alla molecola anticorpale, senza modificarne la reattività, e l'anticorpo «biotinilato» può essere rivelato dall'avidina marcata con un isotopo radioattivo od un enzima.

Le avidine sono un gruppo di proteine, presenti nelle uova di anfibi, rettili, uccelli (nel gruppo va compresa la streptavidina, prodotta dallo *Streptomyces avidinii*), definite funzionalmente dalla loro capacità di legare la biotina con altissima affinità e specificità, tanto da poter considerare il legame un processo irreversibile. Nessun composto fisiologico, tranne la biotina, è riconosciuto e legato dalle avidine, che sono proteine oligomeriche piuttosto piccole, costituite da quattro identiche subunità, ciascuna in grado di legare una molecola di biotina. Quindi, ad una mole di avidina si legheranno quattro moli di biotina. Anche le avidine, essendo proteine xenogeniche, presentano il problema dell'immunogenicità per l'uomo e la casistica attualmente disponibile in campo di diagnostica tumorale rileva la presenza di anticorpi anti-avidina nel 20% dei pazienti trattati.

Per applicazioni regionali, come ad esempio nel caso del carcinoma ovarico, l'anticorpo biotinilato viene inoculato nel peritoneo e successivamente viene somministrata avidina, marcata con un isotopo radioattivo. Invece, per tumori in cui si voglia studiare un eventuale disseminazione in altri distretti, è necessaria una somministrazione per via sistemica dei traccianti. Per ridurre ulteriormente il segnale aspecifico dell'anticorpo non legato al tumore, è stato sviluppato un sistema a tre fasi (Paganelli *et al.*, 1991), che prevede l'inoculo dell'anticorpo biotinilato, seguito dalla somministrazione di avidina non radioattiva, 1-2 giorni dopo, con lo scopo di legare l'anticorpo circolante non legato al

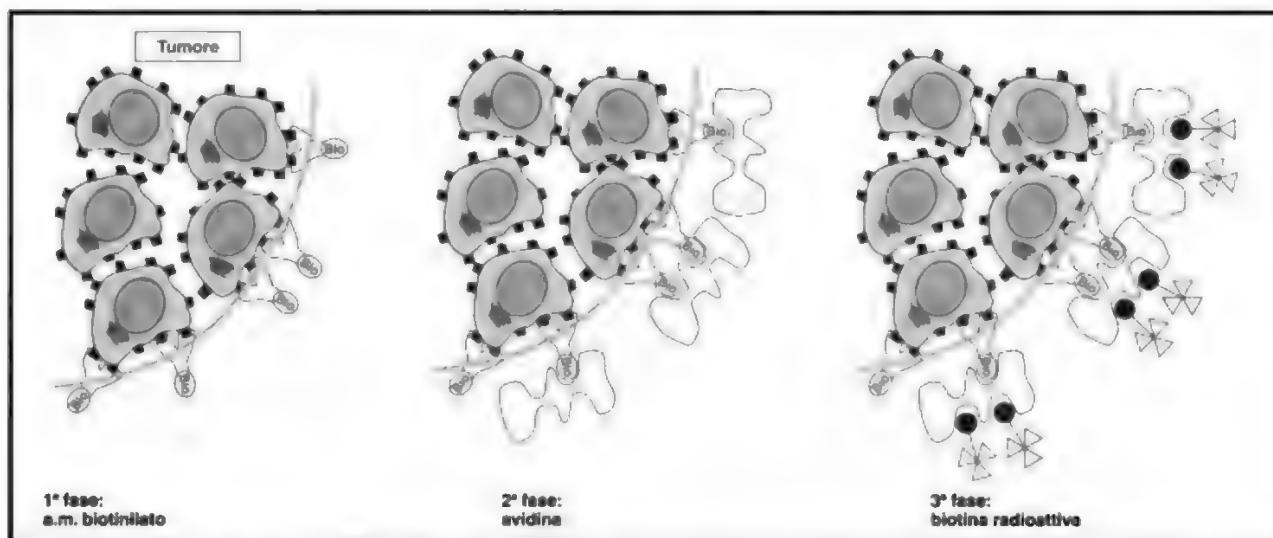


Fig. 1. Illustrazione schematica di *imaging* tumorale a tre fasi.

tumore e di accelerarne l'eliminazione. Allo stesso tempo l'avidina si legherà all'anticorpo legato al tumore, determinando «l'avidinazione» del tumore. Dopo un intervallo di tempo sufficiente a determinare l'eliminazione dell'avidina non legata e di quella legata all'anticorpo circolante (12-24 ore), viene inoculato un tracciante radioattivo biotinilato con emivita plasmatica breve, che riconoscerà specificamente il complesso anticorpo-avidina legato al tumore e permetterà l'identificazione precoce di eventuali localizzazioni secondarie della neoplasia (fig. 1). Questo protocollo è stato applicato a diverse neoplasie (tumori CEA-positivi, gliomi cerebrali, melanoma e tumori neuroendocrini) e dall'esperienza acquisita si sono potuti migliorare gli schemi di somministrazione dei reagenti con una accuratezza diagnostica superiore alle tecniche pre-esistenti.

Un'altra applicazione dell'*imaging* tumorale si ha nella chirurgia «radioimmunoguidata» (v.**), che consiste nel valutare intraoperatoriamente l'estensione della neoplasia ed eventuali metastasi linfonodali mediante una sonda portatile che rileva l'emissione di radiazioni gamma. Questa tecnica si è rivelata estremamente sensibile ed ha permesso, in alcuni casi di carcinoma del colon-retto, di identificare tessuto neoplastico occulto (Paganelli *et al.*, 1992).

Sviluppi tecnologici per l'impiego di anticorpi monoclonali in terapia

L'impiego terapeutico degli a. m. presuppone somministrazioni ripetute e quindi l'induzione degli HAMA può verificarsi con maggiore frequenza che nell'uso diagnostico, ad eccezione di alcune patologie come la leucemia acuta e la malattia di Hodgkin, in cui la condizione di immunodepressione del soggetto è tale per cui non vi è sviluppo di risposta immunitaria primaria.

Anche l'utilizzazione di Fab non risolve il problema, in quanto una parte della porzione costante dell'immunoglobulina di topo è presente e può generare HAMA. Si è quindi cercato di produrre a. m. umani, ma esistono notevoli problemi sia nell'identificazione di potenziali donatori di linfociti B specifici per un antigene che nell'immortalizzazione di queste cellule come linee cellulari stabili e capaci di crescere continuamente. Molti tentativi per ottenere a. m. anti-tumore sono stati fatti con cellule del sangue periferico, della milza, di linfonodi regionali, di asciti e di essudati pleurici di pazienti affetti da varie neoplasie, ma con scarsi risultati. I problemi principali incontrati sono stati determinati dalla relativa immunodepressione di questi pazienti, dalla scarsa immunogenicità degli antigeni tumore-associati e dall'impossibilità di fondere le cellule con un mieloma appropriato (bassa efficienza di fusione, produzione di a. m. a bassa affinità, bassi livelli di secrezione e perdita della produzione di a. m. per instabilità cromosomica sono gli inconvenienti frequentemente osservati).

Questi problemi hanno aperto la strada ai tentativi di rendere inerti per il sistema immunitario umano gli anticorpi di topo. Sono stati quindi generati anticorpi *chimerici* in cui la regione variabile di un a. m. murino è trapiantata sulla regione costante di un anticorpo umano mediante tecniche di ricombinazione genetica, di questa immunoglobulina solo il 30% degli aminoacidi è di derivazione murina e quindi potenzialmente immunogenica per l'uomo. Essendo però questo valore ancora troppo alto, sono stati generati i cosiddetti a. m. «umanizzati» in cui solamente il sito combinatorio dell'a. m. è di derivazione murina, facendo scendere la rappresentazione degli aminoacidi dell'immunoglobulina xenogenica nel «nuovo» a. m. al 3%. Tut-

tavia la sostituzione della regione di supporto (*framework region*) al sito combinatorio può comportare delle modificazioni della specificità dell'a. m. che in molti casi non è prevedibile. È necessario costruire dei modelli molecolari molto complessi, che richiedono la comparazione di diverse sequenze la cui struttura tridimensionale sia nota e l'utilizzazione di sofisticati algoritmi computerizzati: purtroppo la frequente presenza di sequenze «non canoniche» nelle regioni variabili degli anticorpi non sempre permette la previsione della struttura tridimensionale della molecola.

L'umanizzazione degli a. m. murini presenta anche altri vantaggi oltre alla non immunogenicità per l'uomo (Jolliffe, 1993): innanzitutto si può ottenere, qualora sia necessario, un effetto prolungato nel tempo dell'a. m., in quanto l'emivita media delle immunoglobuline umane è di 20 giorni, mentre quella degli anticorpi murini e chimerici è di 0,5 e 4 giorni, rispettivamente. Inoltre, si può conferire alla specificità anticorpale l'isotipo che più conviene allo scopo. Se per esempio si vogliono preservare le funzioni effettrici dell'anticorpo, si preferirà l'IgG₁, in quanto è ideale per la fissazione del complemento e l'induzione della citolisi cellulo-mediata. Un esempio delle potenzialità della manipolazione della regione costante delle immunoglobuline è quello dell'a. m. anti-lifociti T OKT3 umanizzato, il cui omologo murino è utilizzato da anni per la profilassi del rigetto nei soggetti sottoposti a trapianto d'organo. In questo caso, durante la costruzione della molecola umanizzata, è stato sostituito anche un aminoacido, lasciando inalterate le caratteristiche immunosoppressive dell'a. m. ma eliminando la reattività dell'a. m. con il recettore per l'Fc presente su molti leucociti e altri tipi di cellule, che può determinare un'attivazione indesiderata della cellula marcata con l'a. m. OKT3 (Alegre *et al.*, 1992).

Probabilmente lo sviluppo tecnologico che più influenzerà la produzione di a. m. nei prossimi anni è quello dei topi transgenici per i geni delle immunoglobuline umane, in cui è stata abolita l'espressione delle immunoglobuline di topo (Lonberg e Huszar, 1995). In pratica questi animali sviluppano una risposta immunitaria nei confronti di qualsiasi antigene, costituita da anticorpi umani prodotti da linfociti B murini. In questo caso, è possibile immortalizzare i cloni richiesti secondo il sistema classico ed ottenere ibridomi murini che producono a. m. umani.

Impiego in terapia

Fin dalla loro descrizione, gli a. m. apparvero come uno strumento ideale per lo sviluppo di terapie anti-tumorali specifiche e notevoli sforzi sono stati fatti per l'identificazione di antigeni tumore-associati e la produzione di a. m. contro di essi. Le strategie terapeutiche mediante a. m. si basano sulla selettività del reagente per la cellula tumorale e quindi sulla possibilità di veicolare mediante l'a. m., un agente terapeutico (radioisotopi, tossine, farmaci) direttamente sul bersaglio, a concentrazioni che sarebbero intollerabili a livello sistemico. Il sistema avidina-biotina, ampiamente usato nell'*imaging* tumorale, si è rivelato, in alcuni casi, estremamente efficace anche per scopi radioimmunoterapeutici (fig. 2).

Un'altra possibilità è quella di indurre una risposta citotossica *in situ* per attivazione cellulare anticorpo-dipendente o per attivazione del complemento. Quest'ultimo tipo di immunoterapia necessita di anticorpi chimerici e umanizzati per i motivi illustrati sopra oppure può essere ottenuta mediante a. m. murini bispecifici, in cui un sito combinatorio dell'anticorpo sia specifico per il tumore e

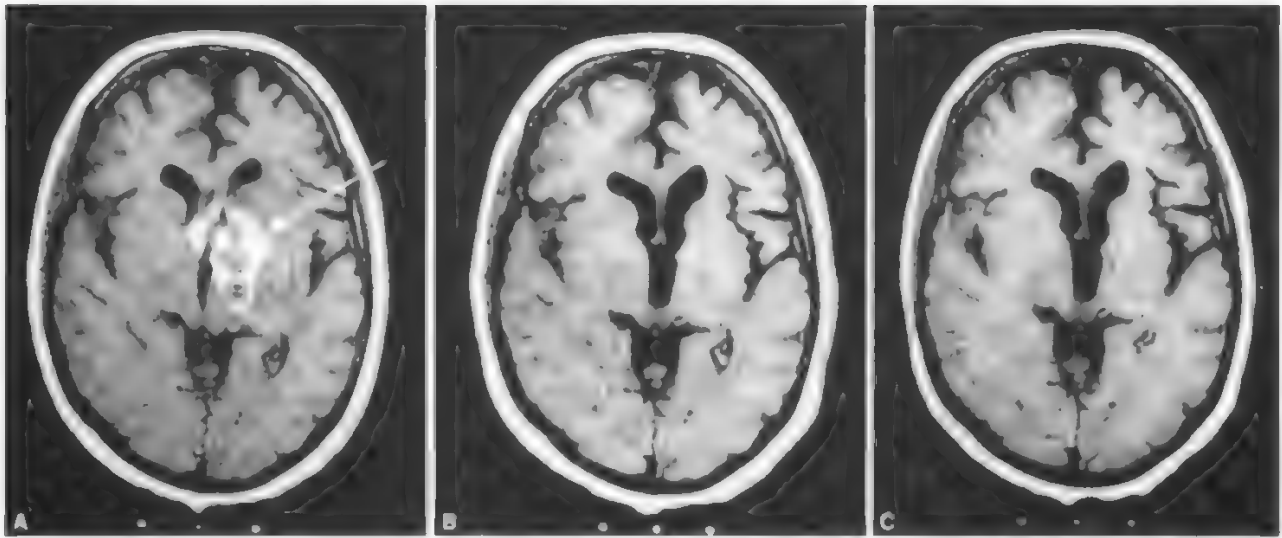


Fig. 2. Radioimmunoterapia di astrocitoma con a. m. anti-tenascina e sistema avidina-biotina a tre fasi. Esami di risonanza magnetica dell'encefalo con *imaging* anti-tenascina: la massa tumorale prima della terapia e indicata dalla freccia (A); la stessa sezione due mesi dopo la prima somministrazione (B); la stessa sezione sei mesi dopo seconda somministrazione (C). (Per gentile concessione del dr. G. Paganelli, Milano).

l'altro per una cellula effettrice del sistema immunitario (ad esempio macrofagi o cellule *natural killer*) che verrà così reclutata sul tumore.

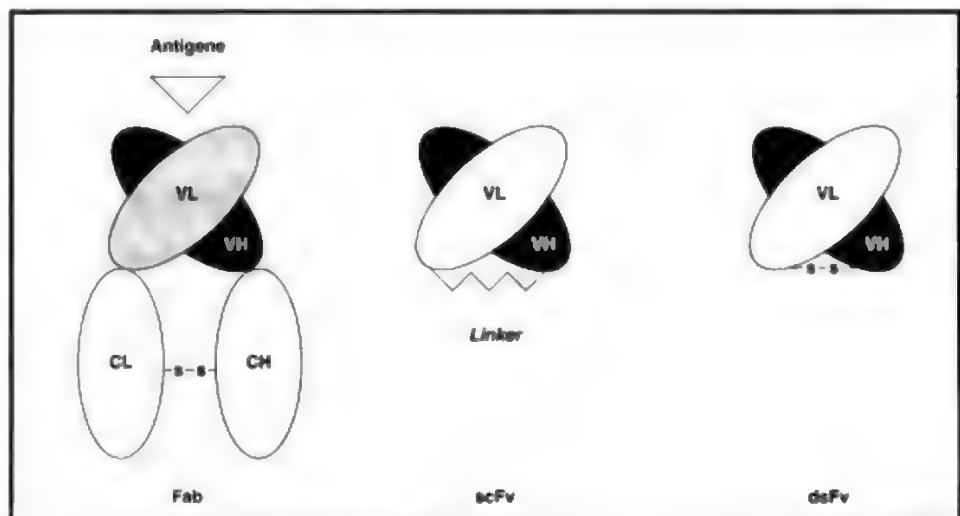
Purtroppo in molti casi esiste una serie di ostacoli da superare, ostacoli che hanno impedito lo sfruttamento ottimale di questi strumenti terapeutici (Pietersz *et al.*, 1994). Nel caso di grandi tumori, per esempio, vi è insufficiente adsorbimento di a. m. a causa dell'alta pressione interstiziale e dello scarso drenaggio linfatico che impediscono la diffusione dell'a. m.; inoltre, le aree lontane dai vasi sanguigni sfuggono all'effetto citotossico ed anche cicli multipli di immunoterapia non sono efficaci. Al contrario, leucemie e tumori micrometastatici sono completamente accessibili e quindi si è potuto ottenere più facilmente qualche risultato terapeutico. Vari approcci sono a tutt'oggi presi in considerazione per migliorare l'efficacia dell'immunoterapia con a. m.: nel caso della radioimmu-

noterapia, vengono utilizzati radionuclidi con emissioni a più lungo spettro; viene indotta ipertermia nel paziente; vengono associate citochine o sostanze vasoattive con lo scopo di indurre una reazione tissutale locale e si sviluppano a. m. in grado di indurre una risposta biologica *in situ* (v. anche: LINFOMI**, immunoterapia; TUMORI**, immunoterapia dei tumori).

Per quanto riguarda l'uso di a. m. in patologie non tumorali, l'a. m. OKT3 anti-linfociti T è utilizzato nella profilassi e cura del rigetto nei trapianti d'organo da vari anni. Nello stesso tipo di pazienti verranno sperimentati a. m. contro molecole di adesione, che reclutano cellule del sistema immunitario durante il rigetto. Lo stesso di tipo di trattamento potrà essere utilizzato su soggetti affetti da malattie autoimmuni e nello shock emorragico.

Nella sepsi da gramnegativi sono in corso sperimentazioni con a. m. anti-lipopolisaccaride (LPS) batterico, cui è

Fig. 3. Rappresentazione schematica di tre tipi di anticorpi ricombinanti (frammenti variabili) ottenuti nei batteri. V) porzione variabile, C) porzione costante; H) catena pesante, L) catena leggera. Per la spiegazione v. testo.



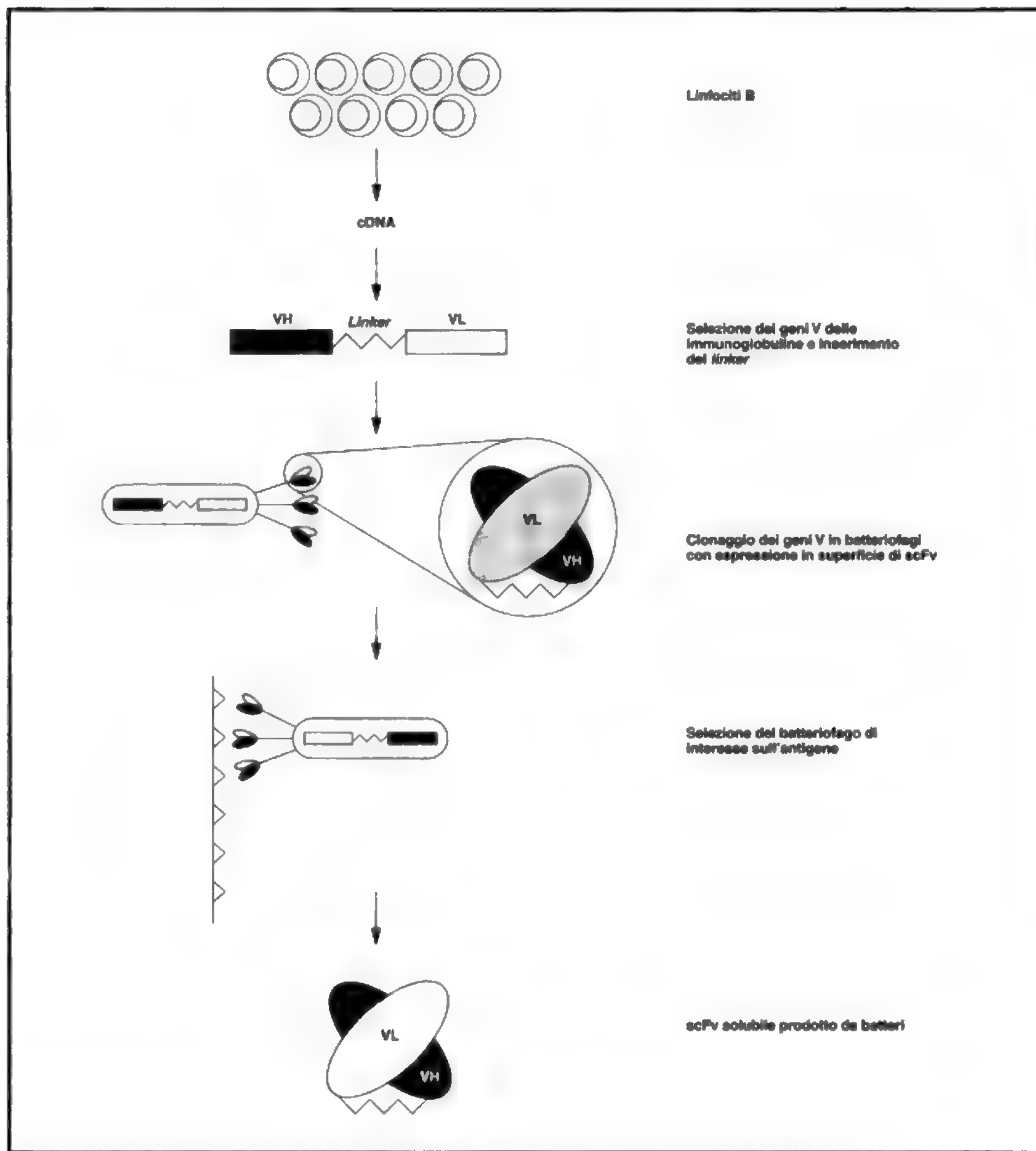


Fig. 4. Illustrazione schematica dell'ottenimento e selezione di una «libreria» di scFv in batteriofagi filamentosi.

dovuta all'over-esposizione di *Tumor Necrosis Factor* (TNF), responsabile di ipertensione, shock ed estesi danni tissutali. Per questo motivo, si studiano anche le associazioni con anticorpi anti-TNF. Nel caso di malattie virali e di parassitarie per cui non esista terapia farmacologica classica, sono in corso studi di sviluppo a. m. in grado di neutralizzare l'agente patogeno. Nel caso del virus responsabile dell'AIDS (HIV), è stato costruito un a. m. la cui porzione variabile è stata sostituita

con il recettore per il virus (CD4), in grado di indurre citolisi delle cellule infettate *in vitro* (Chamow *et al.*, 1992). Questo tipo di molecola ibrida, definito *antibody-like* o immunoadesina, è stato costruito anche con il recettore per il TNF per il trattamento della sepsi, con l'interleuchina 2 (IL-2) per stimolare i linfociti T attivati che esprimono il recettore per questa citochina, con IL-6 per la cura del sarcoma di Kaposi e con *Epidermal Growth Factor* (EGF) per

la terapia del carcinoma mammario, del colon e del polmone che esprimono il recettore per questo fattore a livelli molto alti (Chamow e Ashkenazi, 1996).

Anticorpi monoclonali prodotti da batteri

Il DNA codificante il dominio variabile di un a. m. che conferisce la specificità alla immunoglobulina, può essere clonato in un plasmide ed espresso in batteri con produzione di grandi quantità di proteina (Harrison e Keshavarz-Moore, 1996).

Tuttavia la molecola anticorpale deve la sua capacità di legare l'antigene all'assemblaggio, nel linfocita B, di due catene polipeptidiche (la catena pesante e la catena leggera). L'associazione delle porzioni variabili della catena leggera e pesante costituisce il sito combinatorio, la cui stabilità dipende totalmente dalla porzione costante delle due catene. Quindi, per riprodurre questa struttura indipendentemente dalla porzione costante dell'immunoglobulina, che ha un ruolo strutturale fondamentale, sono stati usati approcci diversi (Reiter *et al.*, 1996).

Nella fig. 3 sono illustrati i tre tipi di anticorpi ricombinanti ottenuti con successo in batteri. Nel caso del Fab, nessuna modifica della sequenza aminoacidica dell'anticorpo viene introdotta, in quanto viene mantenuta una parte della porzione costante dell'immunoglobulina. Quest'ultima garantisce il mantenimento del sito combinatorio, grazie ad un ponte disolfuro presente tra le porzioni costanti delle due catene. Tuttavia non vengono eliminati gli inconvenienti della molecola anticorpale nativa legati alla presenza di domini xenogenici.

Nel caso dei cosiddetti Fv (da *Frammento variabile*), le due porzioni variabili della catena pesante e leggera una volta sintetizzate, si associano molto labilmente ed in maniera non stabile; devono quindi essere artificialmente unite per mantenere la capacità di legare l'antigene. Questo risultato è stato ottenuto con due approcci diversi: nel caso dell'scFv (*single chain Fragment variable*: frammento variabile a singola catena), i geni per le porzioni variabili delle catene leggere e pesanti sono intervallati da uno spaziatore flessibile (*linker*) che le tiene unite e rende possibile la costituzione del sito combinatorio in una singola catena polipeptidica. Nel caso del dsFv (*disulfide-stabilized Fragment variable*: frammento variabile stabilizzato da un ponte disolfuro) viene inserita una cisteina nella sequenza di entrambe le catene, in una regione non critica per il riconoscimento dell'antigene. Queste due cisteine daranno luogo alla formazione di un ponte disolfuro che renderà stabile l'associazione delle due catene polipeptidiche ed il mantenimento del sito combinatorio della molecola originale.

La possibilità di ottenere i frammenti variabili funzionali in vettori plasmidici, con conseguente produzione del prodotto proteico da parte di colture batteriche, permette la costruzione di proteine, dette chimeriche, in cui il sito combinatorio dell'a.m. viene fuso direttamente in un vettore con il gene per una proteina con funzioni effettrici (ad es. una tossina). Con questa tecnologia sono state prodotte «immunotossine» specifiche per leucemie e carcinomi, che hanno dato risultati estremamente incoraggianti in modelli animali e presto entreranno in sperimentazione sull'uomo. Uno dei vantaggi di queste immunotossine, rispetto a quelle generate mediante coniugazione chimica della tossina all'a. m. prodotto da ibridomi, è rappresentato dal fatto che sono molecole molto più piccole e quindi possono penetrare molto più efficacemente nella massa tumorale e dare risultati terapeutici più sorprendenti.

Un altro sviluppo tecnologico degli anticorpi ricombi-

nanti è rappresentato dalle «librerie anticorpali» in batteriofagi (Burton e Barbas, 1994). L'inserzione dei geni codificanti per le immunoglobuline nel genoma di un batteriofago filamentoso rende possibile la generazione di banche di anticorpi con un repertorio vastissimo di specificità differenti. Ciascun fago della libreria esprimerà sulla propria superficie un anticorpo e conterrà il corrispondente gene. I fagi che esprimono un anticorpo con una determinata specificità possono venire selezionati dall'antigene con varie tecniche; sarà quindi possibile isolare i geni per l'anticorpo richiesto dai fagi identificati e produrre in batteri l'anticorpo in grandi quantità come proteina solubile. Queste «librerie» fagiche possono essere costruite a partire dai geni per le porzioni variabili delle catene leggere e pesanti opportunamente modificate secondo il modello scFv o dsFv (fig. 4).

Questa tecnologia è stata utilizzata per ottenere scFv specifici per antigeni tumorali, come l'antigene carcinoembrionale (CEA), costruendo una libreria fagica da cDNA di linfociti di topi immunizzati con l'antigene. Questo approccio ha permesso di arricchire enormemente la libreria in porzioni variabili con la specificità richiesta e, mediante successivi passaggi di selezione dei fagi su diluizioni crescenti di antigene, è stato possibile selezionare scFv con alta affinità per l'antigene. Esperimenti preliminari con un scFv anti-CEA hanno dimostrato un'aumentata capacità e selettività nell'identificazione di tessuto tumorale rispetto agli a. m. convenzionali disponibili (Chester *et al.*, 1994).

Bibliografia

- Alegre M. L., Collins A. M. *et al.*, *J. Immunol.*, 1992, **148**, 3461.
 Burton D. R., Barbas C. F., *Adv. Immunol.*, 1994, **57**, 191.
 Chamow S. M., Duliege A. M. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1992, **7**, 69.
 Chamow S. M., Ashkenazi A., *Trends in Biotech.*, 1996, **14**, 52.
 Chester K. A., Begent R. H. J. *et al.*, *Lancet*, 1994, **343**, 455.
 Dunbar C. E., *Ann. Rev. of Medicine*, 1996, **47**, 11.
 Goldenberg D. M. ed., *Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies*, 1995, CRC Press, New York.
 Harrison J. S., Keshavarz-Moore E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996, **782**, 143.
 Jolliffe L. K., *Int. Rev. of Immunol.*, 1993, **10**, 241.
 Lonberg N., Huszar D., *Int. Rev. of Immunol.*, 1995, **13**, 65.
 Morrison S. J., Uchida N., Weissman I. L., *Ann. Rev. of Cell & Dev. Biology*, 1995, **11**, 35.
 Paganelli G., Magnani P. *et al.*, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 5960.
 Paganelli G., Stella M. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.*, 1992, **19**, 703.
 Pietersz G. A., Rowland A. *et al.*, *Adv. Immunol.*, 1994, **56**, 301.
 Reiter Y., Brinkmann U. *et al.*, *Nature Biotech.*, 1996, **14**, 1239.
 Schultz P. G., Lerner R. A., *Science*, 1995, **269**, 1835.
 Torchilin V. P. ed., *Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents*, 1995, CRC Press, New York.

FABIO GRASSI

MONOSSIDO D'AZOTO

Sin.: ossido d'azoto; ossido nitrico; NO. - f. *monoxyde d'azote*. - i. *nitric oxide*. - t. *Stickstoffmonoxid*. - s. *oxido nítrico*.

SOMMARIO

STORIA	col. 3767
STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE	col. 3769
PROPRIETÀ CHIMICHE	col. 3769
Reazioni con specie ossigenate (col. 3769). - Interazione con le amine e i tioli (col. 3771). - Formazione di complessi con metalli di transizione (col. 3772).	
DOSAGGIO DELL'NO	col. 3773
Dosaggio mediante la reazione di Griess (col. 3773). - Dosaggio spettrofotometrico (col. 3773). - Dosaggio per chemiluminescenza (col. 3773). - Dosaggio mediante spettroscopia ESR (col. 3773). - Dosaggio mediante ossidazione elettrochimica (col. 3774). - Altri metodi (col. 3774).	

MONOSSIDO D'AZOTO

GLI NO-DONATORI

col. 3774

Introduzione (col. 3774). - **Nitrati e nitriti organici ed inorganici** (col. 3774). - **Leganti dell'NO** (col. 3776). - **S-Nitrosotioili (tionitriti)** (col. 3777). - **Sidnonimine** (col. 3777). - **NONOati** (col. 3778). - **Derivati farossanici** (col. 3779).

LA NITRITO RIDUTTASI

col. 3779

IL MONOSSIDO DI AZOTO NEI SISTEMI VIVENTI

col. 3780

Ossido di azoto sintetasi (NOS) (col. 3780): *Caratteristiche molecolari*. - *Cofattori e gruppi prostetici delle NOS*. - *Meccanismo d'azione della NOS*. - *Regolazione della NOS*. - **Proteine bersaglio dell'NO** (col. 3789). - **L'NO come mediatore fisiologico** (col. 3790). - **L'NO come agente tossico** (col. 3791). - **L'NO e il sistema immunitario** (col. 3792): *L'NO come agente antimicrobico*. - *L'NO quale regolatore dell'immunità*. - *L'NO nella risposta infiammatoria*. - **L'NO e il sistema nervoso centrale** (col. 3793): *I neuroni che producono l'NO*. - *Ruolo fisiologico dell'NO*. - *Ruolo dell'NO nella patologia neurologica*. - **L'NO nell'evoluzione** (col. 3796).

STORIA

Nel 1992, il monossido d'azoto o ossido nitrico o ossido di azoto [NO] si è imposto sulle scene per la sua importanza e versatilità come *Molecola dell'Anno*. «... Nell'atmosfera l'NO è un composto chimico dannoso, ma nell'organismo, in piccole e controllate dosi, è straordinariamente importante. L'NO partecipa al controllo della pressione arteriosa, dilatando i vasi, è il più importante mediatore nell'erezione del pene, funge da messaggero per il S.N.C. e periferico, è probabilmente un componente biochimico fondamentale nella plasticità sinaptica ed è uno degli effettori della risposta immunitaria. Il fatto che l'NO svolga così tanti ruoli non sorprende in quanto anche i secondi messaggeri classici agiscono in sistemi molto differenti, peraltro è sorprendente che sia un gas ad avere un ruolo endogeno e sorprende ancora di più pensare che tale gas sia estremamente labile e tossico...» (da *Science*, 1993, 258, 1861).

«... Piccolo, semplice e tossico, l'NO sembrerebbe un candidato ben poco probabile al ruolo di tuttofare biologico. La semplicità e la modestia dell'NO sembrano quasi esagerate quando le si confronta con la complessità chimica della gran parte delle molecole che regolano le funzioni dell'organismo...» (da *Le Scienze*, 1992, 287, 24-32).

L'NO, da non confondere con il protossido di azoto (N_2O), il gas esilarante, è un gas estremamente instabile, la cui emivita è dell'ordine dei secondi; in presenza dell'ossigeno e dell'acqua, l'NO è convertito in nitriti e nitrati. Nel sangue, i nitriti sono rapidamente convertiti in nitrati.

Fino alla metà di questo secolo si riteneva che i nitrati fossero di esclusiva origine alimentare. Nel 1981, Tannenbaum dimostrò che i nitrati potevano venire escreti dall'uomo e dai ratti anche indipendentemente dall'alimentazione. Inoltre, osservò che nel corso dei processi infiammatori l'escrezione dei nitrati era aumentata.

Marletta, già allievo di Tannenbaum, scoprì che per la produzione dei nitrati era fondamentale la presenza dei macrofagi, sottolineando il coinvolgimento del sistema immunitario in questo meccanismo. Inoltre, osservò che i macrofagi in coltura, attivati da endotossine e dall'interferone- γ (IFN- γ), acquisivano la capacità di produrre nitrato ma soltanto in presenza dell'arginina nel terreno di coltura.

Nel frattempo Hibbs Jr. dimostrò, indipendentemente, che l'arginina veniva trasformata non soltanto in nitrati ma anche in un altro aminoacido, la citrullina, e che tale reazione era catalizzata da un enzima specifico. Successiva-

mente, individuò anche il primo inibitore di questo enzima: la N^G -monometil-L-arginina.

Prima che si comprendesse la complessità delle funzioni biologiche dell'NO, esistevano linee di ricerca, apparentemente distinte tra loro, che solo recentemente sono confluite perseguendo obiettivi comuni. Due di queste linee riguardavano, da una parte, i meccanismi di vasodilatazione ad opera di neurotrasmettitori e, dall'altra, l'uso di farmaci nelle patologie cardiovascolari caratterizzate dalla costrizione delle arterie coronarie.

Era noto da tempo che i vasi sanguigni venivano dilatati da neurotrasmettitori come l'acetilcolina (v.; v.*; v.**). Nel 1980, Furchgott notò che l'acetilcolina non agiva direttamente sulle cellule muscolari, ma stimolando i recettori localizzati sulle cellule endoteliali costituenti il vaso. Questo stimolo induceva la liberazione di una molecola che, diffondendo nello strato muscolare adiacente, ne provocava il rilassamento. Ignarro e lo stesso Furchgott tentarono invano di isolare la molecola responsabile di questo effetto, che risultava «sfuggente» ed instabile. L'anno successivo dimostrarono che questo composto (che fu chiamato EDRF [*Endothelium Derived Relaxing Factor*] o fattore di rilassamento derivato dall'endotelio [v.; v.**; v. VASCOLARI VASODILATIVI FATTORI, v.*; v.**]) era in grado di stimolare la produzione di GMP ciclico (cGMP), attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi.

Contemporaneamente, Murad scoprì che la nitroglicerina e i nitroderivati, da tempo usati come potenti farmaci vasodilatatori nella terapia dell'*angina pectoris*, inducevano il loro effetto quando erano trasformati nell'NO. Inoltre questo gas era in grado di rilassare i muscoli stimolando la produzione del cGMP, proprio come l'EDRF. Famosa è la frase pronunciata da A. Nobel, l'inventore della dinamite: «Sembra quasi un'ironia della sorte che il mio medico debba prescrivermi della nitroglicerina per via orale».

Finalmente nel 1987, Moncada dimostrò che l'EDRF e l'NO erano la *medesima molecola*.

A conferma del ruolo rilevante dell'NO nel controllo della funzione cardiovascolare, il gruppo di Ignarro ottenne risultati analoghi e, successivamente, osservò che l'NO inibiva la coagulazione del sangue impedendo l'aggregazione piastrinica, e mediava il processo fisiologico dell'erezione del pene.

Gli effetti dell'NO, comunque, non si esaurirono lì. Un primo indizio che l'NO potesse avere un ruolo anche nel sistema nervoso pervenne nel 1982 quando Deguchi e Yoshioka osservarono che la produzione del cGMP nel cervello richiedeva l'arginina. Naturalmente in quel periodo non era ancora stato dimostrato che l'NO fosse un messaggero chimico e tanto meno che venisse sintetizzato a partire dall'arginina. Nel 1989, Moncada osservò la produzione dell'NO in preparazioni di tessuto cerebrale.

Contemporaneamente, Garthwaite notò che il glutammato, un aminoacido con capacità neurotrasmettitoriali eccitatorie, induceva il rilascio di un fattore «NO-simile» da parte del tessuto cerebrale, stimolando recettori del tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA).

Nel 1989, Snyder confermò che, nel tessuto cerebellare, l'NMDA provocava un aumento della concentrazione sia dell'NO che del cGMP. Per verificare se vi fosse un nesso causale tra questi due eventi, inibì la sintesi dell'NO utilizzando la N^G -metil-L-arginina, un inibitore dell'enzima responsabile della bioconversione dell'arginina nell'NO, ed osservò che anche la formazione del cGMP veniva ridotta. Successivamente anche Moncada e Garthwaite ottennero gli stessi risultati.

STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

L'ossido di azoto (NO), denominato monossido d'azoto secondo la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), è un gas incolore (p.s. = 1,059; aria = 1,00), difficilmente condensabile (p.e. = -151,8 °C) che solidifica a -163,6 °C. Allo stato solido, l'NO è sotto forma di dimerico ON-NO. L'NO è una molecola a carattere lipofilo, che diffonde facilmente nelle strutture biologiche. La solubilità in acqua, a 25,0 °C, è pari a $1,8 \times 10^{-3}$ M, alla pressione del gas di 1,00 atm.

L'NO possiede un numero dispari di elettroni ed è quindi un radicale (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]). La struttura elettronica dell'NO, in termini di teoria dei legami di valenza, è descrivibile dall'ibrido di risonanza di tre strutture che differiscono fra loro per la sola distribuzione degli elettroni (1).



La distanza interatomica dell'NO ($d = 1,15 \text{ \AA}$) è intermedia fra quella dello ione nitrosonio a struttura $\text{N}=\text{O}^+$ ($d = 0,95 \text{ \AA}$) e quella dell'anione nitrossile a struttura $\text{N}=\text{O}^-$ ($d = 1,26 \text{ \AA}$). Per questo motivo Pauling rappresentò la struttura della molecola dell'NO con un doppio legame ed un legame a tre elettroni, $:\text{N}=\ddot{\text{O}}:$. Il potenziale redox (v. OSSIDORIDUZIONE, X, coll. 2187-2198) della coppia NO^+/NO è stato misurato solo in solventi aprotici (capaci di solubilizzare i composti organici e quelli inorganici senza stabilire legami idrogeno) ed è compreso tra 1,34 e 1,48 V (elettrodo di riferimento: elettrodo a calomelano saturo, SCE). Il potenziale redox della coppia NO/NO^- a pH 7,4 è circa 0,25 V (elettrodo di riferimento: elettrodo normale ad idrogeno, NHE). Pertanto l'ossidazione dell'NO (numero di ossidazione dell'azoto, +2) a ione nitrosonio NO^+ (numero di ossidazione dell'azoto, +3), è piuttosto difficile, mentre la sua riduzione ad anione nitrossile NO^- (numero di ossidazione dell'azoto pari a +1) è relativamente più facile. Ai due alternativi stati redox di ione nitrosonio o di anione nitrossile sembrano doversi riferire gli effetti rispettivamente citotossici o citoprotettivi che l'NO esercita in particolari condizioni sperimentali.

PROPRIETÀ CHIMICHE

La chimica dell'NO è ampiamente riportata in tutti i testi classici di chimica inorganica. Nel prosieguo verranno brevemente trattati alcuni aspetti delle proprietà chimiche dell'NO di particolare rilevanza per la comprensione del ruolo fisiologico e fisiopatologico esercitato da questa specie chimica.

Reazioni con specie ossigenate

In fase gassosa l'NO reagisce con l'ossigeno per generare biossido d'azoto (2):



Secondo questa reazione, l'NO prodotto nei motori a combustione interna, in assenza di catalizzatori che lo riducano ad N_2 , viene ossidato all'aria ad NO_2 dando origine a gravi problemi di inquinamento.

In soluzione acquosa, a pH fisiologico, l'NO viene ossidato a nitriti (3):



Il tempo di emivita ($t_{1/2}$) dell'NO è inversamente proporzionale alla sua concentrazione. Sulla base delle concen-

trazioni che l'NO e l' O_2 possono assumere nel microambiente cellulare sono stati calcolati tempi di emivita compresi tra alcuni secondi ed alcune ore. La diffusione dell'NO dal sito di produzione al sistema bersaglio deve essere influenzata solo in minima parte dal processo di ossidazione.

La formazione dei nitriti può essere spiegata mediante la sequenza delle reazioni (4) (5) (6):



Il meccanismo di tale trasformazione è in realtà assai più complesso e comporta la formazione di uno o più intermedi a struttura sconosciuta, che sembrano essere responsabili delle proprietà ossidanti e nitrosanti del sistema NO/O_2 .

Un'altra reazione di notevole importanza sotto il profilo biologico è quella dell'NO con l'anione superossido O_2^- (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]) che porta a formazione di acido perossinitroso (7):



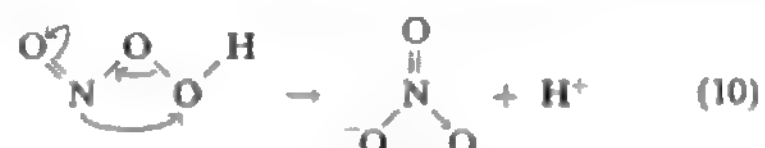
In condizioni fisiologiche, l'anione perossinitrito si forma rapidamente ($k = 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ed è presente nella forma parzialmente deprotonata ($\text{pK}_a = 6,8$). Poiché la superossido dismutasi (SOD) controlla i livelli di superossido catalizzandone la dismutazione (8) ad una velocità ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) comparabile a quella della reazione (7), questo enzima può influenzare il livello dell'NO e quindi i suoi effetti:



L'acido perossinitroso (HOONO) può ossidare una varietà di substrati biologici, quali i gruppi tiolici, il DNA e le membrane lipidiche. Sono stati proposti due meccanismi per spiegare le proprietà ossidanti di questo acido alle quali si riconducono gli effetti citotossici dell'NO. Il primo comporta la sua scissione omolitica (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA*, col. *6257) con formazione di radicali liberi dell'ossigeno (9):



Il secondo comporta la formazione di una specie attiva HOONO^* con forti proprietà ossidanti. A pH fisiologico, l'acido perossinitroso in parte trasporta a ioni nitrato (10):



Un'altra specie ossigenata capace di interagire con l'NO è l'acqua ossigenata (perossido di idrogeno). Nel corso di questa reazione si forma l'ossigeno singoletto, altamente reattivo, ritenuto uno dei responsabili della citotossicità dell'NO (11):



Ad alta temperatura, l'NO reagisce con l'ozono generando NO_2^+ in uno stato eccitato che immediatamente de-

MONOSSIDO D'AZOTO

cade allo stato fondamentale con emissione di energia radiante ($h\nu$) nella regione del rosso (12) e (13):



Questa reazione è usata nel dosaggio quantitativo per chemiluminescenza dell'NO.

Infine l'NO può reagire con diversi radicali a struttura RX^* che possono essere intermedi in vari processi metabolici (14):



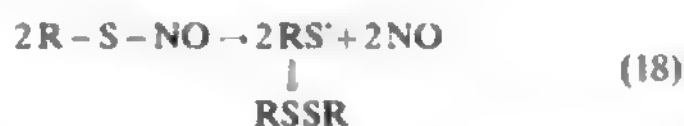
Interazione con le amine e i tioli

In passato, alcuni AA. ritenevano che l'NO fosse capace di interagire direttamente con i gruppi tiolici per generare nitrosotoli. È ormai accertato che le proprietà elettrofile dell'NO sono modestissime e che questa reazione avviene solo in presenza di O_2 (15). Tale evento è di particolare rilevanza biologica, infatti l'NO presenta una diversa reattività per il residuo $\beta 93$ nelle forme desossigenata e ossigenata dell'Hb, così da poter operare in qualità di effettore allosterico. In presenza dell' O_2 , l'NO è capace di diazotare le arilamine e di nitrosare le amine secondarie (16) (17):



L'esatto meccanismo di queste reazioni a pH fisiologico non è noto. Esso sembra coinvolgere quella o quelle specie intermedie a struttura ignota che si formano nell'ossidazione dell'NO ad N_2O_3 , piuttosto che le specie nitrosanti tradizionalmente proposte quali NO^+ , NO_2 , N_2O_3 o O_2NO^+ .

I nitrosotoli nella loro maggioranza sono composti instabili. In acqua, a pH fisiologico si decompongono a disolfuri ed NO (18):



La decomposizione avviene probabilmente con meccanismo radicalico, ed è accelerata dalla luce, dalla temperatura e dall'aumento del pH. Molti dati riportati in letteratura sulla stabilità dei nitrosotoli sono contraddittori e ciò è imputabile al fatto, recentemente evidenziato, che tracce di ioni di metalli di transizione, tra cui Cu^{2+} e Fe^{3+} , che spesso contaminano le soluzioni tampone, ne catalizzano la decomposizione.

I nitrosotoli possono comportarsi nei confronti di alcuni substrati nucleofili (RXH) come donatori di ioni nitrosonio NO^+ (19). Un classico esempio è la reazione di transnitrosazione (20). I nitrosotoli potrebbero quindi svolgere nell'organismo importanti ruoli nell'immagazzinamento e nel trasporto dell'NO, o di una sua forma redox, nonché nel suo rilascio al sito di azione.



In condizioni anaerobiche i prodotti della reazione fra i tioli e l'NO, a pH fisiologico, sono i disolfuri e l' N_2O (21):



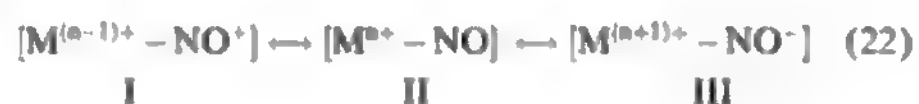
La reazione è catalizzata dalle basi ed accelerata dall'aumento del pH.

La capacità del sistema NO/O_2 di diazotare le arilamine può indurre la deaminazione di desossinucleosidi, desossinucleotidi e DNA. Questo processo può contribuire all'insorgere di neoplasie e di malattie genetiche a seguito dell'esposizione massiva ad eccessive quantità di NO endogeno (alterazioni metaboliche) o esogeno (ad es. il fumo delle sigarette).

Formazione di complessi con metalli di transizione

L'ossido di azoto può formare complessi con ioni di metalli di transizione (M^{n+}). I più comuni sono quelli in cui l'NO occupa una posizione terminale. In linea di principio, questi complessi potrebbero essere di tipo nitrosilico ($\text{M}^{n+} - \text{NO}$) o isonitrosilico ($\text{M}^{n+} - \text{ON}$).

Allo stato attuale sono noti solo complessi nitrosilici. La natura del legame M-NO è descritta dall'ibrido di risonanza (22):

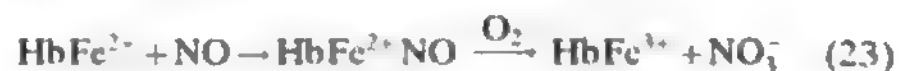


Quando l'ibrido è descritto prevalentemente dalla forma limite I, si avrà un complesso in cui il legante è l' NO^+ (ione nitrosonio), viceversa quando nell'ibrido prevale la forma III si avrà un complesso in cui il legante è l' NO^- (anione nitrossilico). Il primo tipo di composti è capace di reagire con i nucleofili e di trasferire NO^+ , il secondo tipo reagisce invece con gli elettrofili trasferendo l'NO. Generalmente il primo tipo di complessi ha una geometria lineare, mentre nel secondo tipo è piegata. Sono possibili anche complessi del tipo $(\text{M})_2\text{NO}$ e $(\text{M})_3\text{NO}$.

Analogamente ai nitrosotoli, alcuni complessi metallo-NO potrebbero svolgere nell'organismo funzioni di accumulo e di trasporto dell'NO ed essere sorgenti di sue forme redox. Tale ruolo è stato osservato nel vettore del morbo di Chagas, che sintetizza specifiche emoproteine trasportatrici dell'NO (nitroforine, v. sotto), che vengono inoculate all'atto del «morso». Il rilascio dell'NO induce la vasodilatazione. Inoltre, le nitroforine legano l'istamina, con la conseguente riduzione del dolore e del prurito nell'area della lesione.

La capacità degli ioni Fe^{2+} di complessare l'NO è alla base di una classica reazione di riconoscimento in chimica qualitativa.

I complessi formati dall'NO con l'atomo di ferro dell'eme presente nelle emoproteine e nei metallo-enzimi sono ben noti. L'NO reagisce con l'emoglobina (Hb) generando un complesso ad altissima stabilità (23):



Il composto è paramagnetico e rilevabile quindi mediante la spettroscopia di risonanza di spin elettronico (ESR) (v. QUALITATIVA E QUANTITATIVA ANALISI, XII, 2138-2141). In presenza dell' O_2 , l'Hb viene ossidata a metemoglobina (met-Hb) con formazione di nitrati. L'NO interagisce anche con il ferro dell'eme della met-Hb formando

un complesso che può facilmente trasferire ioni nitrosonio a substrati nucleofili (24):

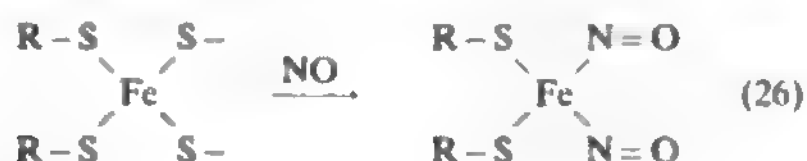


Infine l'NO reagisce con la ossiemoglobina (HbO_2) per formare nitrati e met-Hb (25). Su questa reazione è basato un dosaggio spettrofotometrico dell'NO:



L'NO reagisce inoltre con il ferro dell'eme della guanilato ciclasi citosolica inducendo l'attivazione dell'enzima. Grande interesse ha recentemente ricevuto lo studio della interazione dell'NO con l'eme del citocromo P-450.

L'NO è capace di formare complessi anche con ioni ferro non incorporati nell'eme. In particolare reagisce con i complessi Fe-S presenti nell'aconitasi, un enzima coinvolto nel ciclo degli acidi tricarbossilici, ed in altri enzimi chiave dei meccanismi respiratori (26):



Nell'interazione si ha la distruzione dei complessi Fe-S con la conseguente formazione di addotti paramagnetici Fe-dinitrosil-ditiolati e la perdita dell'attività enzimatica. Infine anche il ferro non complessato nell'eme presente in enzimi quali la ribonucleotide reduttasi può interagire con l'NO formando complessi con la conseguente inattivazione dell'enzima.

Altri ioni metallici, quali il Cu^{2+} o il Mn^{2+} presenti nelle metallo proteine, formano complessi con l'NO con la conseguente modulazione della loro attività biologica.

DOSAGGIO DELL'NO

Vi sono diverse tecniche analitiche che possono essere usate per il riconoscimento e il dosaggio dell'NO.

Dosaggio mediante la reazione di Griess

L'NO viene evidenziato e dosato indirettamente attraverso il suo prodotto di ossidazione, lo ione nitrito. Tale reazione consiste nel dosare i nitriti in ambiente acido in presenza di sulfanilamide. Il sale di diazonio risultante viene copulato con l'N-(1-naftil)etilen-diamina dicloridrato per formare un azocolorante rosso che può essere dosato spettrofotometricamente a 548 nm.

Dosaggio spettrofotometrico

La reazione dell'NO con l'HbO₂ induce rapidamente la formazione della met-Hb e dei nitrati (25). Tale processo può essere utilizzato per il dosaggio dell'NO. La trasformazione può essere seguita nella regione del visibile attraverso la diminuzione dell'assorbimento a 415 nm dovuta alla diminuzione dell'HbO₂ e mediante l'aumento dell'assorbimento a 405 nm dovuto all'incremento della met-Hb.

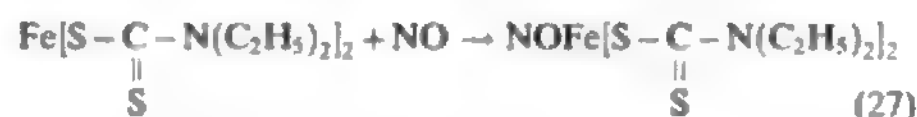
Dosaggio per chemiluminescenza

Secondo questo metodo l'NO è ossidato ad alta temperatura dall'O₃ ad NO₂ in uno stato eccitato (12). Il decadimento del biossido d'azoto dallo stato eccitato a quello fondamentale (13) è accompagnato dall'emissione della luce nella regione del rosso e del vicino infrarosso (fra 660 nm e 900 nm) la cui intensità è proporzionale alla quantità di biossido d'azoto eccitato e quindi di NO.

Dosaggio mediante spettroscopia ESR

Sebbene l'NO sia una specie radicalica esso non genera alcun segnale ESR rilevabile in soluzione a temperatura ambiente. Ciò è

dovuto all'alta velocità con cui decade dallo stato eccitato allo stato fondamentale. È però possibile rilevare e dosare l'NO mediante la spettroscopia ESR in un mezzo acquoso, sia nelle cellule che nei tessuti, «intrappolandolo» in opportuni agenti che generano composti paramagnetici. Essi includono l'Hb, complessi del Fe²⁺, nitrossidi, nitroni, nitroso derivati, nitrometano. Fra i complessi del ferro è particolarmente utilizzato il dietilditiocarbammato ferroso (27):



Dosaggio mediante ossidazione elettrochimica

Recentemente sono stati sviluppati metodi elettrochimici per il dosaggio dell'NO. Tali metodi prevedono l'ossidazione dell'NO all'anodo (28):



La corrente generata è proporzionale alla concentrazione dell'NO. Con questa tecnica è possibile rilevare concentrazioni di NO pari a circa 1×10^{-9} M, ovvero corrispondenti a circa 10^{-30} moli in un volume equivalente ad una cellula, cioè inferiori a quelle prodotte dalla cellula stessa.

Altri metodi

Un interessante metodo di dosaggio dell'NO è basato sulla sua capacità di nitrosare, in presenza di ossigeno, il 2,3-diaminonafthalene (DAN) generando il 2,3 naftotriazolo, prodotto che può essere determinato per fluorescenza.

La presenza di NO in fluidi provenienti da un organo perfuso, può essere rilevata quantitativamente in modo continuo e selettivo sfruttando la reazione chemiluminescente tra l'ossido di azoto ed il sistema luminolo (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione · H₂O₂).

GLI NO-DONATORI

Introduzione

Esiste una grande varietà di composti capaci di rilasciare l'NO, che nel loro insieme sono detti *NO-donatori*. Vi è molto interesse per queste molecole, in particolare per quelle che liberano l'NO in condizioni fisiologiche. Esse infatti potrebbero comportarsi come profarmaci dell'NO, mimandone le azioni endogene. Tra queste ultime sono da annoverare i «nitrovasodilatatori» fra cui la nitroglicerina e i composti ad essa correlati, che sono stati usati per oltre un secolo nella cura di molte patologie cardiovascolari senza che ne fosse stato compreso l'esatto meccanismo d'azione. Per gli NO-donatori si stanno aprendo nuove interessanti possibilità terapeutiche oltre che nel loro classico settore di impiego, quello cardiovascolare, anche in campo immunologico, nel trattamento dei disturbi del S.N.C., dell'apparato digerente, respiratorio e genito-urinario, nel controllo degli effetti collaterali gastrolesivi degli antinfiammatori non steroidei (v. ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI**). L'eventuale impiego terapeutico degli NO-donatori richiede che tali composti presentino una selettività di organo e tessuto e rilascino l'NO in modo controllato.

Gli NO-donatori sono rappresentati da diverse classi di composti che possiedono strutture assai eterogenee. Nel prosieguo verranno discusse le principali categorie degli NO-donatori: i nitrati e i nitriti organici e inorganici, i leganti dell'NO, le sidnonimine, i nitrosotioili, gli NONOati e i furossani.

Nitrati e nitriti organici ed inorganici

Questi composti sono da tempo usati nel trattamento delle patologie cardiovascolari a seguito delle loro proprietà vasodilatatrici. Prototipi delle due classi sono la trinitroglice-

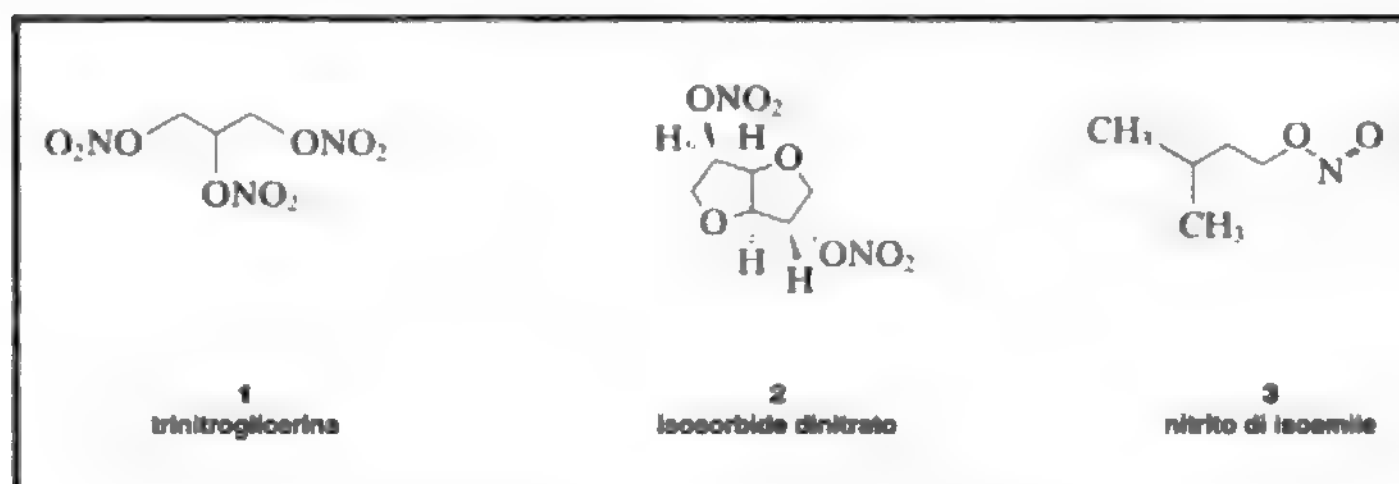
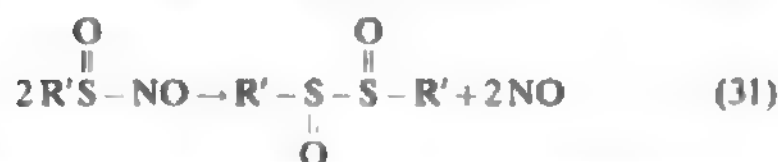


Fig. 1. Nitrati (trinitroglicerina 1 e isosorbide dinitrato 2) e nitriti (nitrito di isoamile 3) impiegati come vasodilatatori nelle patologie vascolari.

rina e l'isosorbide dinitrato, per i nitrati, ed il nitrito di isoamile, per i nitriti (fig. 1) (v. anche NITRATI; VASODILATATORI).

Due meccanismi possono essere coinvolti nel rilascio dell'NO. Il primo comporta l'interazione con tioli endogeni, il secondo con enzimi.

In accordo al primo meccanismo, l'NO verrebbe rilasciato dai nitrati a livello endoteliale sotto l'azione di tioli endogeni, quali la cisteina e composti ad essa correlati. Un possibile schema di reazione è qui riportato:



Nel caso dei nitriti di rilascio dell'NO sarebbe mediato dalla formazione di nitrosotoli (32) (33):



Il secondo meccanismo prevede il rilascio dell'NO sotto l'azione di specifici enzimi. Nel caso dei nitrati vi è ampia evidenza sperimentale che il sistema enzimatico coinvolto a livello cellulare sia il citocromo P-450 (34), ma non si può escludere che altri sistemi enzimatici, quali la glutatione transferasi, possano espletare qualche ruolo nella trasformazione:



Nel caso dei nitriti è stata evidenziata la liberazione dell'NO sotto l'azione di frazioni subcellulari di muscolatura liscia di arteria coronarica bovina. Nel rilascio sembrano essere coinvolti due enzimi uno di peso molecolare 263 kDa, localizzato nel citoplasma, l'altro di peso molecolare 44 kDa, localizzato nella frazione microsomale.

Le reazioni acido e nitriti inorganici generano NO a seguito della loro decomposizione in acido nitroso (35)



Tale processo è di rilevante interesse tossicologico, in quanto, a livello gastrico può coinvolgere i nitriti, eventual-

mente presenti negli alimenti. A pH acido, i nitriti reagiscono con i tioli per produrre nitrosotoli. Tale reazione avviene, parzialmente, anche al pH fisiologico.

Leganti dell'NO

Poiché l'NO è in grado di formare complessi con gli ioni dei metalli di transizione, tali addotti possono essere sorgenti di NO e/o delle sue forme redox. Il prototipo di questi composti è il nitroprussiato di sodio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), un cianoferrato da tempo utilizzato nel trattamento terapeutico dell'ipertensione, soprattutto nelle emergenze ipertensive (v. IPOTENSIVE SOSTANZE [VIII, 507-509; *4169]; IPERTENSIONE ARTERIOSA*, *4005-4006; VASODILATATORI). Soluzioni di nitroprussiato a pH fisiologico, non rilasciano spontaneamente l'NO, se mantenute al buio. Il rilascio dell'NO avviene soltanto in presenza della luce ovvero per opera di riducenti, quali la cisteina o l'acido ascorbico. Il nitroprussiato libera l'NO anche in presenza di frazioni subcellulari di muscolatura liscia di arteria coronarica bovina. Il rilascio dell'NO è mediato in parte da una subunità di peso molecolare di circa 4 kDa, localizzata probabilmente a livello della membrana, ed in parte da un complesso proteico di peso molecolare compreso fra 112 kDa e 169 kDa. Il rilascio dell'NO dal nitroprussiato è anche indotto dal citocromo P-450 parzialmente purificato.

Recentemente sono stati studiati quali NO-donatori due nitrosil derivati formati da complessi Fe-S (fig. 2).

I derivati 4 sono conosciuti anche col nome di «sali neri di Roussin» e fanno parte di quella interessante classe di composti, i «sali di Roussin», ottenuti per reazione dell'NO, con un polisolfuro alcalino e sali ferrosi. Sia il derivato 4 che il 5, a pH fisiologico, rilasciano NO e presentano interessanti proprietà vasodilatatrici.

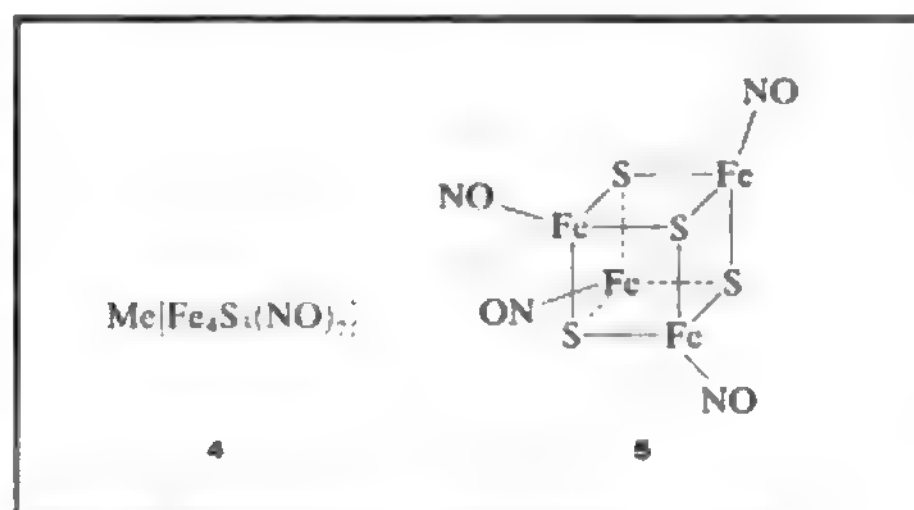
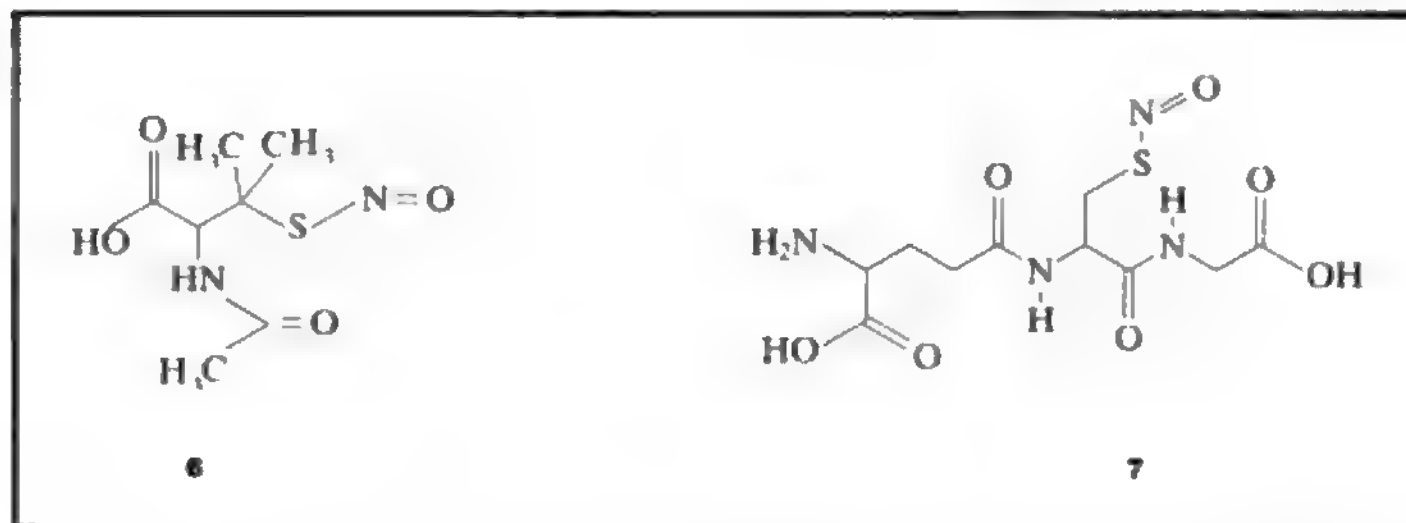


Fig. 2. Nitrosil derivati che formano complessi Fe-S.

Fig. 3. Formule di struttura della SNAP (6) e del GSNO (7).



S-Nitrosotioili (tionitriti)

Gli S-nitrosotioili sono caratterizzati dalla presenza nella molecola della funzione -SNO. Si tratta di composti colorati, in genere di grande instabilità, difficili da isolare e da purificare. Fanno eccezione i nitrosotioili alifatici, che portano adiacenti alla funzione -SNO gruppi alchilici. Essi sono dotati di notevole stabilità e scarsa solubilità in acqua. Al contrario, i nitrosotioili solubili in acqua sono composti difficilmente isolabili e purificabili. Due importanti eccezioni sono la S-nitroso-N-acetilpenicillamina (SNAP; 6) e lo S-nitrosoglutatione (GSNO; 7) (fig. 3).

I nitrosotioili in soluzione acquosa a pH fisiologico sviluppano NO (18); tale reazione è favorita dalla luce, dal calore, dall'aumento del pH e dagli ioni metallici, quali Cu^{2+} e Fe^{2+} (36-39):

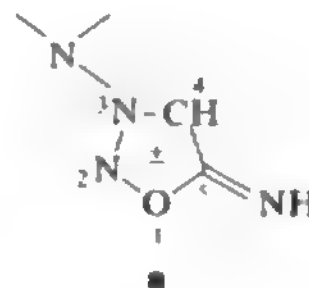


I nitrosotioili presentano proprietà vasodilatatrici ed antiaggreganti, ma al momento attuale non sono ancora utilizzati nella terapia. Sul potenziale ruolo dei nitrosotioili nell'organismo si è precedentemente detto. Secondo alcuni AA., il fattore di rilassamento di origine endoteliale (EDRF) o un suo diretto precursore potrebbero essere nitrosotioili instabili.

Sidnonimine

Composti mesoionici di formula generale 8 appartenenti alla classe delle sidnonimine sono capaci di rilascia-

re l'NO. Questi composti, anche sotto forma di sali, sono instabili, sensibili alla luce, al calore, all'umidità e all'aria.



Il meccanismo di rilascio dell'NO, studiato per il derivato SIN-1 (10), coinvolge l'azione dell' O_2 con formazione dell'anione superossido, quale intermedio. L'anione superossido che si genera può interagire con l'NO per dare l'acido perossinitroso e i relativi prodotti di degradazione. Il principale esponente della classe delle sidnonimine è la molsidomina (9) (v. MOLSIDOMINA, XI, 1860), un farmaco utilizzato come antiaggregante piastrinico nella prevenzione della trombosi.

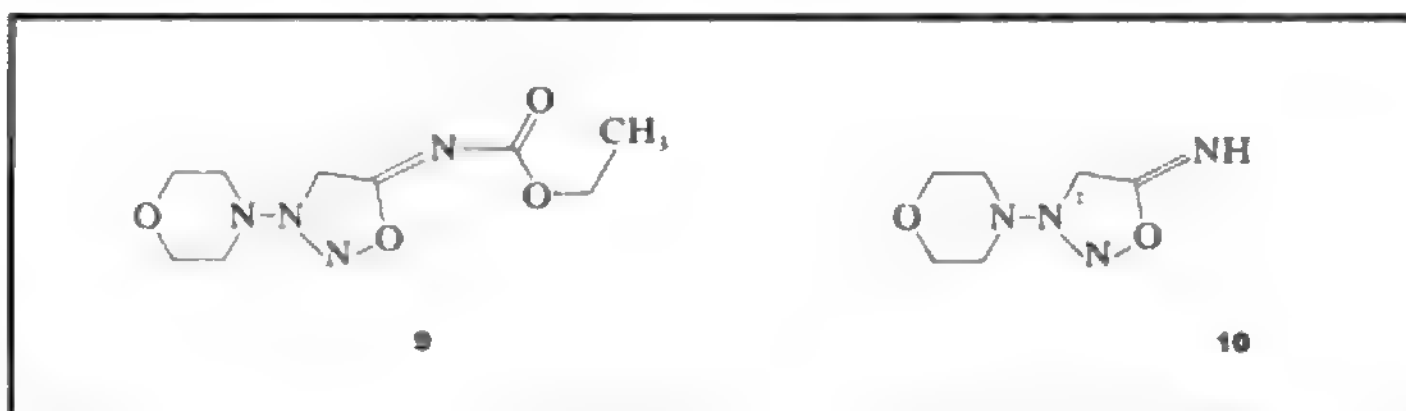
La molsidomina è un pro-farmaco stabile che viene convertito enzimaticamente nell'organismo a SIN-1 (10) (fig. 4).

NONOati

Sono complessi dell'NO con nucleofili, in particolare con le amine, anche conosciuti come «complessi di Drago» dal nome del loro scopritore (fig. 5).

Tali composti rilasciano, in soluzione acquosa, l'NO in quantità e con una velocità dipendenti dalla loro struttura e dal pH. I complessi di Drago presentano una potente azione vasodilatatrice. Molti di questi derivati sono solidi stabili, solubili in acqua e quindi potrebbero avere interessanti applicazioni farmaceutiche.

Fig. 4. Formule di struttura della molsidomina (9) e del derivato SIN-1 (10).



MONOSSIDO D'AZOTO

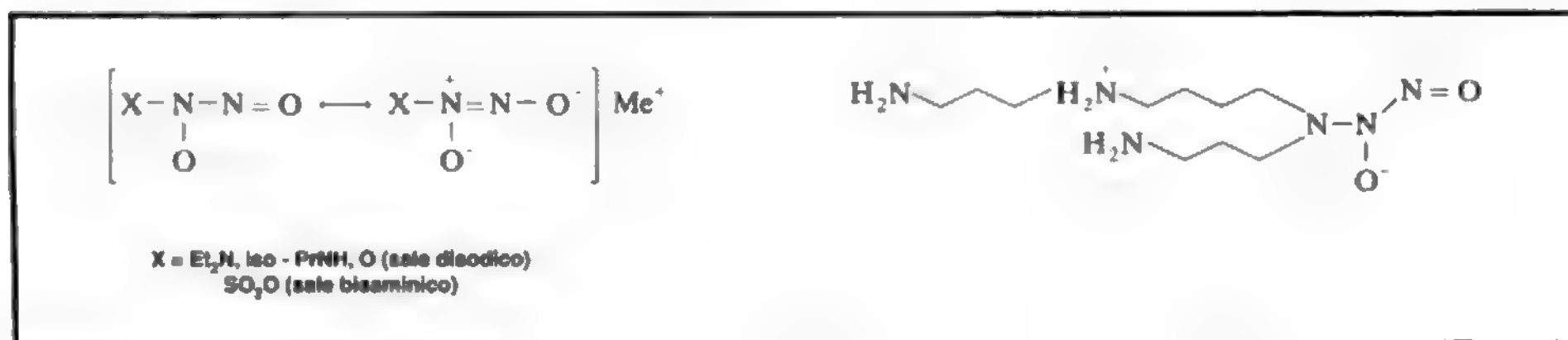


Fig. 5. Complessi dell'NO con nucleofili.

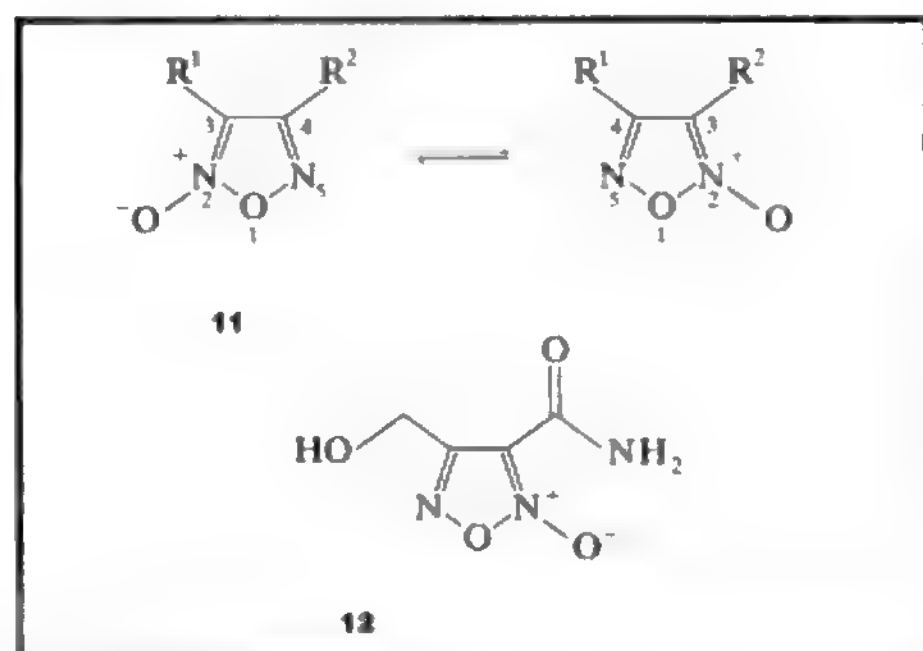


Fig. 6. Formula di struttura del furossano (11) e del composto CAS 1609 (12).

Derivati furossanici

Recentemente, è stato dimostrato che i derivati dell'1,2,5-ossadiazolo-2-ossido (furossano; 11) sono capaci di aumentare il livello di cGMP citosolico nelle piastrine umane lavate e di attivare la guanilato ciclasi citosolica isolata dal fegato e dal polmone del ratto: tale attivazione è potenziata dalla presenza dei tioli. I furossani presentano una efficace azione antiaggregante e vasodilatatrice *in vitro* e *in vivo*. Meccanismi di rilascio dell'NO dai furossani sono stati proposti sulla base dell'isolamento dei prodotti di reazione. Per alcuni derivati furossanici non è da escludere che nel rilascio dell'NO a livello dei vasi sia coinvolto il citocromo P-450. Molti derivati furossanici sono stati oggetto di brevetti ed il composto 12 (CAS 1609) è stato selezionato per ulteriori sperimentazioni (fig. 6). L'interesse per questo derivato dipende anche dal fatto che esso non sembra indurre il fenomeno della tolleranza, tipico dei nitrovasodilatatori (V. TOLLERANZA E SENSIBILIZZAZIONE FARMACOLOGICA*, col. *7053).

IL NITRITO RIDUTTASI

I batteri denitrificanti partecipano al ciclo dell'azoto grazie alla loro capacità di produrre enzimi che catalizzano le reazioni dei nitrati e dei nitriti ad azoto elementare. Fra questi enzimi hanno particolare interesse le nitrito riduttasi (NIR) che catalizzano la trasformazione del nitrito a NO sfruttando come donatore di elettroni una proteina specifica

(indicata con P), in alcune specie un citocromo c, in altre l'azzurrina:



Le NIR note possono essere classificate in due gruppi distinti: quello dei citocromi c-d, e quello delle NIR contenenti rame; i due gruppi non sono correlati dal punto di vista evolutivo. I batteri che presentano la NIR appartengono ai generi *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes* e *Achromobacter*. Ceppi diversi dello stesso genere possono produrre citocromi c-d, o NIR a rame, ma non sono noti ceppi che producano entrambi.

Tutti i batteri che producono NIR a rame sono anaerobi o aerobi facoltativi; la NIR a rame è inattivata in presenza dell'ossigeno. Nel metabolismo anaerobio di questi batteri il nitrito funge da ossidante al posto dell'O₂ ed è uno dei possibili accettori terminali degli elettroni nella catena respiratoria. Le NIR a rame sono trimeri costituiti da tre subunità uguali, ciascuna delle quali contiene un atomo di rame; inoltre ogni molecola contiene altri tre atomi di rame legati da residui aminoacidici forniti da due subunità adiacenti, pertanto ciascun trimero contiene 6 atomi di rame.

I citocromi c-d, hanno una attività enzimatica peculiare in quanto possono trasferire gli elettroni indifferentemente al nitrito o all'ossigeno e presentano quindi una attività citocromo-ossidasi oltre a quella propria delle NIR. Per comprendere appieno la complessità del meccanismo catalitico occorre considerare che la riduzione del nitrito richiede un solo elettrone mentre quella dell'O₂ ne richiede quattro. I citocromi c-d, sono proteine dimeriche: le due subunità che li compongono sono uguali e cataliticamente attive. Ciascuna di esse contiene un eme di tipo c (che costituisce il sito accettore degli elettroni e reagisce con l'azzurrina o col citocromo c) ed un eme di tipo d, che lega il nitrito e lo rilascia come NO. L'NO prodotto viene ulteriormente ridotto a N₂ e non viene liberato come tale.

IL MONOSSIDO DI AZOTO NEI SISTEMI VIVENTI

Ossido di azoto sintetasi (NOS)

La principale sorgente endogena dell'NO è rappresentata dall'arginina. La via metabolica più conosciuta relativa a tale aminoacido è il ciclo dell'urea (v.), che avviene all'interno delle cellule epatiche, nell'uomo e negli animali ureotelici. Tali reazioni permettono di trasformare l'ammoniaca, derivante dalla deaminazione degli aminoacidi, nell'urea, un composto solubile in acqua, privo di tossicità, escreto con le urine.

In altri distretti dell'organismo alcune reazioni del ciclo dell'urea non hanno luogo, anche se sono presenti tutti i metaboliti intermedi. Nel cervello, ad esempio, mancano

due enzimi importanti per la realizzazione completa del ciclo dell'urea: l'*ornitina transcarbamilasi* (che catalizza la formazione della citrullina a partire dall'ornitina e dal carbamil-fosfato) e la *carbamilfosfato sintetasi I* (che catalizza la produzione del carbamil-fosfato nella matrice mitocondriale a partire dall'ammoniaca e dall'anidride carbonica).

Al contrario in presenza dell'enzima *ossido d'azoto sintetasi* (NOS), uno dei due equivalenti gruppi aminici ($-NH_2$) del gruppo guanidinico dell'arginina viene trasformato nell'NO, generando, quale co-prodotto, la citrullina.

Caratteristiche molecolari

Fino ad oggi sono state identificate almeno due distinte famiglie di NOS: una costitutiva e un'altra inducibile. La NOS costitutiva (cNOS) è regolata dal calcio e dalla calmodulina e produce concentrazioni dell'NO dell'ordine delle picomoli per brevi periodi in risposta a stimoli fisiologici. Sono note due isoforme della cNOS, quella neurale (tipo I) e quella endoteliale (tipo III). La forma inducibile (iNOS o tipo II), identificata originariamente nei macrofagi, è attivata da endotossine e citochine, non è dipendente dal calcio e determina il rilascio di concentrazioni nanomolari dell'NO per lunghi periodi.

Sono stati clonati i cDNA di alcune isoforme della NOS. L'isoforma costitutiva è stata sequenziata da cellule endoteliali umane e bovine, da cellule umane del muscolo scheletrico, dal cervello di ratto e di topo. Quella inducibile, invece, è stata clonata dai macrofagi di ratto e di topo, dalle cellule del muscolo liscio del ratto e dagli epatociti umani e del ratto.

La purificazione dell'isoforma costitutiva della NOS dal cervello (bNOS) bovino e di ratto e dell'isoforma inducibile dai macrofagi (macNOS) murini, ha evidenziato che entrambe le isoforme sono citosoliche ed hanno rispettivamente un peso molecolare di 160 kDa e 125 kDa. L'isoforma costitutiva isolata dalle cellule endoteliali (eNOS) dell'aorta bovina è, invece, legata alla membrana ed ha un peso molecolare di circa 130 kDa. Tutte le isoforme della NOS sono presenti in forma dimerica. Inoltre, sembra che i macrofagi, le cellule dell'endotelio vascolare e del muscolo liscio esprimano attività NOS inducibile nella frazione non

solubile. Infine, è stato osservato che, nel cervelletto di ratto, una isoforma non solubile della NOS costitutiva, isolata e solubilizzata con detergente, è praticamente identica alla isoforma solubile.

La sequenza aminoacidica della cNOS cerebrale, dedotta dal cDNA, mostra una significativa omologia con la regione C-terminale della NADPH-citocromo P-450 riduttasi (fig. 7). Le sequenze aminoacidiche della citocromo P-450 riduttasi e delle differenti isoforme della NOS sono altamente conservate in particolare nei siti di legame del flavina-adenina dinucleotide (FAD), del flavina-mononucleotide (FMN) e del nicotinamide-adenina-dinucleotide fosfato (NADPH). Le regioni N-terminali delle differenti isoforme della NOS mostrano un elevato grado di omologia, suggerendo un comune ruolo funzionale, relativamente al sito di legame con l'arginina e al sito catalitico.

Un'ulteriore analisi delle sequenze nucleotidiche della cNOS cerebrale e della macNOS del ratto suggerisce che siano probabilmente prodotti di geni differenti, presentando una omologia del 67%. L'analisi comparativa fra la NOS inducibile ottenuta dagli epatociti (hepNOS) umani e di ratto evidenzia una omologia dell'82%, suggerendo la probabile provenienza dallo stesso gene. Inoltre, è stato dimostrato che le isoforme costitutive, endoteliale e cerebrale della NOS sono codificate da geni diversi e sono immunologicamente differenti, mentre gli epatociti e i macrofagi del ratto esprimono una identica iNOS. La NOS endoteliale non solubile contiene una sequenza consenso per la miristilazione (M), in posizione N-terminale. Tale sito è assente nelle isoforme neuronale e macrofagica. La miristilazione potrebbe avere un ruolo nell'ancoraggio della eNOS alla membrana. Inoltre, è stato osservato che una mutazione del sito di miristilazione converte la cNOS da proteina di membrana a proteina citosolica. La cNOS, la bNOS e la macNOS contengono una sequenza consenso per la fosforilazione (P) ed un'altra per il riconoscimento della calmodulina (CAL). A differenza delle cNOS, la iNOS non sembra richiedere il calcio per espletare la propria funzione; peraltro, la calmodulina (v. 4) sembra essere una subunità strutturale della iNOS (fig. 7).

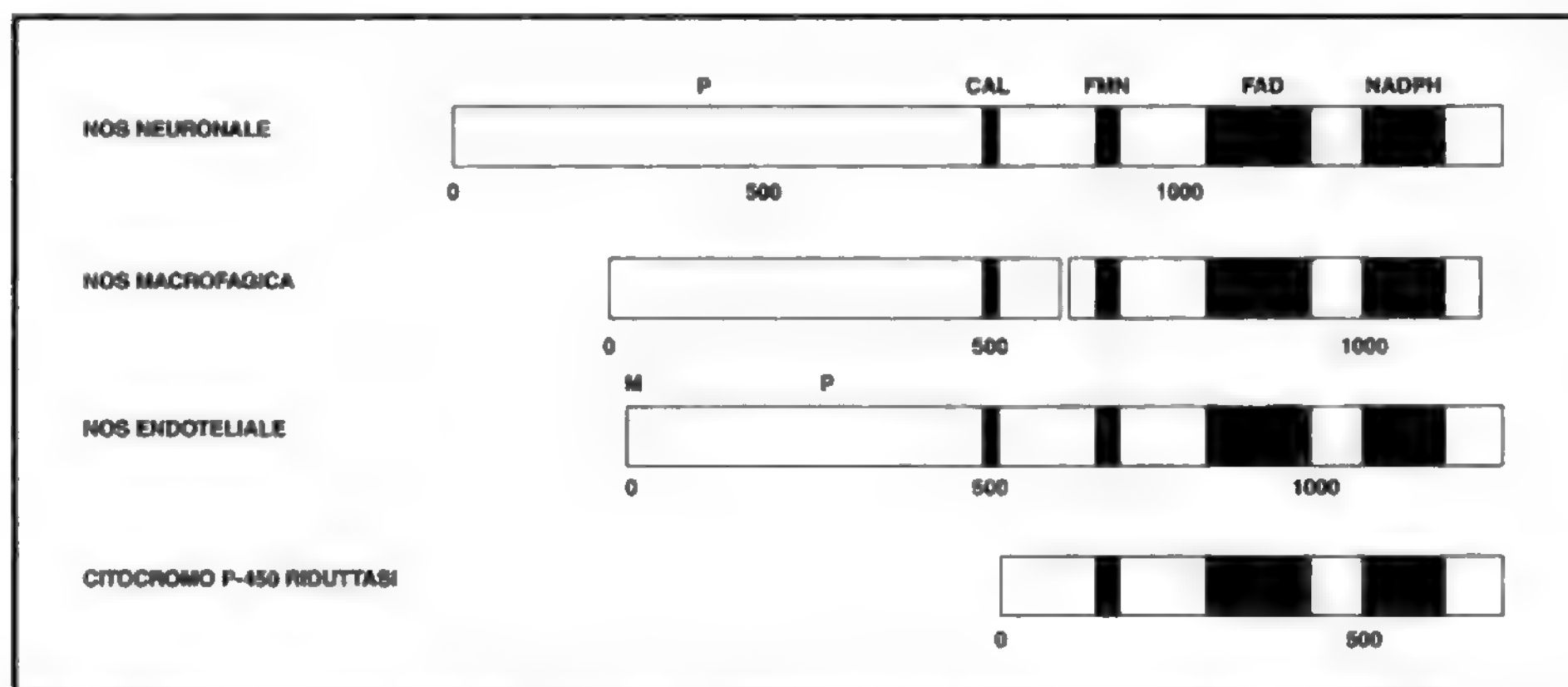


Fig. 7. Analisi comparativa delle sequenze aminoacidiche delle diverse isoforme della NOS e della citocromo P-450 riduttasi. M = sito di consenso per la miristilazione; P = sito di consenso per la fosforilazione; CAL = calmodulina.

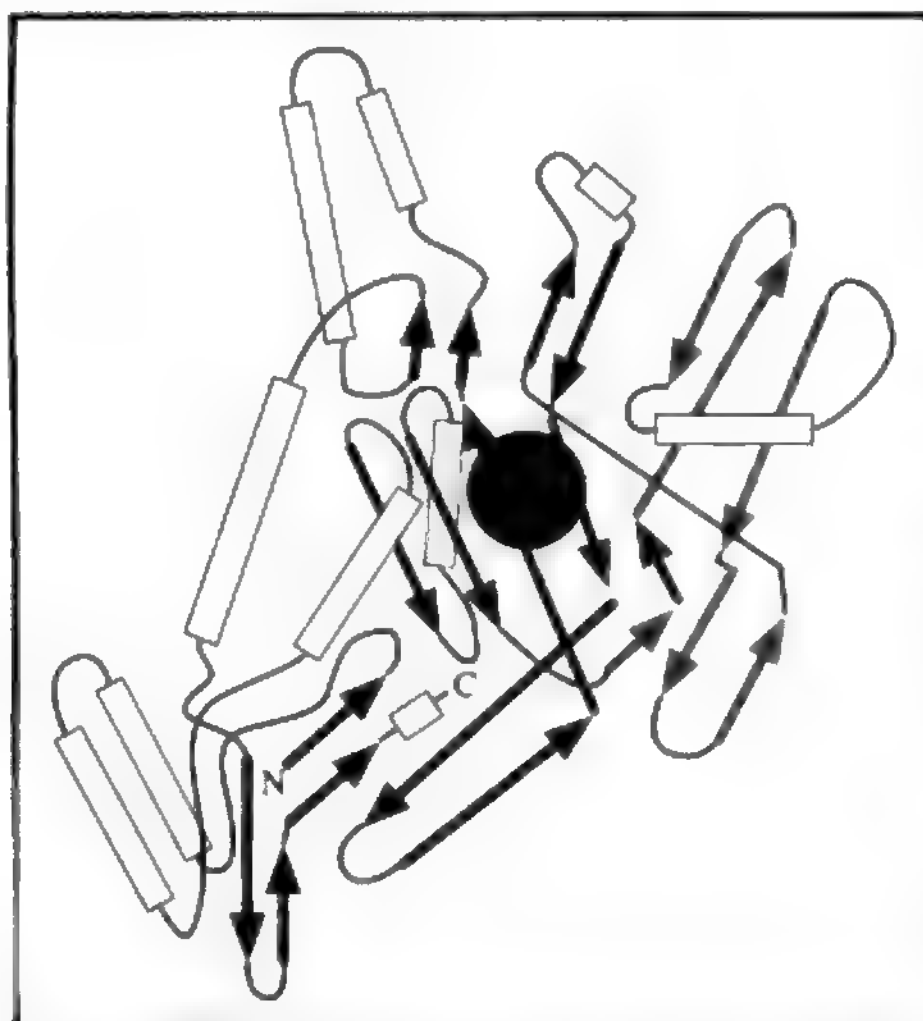


Fig. 8. Struttura tridimensionale del dominio catalitico della iNOS. Al centro è indicato l'eme. I cilindri indicano i domini di tipo α e le frecce quelli di tipo β. (Modificata da Crane et al., 1997).

Il dominio catalitico della iNOS presenta una forma che ricorda «un guanto da baseball», con l'eme «afferrato nel palmo» (fig. 8). La iNOS è stata cristallizzata in presenza

dell'aminoguanidina che ricorda, seppur lontanamente, l'arginina, il substrato naturale dell'enzima. Entrambi gli atomi di azoto del gruppo guanidinico dell'aminoguanidina sono ad una distanza ottimale per formare legami idrogeno con il triptofano in posizione 366, sito alla base del centro di reazione della iNOS. Pertanto, uno dei due atomi di azoto del gruppo guanidinico dell'aminoguanidina è rivolto verso l'ossigeno attivato legato all'atomo di ferro dell'eme, coinvolto nella conversione dell'arginina in idrossiarginina. Questo modello strutturale è in accordo con le attuali conoscenze delle proprietà catalitiche della NOS.

Cofattori e gruppi prostetici della NOS

1. *Il Ca^{2+} e la calmodulina.* – La prima NOS purificata è stata la isoforma costitutiva isolata dal cervelletto di ratto. La perdita dell'attività osservata durante la purificazione ha portato alla scoperta che la calmodulina è indispensabile per la funzione di questa isoforma. Successivamente, è stato dimostrato che tutte le isoforme costitutive della NOS necessitano di Ca^{2+} e di calmodulina. I livelli di Ca^{2+} intracellulare, inoltre, possono regolare l'attività delle cNOS nelle cellule che presentano questa isoforma. Tuttavia, una sequenza consenso specifica per la calmodulina è stata evidenziata anche nella iNOS, ma non si osserva una apparente dipendenza della attività enzimatica dalla concentrazione di tali cofattori in quanto l'enzima avrebbe un'altissima affinità per il complesso Ca^{2+} -calmodulina (v. CALMODULINA*).

2. *Il NADPH, il FADH_2 ed il FMNH_2 .* – Tutte le isoforme della NOS richiedono per la propria attività il NADPH. Il rapporto fra il NADPH consumato e l'NO sintetizzato, a partire dall'arginina e dall'*N*-idrossi-arginina (NHA), è rispettivamente pari a 1,5:1 e a 0,5:1. Analogamente alla citocromo P-450 riduttasi, tutte le isoforme della NOS contengono 1 equivalente di (FADH_2) e 1 equivalente di (FMNH_2), per subunità.

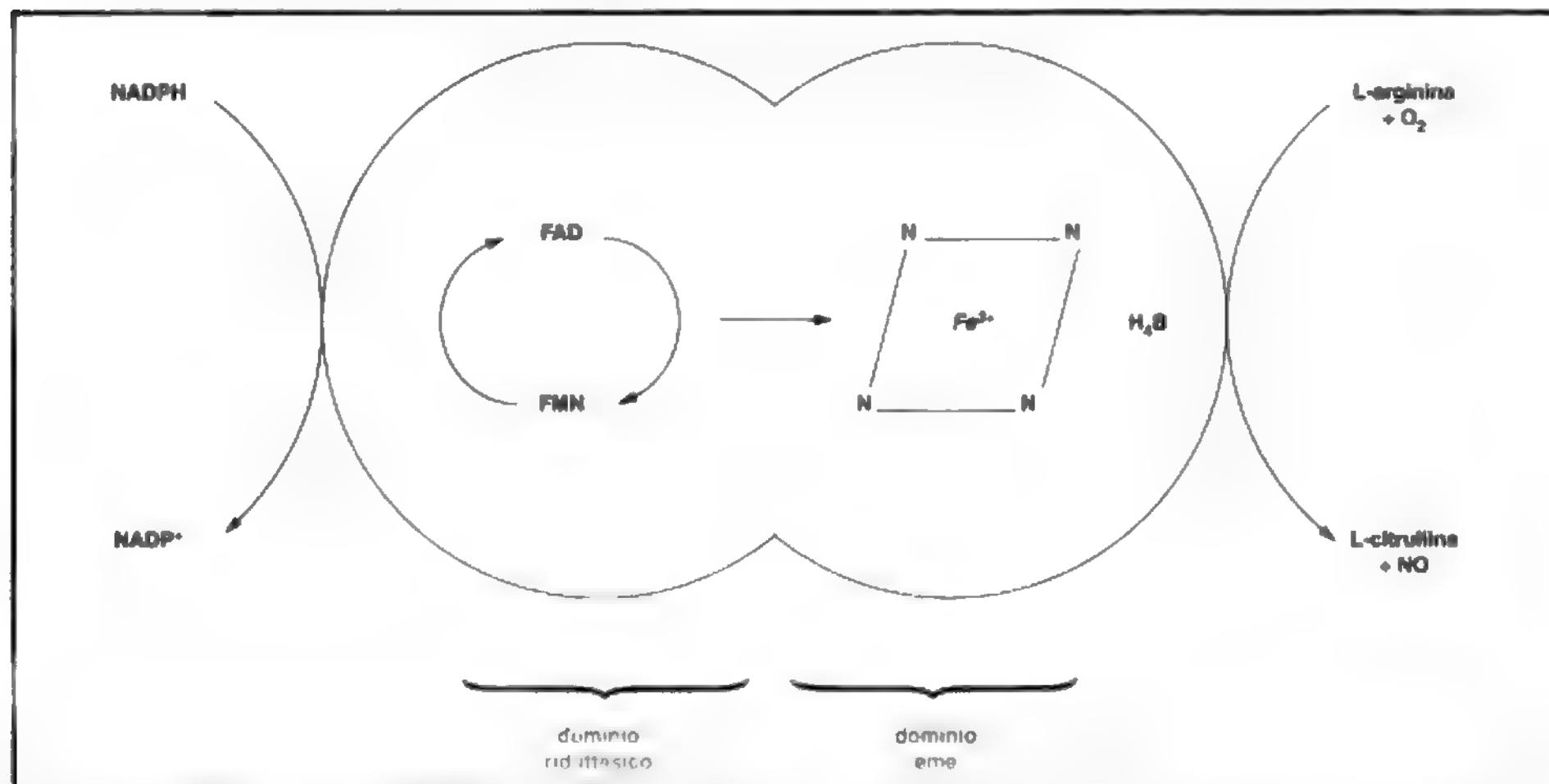


Fig. 9. Rappresentazione schematica della NOS. Interazione dei cofattori con il dominio riduttasico ed il dominio eme. (FAD = flavina-adenina-dinucleotide, FMN = flavina-mononucleotide, NADPH = nicotinamide adenosina dinucleotide fosfato ridotto; H_4B = tetraidropterina. (Modificata da Marletta, 1993).

4. *Tetraidro-L-biopterina*. – La tetraidrobiopterina (H_4B) partecipa come cofattore nelle reazioni catalizzate da tutte le isoforme conosciute della NOS. La pterina sembra essere coinvolta nell'idrossilazione dell'arginina e nella stabilizzazione dell'enzima. Inoltre, sembra svolgere il ruolo di effettore allosterico. Malgrado la dissociazione della pterina durante la purificazione della NOS, alcuni esperimenti effettuati con H_4B esogena hanno dimostrato che il rapporto fra la pterina e la NOS è di 1:1 per subunità dell'enzima.

Meccanismo d'azione della NOS

N-idrossilazione dell'arginina. – Il primo stadio della reazione di ossidazione dell'arginina è un processo di idrossilazione che coinvolge uno dei due atomi di azoto del gruppo guanidinico dell'arginina. Tale reazione notoriamente catalizzata da emoproteine, quali la citocromo P-450 riduttasi, utilizza 1 equivalente di NADPH ed 1 equivalente di O_2 , determinando la formazione dell' N^G -idrossiarginina (NHA) (fig. 10).

Trasformazione dell'NHA in citrullina ed NO. – La conversione dell'NHA nei prodotti finali richiede un ulteriore equivalente di NADPH (fig. 10), secondo un meccanismo analogo a quello proposto per l'enzima P-450 aromatasi. Le reazioni catalizzate dalle NOS e dall'aromatasi avvengono in tre fasi successive, tutte coinvolgenti lo stesso sito attivo. Le prime due fasi sono tipiche reazioni di idrossilazione, ciascuna utilizza 1 equivalente di O_2 e 1 di NADPH. Il terzo stadio sembra coinvolgere un addotto $Fe^{3+} - O_2$ che si lega al gruppo guanidinico dell'NHA, formando un composto intermedio. Successivamente, tale composto si decompone, generando la citrullina e l'NO. Recentemente è stata suggerita la partecipazione in questa reazione della superossido dismutasi (SOD; fig. 10).

Regolazione della NOS

L'attuale classificazione delle isoforme della NOS si basa fondamentalmente sul fatto che l'enzima attivato dal complesso Ca^{2+} -calmodulina (cNOS) venga espresso costitutivamente e non venga indotto a livello trascrizionale, mentre l'enzima Ca^{2+} -indipendente (iNOS) è indotto, a livello

trascrizionale, da endotossine e citochine. Peraltro, sono note isoforme della cNOS, presenti nell'intestino di ratto e nei condrociti di coniglio, che possono essere indotte, rispettivamente, dalle endotossine e dall'interleuchina-1 (IL-1).

La regolazione della NOS può avvenire sia a livello della trascrizione che dell'attività enzimatica. Il complesso Ca^{2+} -calmodulina, la H_4B , le flavine modulano l'attività enzimatica in quanto cofattori. La NOS cerebrale può essere fosforilata da protein-chinasi cAMP-dipendente (PKA), protein-chinasi C, protein-chinasi calcio-calmodulina-dipendente e protein-chinasi cGMP-dipendente. Inoltre, la NOS endoteliale può essere modulata dalla fosforilazione della tirosina.

La iNOS è regolata dalle citochine (tab. I), alcune inducenti altre inibenti l'enzima. Il ruolo svolto dai lipopolisaccaridi (LPS) e/o da alcune citochine nell'indurre la espressione della iNOS è comune a tutte le cellule. Un'altra caratteristica comune è la sinergia osservata fra gli agenti induttori. Per i macrofagi umani e murini, così come per le cellule astrocitarie umane e murine, la sinergia tra i LPS e l'IFN γ avviene a livello trascrizionale. È stata descritta, inoltre, la sinergia fra l'IL-1, il fattore di necrosi tumorale (TNF), l'IFN γ e i LPS in colture di epatociti. In alcune cellule, singoli agenti sono relativamente efficaci, come ad esempio i LPS in macrofagi murini e l'IL-1 nelle cellule del muscolo liscio vascolare di ratto. Altre citochine quali l'interleuchina-4 (IL-4), l'interleuchina-8 (IL-8) e l'interleuchina-10 (IL-10), e fattori di crescita, quali il fattore di crescita basico per i fibroblasti (bFGF) e il fattore trasformante (TGF β -1, 2, 3) possono ridurre o inibire l'induzione della iNOS da parte delle citochine. Recentemente, è stato dimostrato che i LPS e l'IFN γ possono inibire l'attività enzimatica della NOS neuronale presente negli astrociti.

La NOS può essere inibita da diversi agenti in grado di competere con i cofattori ed il substrato (tab. II). Fra gli analoghi dell'arginina, merita ricordare la N^G -monometil-L-arginina e la N^G -nitro-L-arginina. I glicocorticoidi inibiscono l'induzione trascrizionale della NOS calcio-indipendente, ma non l'attività enzimatica. La nicotinamide e il

TAB. I. REGOLAZIONE DELLA NOS. FATTORI IN GRADO DI INDURRE O DI INIBIRE L'ESPRESSIONE DELL'ENZIMA E DI STIMOLARNE L'ATTIVITÀ

Induttori dell'espressione dell'iNOS	Soppressori dell'espressione dell'iNOS	Attivatori della cNOS
Interferone γ (IFN γ) Fattore di Necrosi Tumorale (TNF α) Interleuchina 1 β (IL-1 β) Lipopolisaccaride (LPS) IFN γ + IL-2 IFN γ + TNF α TGF β 1 + (IFN γ + LPS) Fattore di Attivazione Piastrinica (PAF) Esteri del forbolo LPS, IFN γ , IL-1 β , TNF α LPS + TNF α	Fattore di Crescita Trasformante β 1 (TGF β 1) IL-4 IL-10 IL-8 Glicocorticoidi Mineralcorticoidi Ormoni sessuali Prostanoidi Derivati cumarinici Ciclosporina Clorpromazina Nicotinamide Desametasone Fattore di Crescita per Fibroblasti a 125 (bFGF) Fattore di Crescita per Fibroblasti a 125 (bFGF) Fattore di Crescita Piastrinico (PDGF)AB FGF β 1 α LPS NO	NMDA Ionofori del calcio Noradrenalina Quisqualato Glutammato Calcio-calmodulina Agonisti muscarinici Bradichinina Ouabaina PAF Peptide Intestinale Vasoattivo (VIP) Clorpromazina Fosfolipidi

TAB. II. INIBITORI DELLA NOS

Substrati inibiti	Inibitori
Flavine	Difenilenciodonio Di-2-tienilodonio Iodoniodifenile
Tioli	Ebselen
Calmodulina	Calmidazolo Fendilina W7 Trifluperazina
Ca ²⁺	EGTA EDTA
Eme	Monossido di carbonio Cianuro Miconazolo NO Imidazolo e fenilimidazoli correlati
H ₂ B	2,4-diamino-6-idrossipirimidina
Arginina	3-amino-1,2,4-triazolo 3-amino-1,2,4-triazina Aminoguanidina Fenciclidina N ^G -metil-L-arginina N ^G -nitro-L-arginina N ^G -iminoetil-L-oronitina N ^G -nitro-L-arginina metil estere

W7 = N-(6-aminoesil)-5-cloro-1-naftalene sulfonamide cloridrato.

desametasone inibiscono l'attività enzimatica indotta dalle citochine, senza influire sull'aumentata attività trascrizionale.

Infine, la NOS può essere regolata dallo stesso NO. La regolazione della iNOS avviene sia a livello trascrizionale che direttamente sull'attività enzimatica, mentre quella della cNOS coinvolge soltanto l'attività dell'enzima (tab. I).

Proteine bersaglio dell'NO

L'NO ha la capacità di modulare l'attività di alcune proteine e di alcuni enzimi. Tale capacità si esplica attraverso reazioni reversibili con gruppi funzionali caratterizzati da uno ione ferro o dai tioli (tab. III).

L'attivazione della guanilato ciclasi, attraverso il legame dell'NO al ferro dell'eme, rappresenta un esempio classico. Molte risposte delle cellule all'NO, inclusa la vasodilatazione e l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, sono il risultato dell'aumento del cGMP in seguito all'attivazione

della guanilato ciclasi. La sorgente di NO in questo meccanismo è rappresentata da composti trasportatori di NO⁺, del tipo RS-NO e Fe-NO.

Le reazioni di nitrosazione dei tioli da parte dell'NO sono di particolare interesse in quanto determinano un incremento dell'emivita dell'NO preservandone le proprietà caratteristiche.

La nitrosazione dei tioli liberi può modulare l'attività di alcune macromolecole biologiche, quali l'emoglobina e gli attivatori del plasminogeno. La S-nitrosazione delle proteine è una reazione che avviene in condizioni fisiologiche, e permette di stabilizzare l'NO in forme bioattive con ampie implicazioni biochimiche e regolatorie. Alcuni autori suggeriscono che la nitrosazione intracellulare delle proteine possa essere considerata come un meccanismo di trasduzione del segnale analogo alla fosforilazione.

La S-nitrosazione può regolare anche la trasduzione del segnale mediata dalla ADP-ribosilazione dei gruppi sulfidrilici delle proteine, correlando la biochimica dell'NO ai processi indipendenti dal cGMP. In particolare, la S-nitrosazione della gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) promuove l'ADP-ribosilazione dell'enzima e la conseguente inibizione della sua attività. Poiché il GAPDH svolge un ruolo fondamentale nella glicolisi, l'ADP-ribosilazione di questo enzima potrebbe spiegare, almeno in parte, la tossicità cellulare mediata dall'NO.

Inoltre, la reazione dell'NO con i gruppi tiolici presenti sulla membrana cellulare è stata associata ad effetti antimicrobici, alla modulazione dei siti regolatori dei recettori glutammatergici del tipo NMDA ed alle alterazioni delle funzioni delle cellule del muscolo liscio.

Lo stato redox dell'NO può influenzarne la reattività verso alcuni gruppi funzionali presenti nelle macromolecole biologiche. In particolare, l'emoglobina reagisce con l'NO⁺ a livello del ferro dell'eme, con l'NO⁺ a livello dei gruppi amminici, per formare complessi nitrosamminici, e con l'NO⁺ e l'NO⁻, a livello dei tioli, per generare S-nitroso-composti (v. EMOGLOBINE**).

L'NO come mediatore fisiologico

L'identificazione di un inibitore competitivo della NOS, l'analogo strutturale dell'arginina N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), ha rappresentato un importante progresso nello studio del ruolo dell'NO nei processi biologici. La L-NMMA, infatti, è un potente vasocostrittore in grado di indurre una risposta sistemica ipertensiva negli animali e di causare la vasocostrizione arteriosa nell'avambraccio dell'uomo. La sua attività di costrizione sulle cellule muscolari lisce dei vasi non è intrinseca, ma è del tutto dipendente dall'endotelio ed è conseguenza dell'inibizione del meccanismo endogeno della vasodilatazione. Queste osservazioni hanno suggerito che esista un tono vasodilata-

TAB. III. PROTEINE LEGANTI L'NO

Inibizione	Attivazione	Trasporto
Aconitasi NADPH-ubichinone ossidoriduttasi Succinato-ubichinone ossidoriduttasi Ribonucleotide riduttasi NADPH-ossidasi Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi Emoglobina Mioglobina Citocromo ossidasi	Guanilato ciclasi ADP-ribosil transferasi Ciclossigenasi	Nitroforine

torio fisiologico basale, NO-dipendente, essenziale per la regolazione del flusso e della pressione del sangue. Ciò implica che la visione tradizionale del sistema cardiovascolare come un circuito di resistenza andrebbe ridiscussa. Il tono vasodilatatorio attivo, NO-dipendente, sembra essere mantenuto attraverso stimolazioni delle cellule endoteliali come la pulsazione del flusso ematico e lo stress meccanico.

Tuttavia, le cellule endoteliali possono rilasciare l'NO anche in seguito alla stimolazione chimica di recettori di membrana. L'acetilcolina (ACh), ad esempio, è in grado di stimolare il rilascio dell'NO da parte delle cellule endoteliali, agendo probabilmente a livello dei recettori M_2 -muscarinici. Analogo effetto è indotto dalla bradichinina. Sia lo stress meccanico che l'attivazione recettoriale da parte dell'ACh o della bradichinina, inducono nell'endotelio vascolare un influxo di Ca^{2+} che, legandosi alla calmodulina, stimola l'isoforma costitutiva della NOS a produrre NO. L'NO così formato può diffondere liberamente nelle cellule muscolari lisce adiacenti dove stimola la guanilato ciclasi solubile a generare il cGMP a partire dal GTP, con conseguente rilassamento vascolare. Infine, il cGMP è in grado di ridurre la produzione dell'NO, attraverso un meccanismo a *feedback* negativo che opera su due livelli: da una parte viene inibita direttamente la NOS, dall'altra vengono inibiti sia il rilascio del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, sia l'entrata del Ca^{2+} extracellulare attraverso i canali associati ai diversi recettori.

L'NO ha un ruolo fondamentale anche nel mantenimento del tono vascolare basale polmonare (v. ANESTETICI**). Quando la resistenza vascolare polmonare (PVR) è elevata, l'infusione nell'arteria polmonare di ACh causa vasodilatazione sia nel coniglio che nel gatto. Utilizzando preparati polmonari umani ottenuti nel corso di trapianti cuore-polmone, è stato osservato un aumento della PVR basale dopo infusione con un inibitore dell'attività biologica dell'NO.

In generale, l'NO partecipa nel controllo omeostatico dell'intero sistema vascolare. In particolare, l'NO ha un ruolo importante nell'erezione del pene, nella contrazione del muscolo anococcigeo e nella regolazione del tono vascolare basale del sistema urinario (v. RENE E BACINETTO**, *insufficienza renale acuta*), dell'intestino, della trachea e dell'esofago.

Infine, l'NO è in grado di inibire l'aggregazione delle piastrine, attraverso un meccanismo che dipende dal cGMP, di modulare la proliferazione cellulare e di controllare il differenziamento cellulare.

L'NO come agente tossico

La maggior parte delle funzioni fisiologiche mediate dal rilascio dell'NO, coinvolgono l'attivazione delle isoforme costitutive della NOS. L'induzione della iNOS, da parte delle citochine e delle endotossine batteriche (LPS), genera elevate concentrazioni dell'NO ed è quasi sempre associata ad eventi patologici. L'incremento dell'NO che si osserva negli animali colpiti da shock endotossico, anafilattico o emorragico è accompagnato da un evidente stato ipotensivo, il quale può essere contrastato somministrando inibitori specifici della NOS. Il grado di inibizione della sintesi dell'NO rappresenta un punto essenziale per la riuscita del trattamento, poiché alte dosi di inibitori possono determinare gravi vasocostrizioni e morte rapida. Tale fenomeno non è sorprendente poiché, nel corso dello shock endotossico, l'ipotensione è accompagnata da un incremento delle concentrazioni delle sostanze vasocostrittive circolanti, quali agonisti simpatici, angiotensina II, trombossano A_2 e vasopressina. Una soluzione potrebbe essere quella di inibire completamente la produzione dell'NO generato sia

dalla cNOS che dalla iNOS e, allo stesso tempo, fornire sostanze ad azione vasodilatatoria per contrastare l'ipertensione e mantenere l'omeostasi vascolare. Tale trattamento dovrebbe anche prevenire l'incremento dell'aggregazione piastrinica che avviene durante l'inibizione della sintesi dell'NO. L'aumentata sintesi dell'NO da parte della iNOS espressa nelle cellule muscolari del miocardio e dell'endocardio potrebbe, inoltre, essere rilevante nelle disfunzioni cardiache associate allo shock endotossico. Nel corso della cirrosi epatica, lo stato iperdinamico, caratterizzato dall'aumento della gittata cardiaca, si associa a vasodilatazione, diminuita capacità di risposta a farmaci vasocostrittori, e ad elevate concentrazioni circolanti di endotossine. Anche questa condizione sembra essere il risultato di una eccessiva sintesi dell'NO in seguito all'induzione della iNOS.

L'NO sembra essere coinvolto in una serie di meccanismi che conducono alla tossicità cellulare. Uno di questi sembra coinvolgere l'inattivazione dei centri ferro-zolfo degli enzimi respiratori mitocondriali. Un altro meccanismo potrebbe essere legato alla capacità dell'NO di incrementare l'ADP-ribosilazione di certe proteine. In particolare, nelle cellule polimorfonucleate, l'NO stimola l'ADP-ribosilazione di almeno due proteine: l'actina (37 kDa) e un'altra proteina di 43 kDa. Nel cervello e negli eritrociti, invece, l'NO stimola l'ADP-ribosilazione del GAPDH, provocando un'inibizione dell'attività enzimatica. Poiché il GAPDH svolge un ruolo essenziale nel processo della glicolisi, l'ADP-ribosilazione di questo enzima potrebbe spiegare, almeno in parte, la tossicità cellulare causata dall'NO.

Inoltre la tossicità cellulare potrebbe coinvolgere la perossidazione lipidica e l'indiscriminata ossidazione dei gruppi sulfidrilici da parte dei perossinitriti ($ONOO^-$) generati dall'interazione dell'NO con lo ione superossido.

Un ulteriore meccanismo sembra essere correlato con l'effetto mutageno dell'NO sul DNA. Questo effetto è stato recentemente attribuito alle reazioni di deaminazione che lo ione nitrosonio (NO^+) provoca a livello delle basi pirimidiniche e puriniche che presentano come sostituenti i gruppi $-NH_2$. Di regola, la citosina si accoppia nel DNA con la guanina, ma la sua deaminazione conduce alla formazione di uracile, un analogo della timina, provocando, dopo una serie di duplicazioni del DNA, mutazioni del tipo $C...G \rightarrow T...A$. L'adenina, invece, si accoppia nel DNA con la timina, ma la sua deaminazione produce l'ipoxantina, un analogo della guanina, la quale accoppiandosi con la citosina provoca una mutazione del tipo $A...T \rightarrow G...C$. I risultati della deaminazione della citosina e dell'adenina possono essere in parte corretti. L'estrema instabilità della xantina, generata dalla deaminazione della guanina, provoca la sua rapida depurinazione, producendo una mutazione del tipo $G...C \rightarrow T...A$. Quest'ultima mutazione sembra essere quella predominante nei meccanismi molecolari della mutagenesi osservati nelle cellule esposte all'NO.

L'NO e il sistema immunitario

L'NO come agente antimicrobico

I primi studi riguardanti l'inibizione della crescita del micete *Cryptococcus neoformans* da parte dei macrofagi mostrarono come fosse necessaria la presenza dell'arginina, suggerendo una capacità antimicrobica dell'NO. Successivamente fu dimostrata la produzione dell'NO da parte dei macrofagi murini, in seguito all'induzione della iNOS da parte di un antigene della malaria ottenuto dal *Plasmodium vinckei*. Inoltre, l'inibizione della sintesi dell'NO in seguito alla somministrazione dell'L-NMMA in topi infettati con *Leishmania major* produceva una rapida diffusione della malattia. La capacità antimicrobica dell'NO è stata poi am-

piamente confermata per una varietà di agenti patogeni, quali le forme extracellulari dello *Schistosoma mansoni*, le forme extracellulari del *Trypanosoma brucei* e del *Trypanosoma cruzi*, del *Toxoplasma gondii*, le forme intracellulari del *Mycobacterium*, gli amastigoti intracellulari della *Leishmania major*, le forme intraepatiche della malaria murina da *Plasmodium yoelii* e da *Plasmodium berghei* ed umana da *Plasmodium falciparum*.

L'NO quale regolatore dell'immunità

L'NO può svolgere un'attività antiproliferativa. In particolare, la proliferazione e l'attività dei linfociti T-citotossici, in una sospensione mista di linfociti e splenociti, è molto bassa. L'aggiunta di inibitori specifici della NOS induce la proliferazione dei linfociti. Analogo effetto si ottiene utilizzando l'emoglobina, in grado di sottrarre l'NO prodotto.

Un incremento della produzione dell'NO è stato osservato nei trapianti allogenici, ma non in quelli singenici. Sebbene i macrofagi rappresentino la fonte primaria dell'NO in queste condizioni, anche i linfociti sono in grado di produrlo.

Inoltre, l'NO modula l'attività secretoria e metabolica dei macrofagi e, perfino, la loro vitalità. In particolare, i macrofagi indotti ad esprimere la iNOS subiscono le stesse alterazioni metaboliche delle cellule tumorali esposte all'NO. Infine in seguito all'inibizione della sintesi dell'NO, le cellule di Kupffer producono più PGE₂ e IL-6 in risposta a IFN γ ed LPS, suggerendo un possibile effetto inibitorio diretto dell'NO sull'attività delle ciclossigenasi. Peraltro, l'NO è in grado di stimolare l'attività delle ciclossigenasi in cellule macrofagiche e in quelle astrocitarie.

Infine, l'NO sembra svolgere un ruolo rilevante anche nell'apoptosi (v.**) osservata nelle colture di macrofagi murini stimolati con LPS.

L'NO nella risposta infiammatoria

La sintesi dell'NO è descritta nelle risposte infiammatorie indotte da prodotti batterici e nel corso di reazioni autoimmuni. Le risposte infiammatorie sistemiche possono essere riprodotte in modelli sperimentali animali somministrando LPS o TNF. Simili meccanismi sono stati riscontrati anche nell'uomo. Si osservano, infatti, significativi aumenti dei nitrati plasmatici nella sepsi.

L'NO agisce anche nel corso delle risposte infiammatorie croniche localizzate. In particolare, i condrociti di coniglio producono NO in risposta alla IL-1. Inoltre, alte concentrazioni di nitriti si osservano nel liquido sinoviale dei pazienti con osteoartrite. L'NO sembra avere un ruolo importante anche nel diabete giovanile. Infatti, l'aumentata produzione dell'NO per effetto dell'IL-1 a livello delle isole di Langerhans può interferire con la secrezione dell'insulina e danneggiare le cellule del pancreas endocrino. Recentemente, è stato suggerito che l'NO possa rappresentare un fattore patogenetico nell'autoimmunità. Infine, l'aumento dell'espressione della iNOS nelle cellule muscolari lisce dell'aorta è stata correlata con la patogenesi dell'aneurisma aterosclerotico.

L'NO e il sistema nervoso centrale

I neuroni che producono l'NO

Circa trenta anni fa, utilizzando tecniche istochimiche, Thomas e Pearse descrissero un tipo di cellule che chiamarono «cellule attive solitarie», corrispondenti a neuroni con un'elevata attività NADPH-diaforasica. Solo recentemente è stato dimostrato che la NADPH-diaforasi neuronale corrisponde in realtà, alla NOS-I.

La NOS-I è presente in diverse aree del sistema nervoso centrale, fra cui il corpo striato, l'ippocampo, la corteccia,

l'ipotalamo, il mesencefalo, il midollo allungato ed il cervelletto. Lo strato molecolare e lo strato delle cellule granulari del cervelletto, lo strato granulare del bulbo olfattorio e i collicoli inferiori e superiori presentano i livelli più elevati della NOS-I, viceversa il midollo allungato i livelli più bassi. La NOS-I è anche abbondante nel giro dentato dell'ippocampo, nello strato superficiale della corteccia cerebrale, nei nuclei striati, nelle isole di Calleja e nella fascia diagonale di Broca.

Ruolo fisiologico dell'NO

Nel S.N.C., ed in particolare nella corteccia cerebellare, una aumentata attività esercitata dagli aminoacidi eccitatori determina un incremento dei livelli del cGMP. Il neurotrasmettitore rilasciato dalle principali sinapsi eccitatorie è il glutammato, il quale agisce attraverso l'attivazione di specifici recettori glutammatergici. Come avviene per altri neurotrasmettitori esistono due categorie di recettori per gli aminoacidi a carattere eccitatorio: quelli contenenti un canale ionico integrale (recettori ionotropici) e quelli associati alle proteine-G (recettori metabotropici). I recettori ionotropici possono essere classificati, in base alle loro proprietà farmacologiche ed elettrofisiologiche, in specifici per l'acido N-metil-D-aspartico (NMDA), l'acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico e l'acido cainico.

Durante la trasmissione sinaptica a «bassa frequenza» sono coinvolti principalmente i recettori del tipo non-NMDA, mentre i canali ionici associati ai recettori NMDA sono bloccati dal Mg²⁺. Durante la trasmissione ad «alta frequenza» si verifica una depolarizzazione prolungata della membrana postsinaptica che provoca l'eliminazione del Mg²⁺ dai canali ionici associati ai recettori NMDA, determinando un flusso di Ca²⁺ all'interno della cellula. Il Ca²⁺ si lega alla calmodulina (CAL) ed attiva la NOS-I. Tuttavia, entro un compartimento cellulare, l'aumento del Ca²⁺ necessario per la stimolazione della NOS induce simultaneamente una inibizione della guanilato ciclasi presente. Ciò sembra suggerire che l'NO possa agire come un messaggero intercellulare. Sarebbe cioè in grado di diffondere fuori della cellula da cui è stato generato ed attivare la guanilato ciclasi presente nelle terminazioni presinaptiche e nei prolungamenti astrocitari, che generalmente avvolgono la maggior parte delle sinapsi centrali. L'NO potrebbe anche agire all'interno delle cellule in cui viene prodotto, ma solo nei siti dove i livelli di Ca²⁺ intracellulare non siano sufficienti per inibire la guanilato ciclasi solubile.

A tutt'oggi il ruolo svolto dal cGMP nel S.N.C. non è del tutto chiarito. Nel cervelletto, il cGMP potrebbe attivare le protein-chinasi cGMP-dipendenti, largamente espresse nelle cellule del Purkinje, inducendo la fosforilazione di proteine bersaglio. In altre regioni del cervello, il GMP ciclico potrebbe attivare le fosfodiesterasi, altamente espresse nella corteccia, nell'ippocampo e nei gangli basali, ma non nel cervelletto, determinando una inibizione degli eventi mediati dall'AMP ciclico nelle cellule bersaglio. Inoltre, il cGMP potrebbe avere un'azione diretta sui canali ionici. Infine, il sistema NO-cGMP potrebbe essere coinvolto nel sistema olfattorio, nel sistema visivo, nella «long term potentiation», nel sonno e nella percezione del dolore.

Ruolo dell'NO nella patologia neurologica

L'NO sembra essere coinvolto, come effettore neurotossico, in numerosi disturbi neurologici quali l'ischemia cerebrale, la malattia di Alzheimer, la corea di Huntington, la sclerosi multipla e il danno cerebrale indotto dall'alcool. L'effetto neurotossico dell'NO, conseguente alla iperattivazione dei recettori del tipo NMDA, è stato dimostrato sia nelle colture primarie di neuroni corticali di ratto che nelle sezioni *ex vivo*

dell'ippocampo. Recentemente, un effetto neurodegenerativo è stato osservato direttamente nell'ippocampo, in seguito a microiniezione di nitroprussiato di sodio, un donatore esogeno dell'NO. Sebbene l'NMDA stimoli la formazione dell'NO, i neuroni contenenti la NOS-1 (neuroni diaforasici) mostrano una selettiva resistenza alla neurotossicità mediata dall'NMDA. In realtà, la tossicità dell'NO è notevolmente amplificata in presenza dei radicali dell'ossigeno. Infatti, l'NO reagisce con lo ione superossido per formare perossinitriti e radicali idrossili. I neuroni diaforasici esprimono un'elevata concentrazione di superossido dismutasi manganese-dipendente (MnSOD) che riducono la concentrazione dei superossidi. Questo potrebbe spiegare la resistenza di questi neuroni alla tossicità mediata dall'NO.

Sono sempre più abbondanti le indicazioni secondo cui l'NO possa svolgere un ruolo importante come mediatore del danno cerebrale ischemico. Anche se i primi studi condotti fornirono indicazioni contrastanti, i dati più recenti sono a favore di un ruolo importante sia nella induzione del danno sia nella protezione. In seguito alla ostruzione (sperimentale o meno) di un vaso arterioso cerebrale, si crea un'area in cui l'ischemia è più pronunciata e si verifica morte cellulare per ipossia. Nelle aree circostanti, la riduzione del flusso è via via meno marcata, grazie al contributo della vascolarizzazione collaterale proveniente dalle aree limitrofe. In queste zone di flusso ridotto, i neuroni sono elettricamente silenziosi, ma al momento della eventuale ripresa circolatoria, sono ancora in grado di riprendere la loro attività. Nelle ore immediatamente seguenti la riperfusione, si verifica un'iperattività delle sinapsi glutammatergiche che, con l'iperattivazione dei canali NMDA, porta ad un aumento dei livelli citoplasmatici del Ca^{2+} con conseguente iperattivazione della cNOS e sovrapproduzione di NO. D'altra parte emergono dati che dimostrano anche un'aumentata espressione del mRNA per la nNOS nei neuroni danneggiati. Il danno ischemico determina inoltre una marcata induzione della iNOS nelle cellule dei vasi sanguigni e nei granulociti neutrofili che infiltrano il focolaio. Questo insieme di risposte porta ad un forte aumento dei livelli dell'NO nell'area di ipossia relativa, dove può raggiungere concentrazioni micromolari, probabilmente anche grazie alla maggiore stabilità della molecola in ambiente ipossico.

Peraltro, l'NO può anche svolgere dei ruoli protettivi nei confronti dell'ipossia. Infatti l'attivazione della NOS endoteliale può svolgere una azione vasodilatatrice capace di migliorare l'ossigenazione dell'area colpita. Una conferma di ciò viene sia studiando gli effetti di inibitori selettivi delle diverse isoforme della NOS, sia ricorrendo ad animali da laboratorio transgenici, resi difettivi per le diverse isoforme. L'induzione di ischemia sperimentale in esemplari difettivi per la nNOS o per la iNOS mostra la comparsa di danni cerebrali assai più limitati rispetto ai controlli, a seguito della mancata iperproduzione di NO. Al contrario, in topi difettivi per la NOS endoteliale, le lesioni appaiono più estese, come risultato della ridotta vasodilatazione cerebrale.

Recentemente, è stato proposto un ruolo importante per l'NO anche nella patogenesi dell'infezione da HIV. L'AIDS, specialmente nella fase terminale, è spesso associata ad una serie di manifestazioni neurologiche e neuropsichiatriche che comprendono i deficit della funzione cognitiva e motoria (*AIDS dementia complex*). Nonostante non siano a disposizione dati che dimostrino una diretta infezione dei neuroni nel corso dell'AIDS, si osserva una notevole perdita neuronale sia nella corteccia che nella retina.

Un ruolo importante nel danno neuronale sembra essere svolto dalla gp120, una glicoproteina con involucro del virus HIV (v. RETROVIRUS [v.*; v.**]), anche in assenza dell'infezione virale. Infatti, la gp120 induce la morte neuro-

nale in colture primarie di ippocampo e dei gangli della retina. Recentemente, allo scopo di verificare il potenziale patogenetico della gp120 nel cervello intatto, sono stati prodotti topi transgenici con la capacità di esprimere costitutivamente la glicoproteina. Questo è stato possibile inserendo il gene per la gp120 nel primo esone del gene che codifica per la proteina acida gliofibrillare, una proteina espressa costitutivamente dagli astrociti. I risultati ottenuti utilizzando questo modello hanno dimostrato chiaramente come il profilo delle modificazioni neuronali e gliali osservate rispecchi quelle precedentemente evidenziate nel cervello di pazienti infettati dal virus HIV-1. La gravità del danno, inoltre, è correlata positivamente con i livelli della gp120 espressi nel S.N.C. Inoltre, sembra che la tossicità neuronale indotta dalla gp120 sia preceduta da un marcato incremento del Ca^{2+} intracellulare, in seguito ad una iperstimolazione dei recettori del tipo NMDA. La tossicità neuronale indotta dalla gp120 in colture primarie di neuroni fetali di ratto sembra essere mediata dal rilascio dell'NO e degli anioni superossido.

Nel corso dell'infezione da HIV si osserva un incremento della produzione delle citochine (v.***) che sono in grado di stimolare le cellule gliali a rilasciare elevate concentrazioni dell'NO. Inoltre, l'NO prodotto dalle cellule gliali può mediare la sintesi delle PGE_2 che possono contribuire al danno neuronale associato all'AIDS.

È importante sottolineare, comunque, che l'intero quadro patogenetico della degenerazione neuronale è la risultante di un equilibrio fra produzione di fattori tossici e fattori trofico-protettivi. Del resto, l'NO prodotto dalle cellule astrogliali in seguito al trattamento con l'NMDA o con la gp120 è in grado di indurre l'espressione del mRNA codificante per il NGF (*Nerve Growth Factor*, v. NERVOSO TESSUTO, X, 733; NERVOSO TESSUTO*, coll. *5366), un fattore trofico per le cellule neuronali. Una più fine conoscenza dei meccanismi di regolazione del ciclo dell'NO permetterà in futuro di sfruttare le proprietà protettive nei confronti di quelle tossiche e di indicare nuove vie farmacologiche nella lotta contro le patologie neurodegenerative.

L'NO nell'evoluzione

Anche se la maggior parte degli studi sull'NO sono stati condotti sui mammiferi, più recentemente questa molecola è stata riscontrata in tutti gli altri gruppi di vertebrati studiati, dai ciclostomi ai pesci, anfibi, rettili ed uccelli. In questi organismi sono stati confermati i principali ruoli e caratteristiche già descritti per i mammiferi. Conseguentemente a questi studi sui vertebrati, le osservazioni sono state estese anche agli invertebrati, anche se molte delle ricerche sono ancora preliminari.

Indicazioni sulla presenza dell'enzima NOS sono ormai certe per quanto riguarda tutti i principali gruppi, dai celenterati, ai plattelminti, nematodi, anellidi, molluschi ed artropodi. Mancano dati sui poriferi.

Le caratteristiche delle diverse isoforme della NOS degli invertebrati mostrano punti di contatto con quanto noto per i vertebrati, sia sul piano funzionale che su quello molecolare. Molto limitate sono attualmente le conoscenze sulle sequenze aminoacidiche, che fino ad ora sono state studiate solo per pochissimi casi di insetti. Nei diversi gruppi di invertebrati sono stati proposti o dimostrati diversi possibili ruoli funzionali, in parte sovrapponibili a quelli presenti nei vertebrati. In particolare sono state descritte sia funzioni di neurotrasmissione, legate in particolare a meccanismi sensoriali, sia funzioni di difesa come anche funzioni di controllo del bilancio idrico-salino.

Ruoli nella neurotrasmissione sono stati descritti nei celenterati (idre e meduse, con particolare riguardo alla che-

miocezione, al controllo motorio e alla scarica delle cellule urticanti), nei molluschi (chemiocezione, apprendimento, controllo motorio, modulazione dell'attività sinaptica) e negli artropodi (chemiocezione, consolidamento della memoria, differenziamento cellulare).

Negli insetti è stato descritto un ruolo per l'NO nella funzione escrettrice dei tubuli di Malpighi. Di interesse notevole sono i ruoli svolti nei meccanismi difensivi di molluschi ed artropodi, dove sono state descritte forme di NOS inducibili, in parte simili a quelle dei macrofagi dei mammiferi. Cellule specializzate circolanti, gli emociti, stimolate da agenti simili a quelli capaci di indurre la iNOS dei mammiferi (LPS, TNF, INF γ), esprimono una elevata attività NOS che produce NO con funzione battericida. Questa attività è stata descritta anche nel *Limulus polyphemus*, il così detto «granchio a ferro di cavallo» delle coste del nord America, che viene considerato un fossile vivente. Del tutto particolare è il ruolo svolto dall'NO in alcuni insetti ematofagi come *Rhodnius* o *Cimex*. Nelle ghiandole salivari del *Rhodnius prolixus*, dotate di una elevata attività NOS, viene sintetizzata in abbondanza una particolare proteina contenente un gruppo eme, la nitroforina. Il gruppo eme della nitroforina è in grado di legare l'NO che viene rilasciato quando l'insetto, pungendo l'ospite, inietta la nitroforina. L'NO rilasciato nel sangue dell'ospite, svolgendo la sua azione vasodilatatrice ed antiaggregante, facilita l'ematofagia da parte dell'insetto. È interessante notare che una elevata attività NOS è stata recentemente descritta anche in cellule buccali della sanguisuga.

Fra i protozoi, nel *Plasmodium falciparum*, è stata descritta una attività NOS, cui è stata attribuita una massa molecolare di circa 100 kDa, quindi minore di quella delle diverse isoforme dei mammiferi. Per quanto riguarda infine i procarioti, esistono dati a favore della presenza della NOS in *Nocardia*. L'enzima procariotico mostra analogie funzionali con quelle degli eucarioti, nella dipendenza da NADPH, FAD, Ca²⁺, H₂B, mentre risulta non richiedere la CAL. Molto diverso risulta invece il peso molecolare (circa 52 kDa) ed anche la sequenza aminoacidica non sembra mostrare analogie con le sequenze eucariotiche. Nei vegetali infine dati recenti suggeriscono la produzione dell'NO nelle radici e nei noduli radicali del *Lupinus albus*.

Bibliografia

- Archer S., *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 1993, **7**, 349-360.
- Bates J. N., Baker M. T., Guerra R. Jr., Harrison D. G., *Biochem. Pharmacol.*, 1991, **42**, S156-S157.
- Bohn H., Brendel J., Martorana P. A., Schonafinger K., *Br. J. Pharmacol.*, 1995, **114**, 1605-1612.
- Butler A. R., Flitney F. W., Williams D. L. H., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1995, **16**, 18-22.
- Butler A. R., Williams D. L. H., *Chem. Soc. Rev.*, 1993, **22**, 233-241.
- Cotton F. A., Wilkinson G., *Adv. Inorg. Chem.*, 5 ed., 1988, John Wiley & Sons, New York.
- Feelish M., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1991, **17**, S25-S33.
- Feelish M., Ostrowski J., Noack E., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1989, **14**, S13-S22.
- Feelish M., Noack E., in *Heart Failure Mechanisms and Management*, Lewis B. S., Kimchi A. eds., 1991, Springer-Verlag, Berlin, pp. 241-255.
- Feelish M., Schonafinger K., Noack E., *Biochem. Pharmacol.*, 1992, **44**, 1149-1157.
- Feelish M., Stamler J. S., *Methods in Nitric Oxide Research*, 1996, Wiley, Inc., New York.
- Feelish M., Pröl M., Zamora R., et al., *Nature*, 1994, **368**, 62-65.
- Ferrioli R., Folco G. C., Ferretti C., et al., *Br. J. Pharmacol.*, 1995, **114**, 816-820.
- Flitney F. W., Megson I. L., Flitney D. E., Butler A. R., *Br. J. Pharmacol.*, 1992, **107**, 842-848.
- Fontecave M., Pierre J. L., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1994, **131**, 620-631.
- Friederich J. A., Butterworth IV J. F., *Anesth. Analg.*, 1995, **81**, 152-162.
- Fulop V., Moir J. W. B., Ferguson S. J., Hajdu J., *Cell*, 1995, **81**, 369-377.

- Gasco A., Fruttero R., Sorba G., *Il Farmaco*, 1996, **51**, 617-635.
- Kovaluk E. A., Fung H. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991, **259**, 519-525.
- Kukimoto M., Nishikama M., Murphy M. E. P., et al., *Biochemistry*, 1994, **33**, 5246-5252.
- Lefer A. M., Lefer D. J., *Drugs of the future*, 1994, **19**, 665-672.
- Lincoln J., Hoyle C. H. V., Burnstock G., *Nitric Oxide in Health and Disease*, 1997, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Pascal P., in *Nouveau Traité de Chimie Minérale*, Tome X, 1956, Masson, Paris, pp. 292.
- Pryor W. A., Squadrito G. L., *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, L699-L722.
- Richter-Addo G. B., Legzdins P., *Metal Nitrosyls*, 1992, Oxford University Press, New York.
- Schroder H., *Adv. Drugs Res.*, 1996, **28**, 253-267.
- Silvestrini M. C., Falcinelli S., Ciabatti I., et al., *Biochimie*, 1994, **76**, 641-654.
- Stamler J. S., Singel D. J., Loscalzo J., *Science*, 1992, **258**, 1898-1902.

Bibliografia di argomenti medico-biologici

- Conner E. M., Grisham M. B., *Methods*, 1995, **7**, 1-13.
- Crane B. R., Arvai A. S., Gachhui R., et al., *Science*, 1997, **278**, 425-431.
- Dawson T. M., Dawson V. L., *Annu. Rev. Med.*, 1996, **47**, 219-227.
- Garthwaite J., *Trends Neurosci.*, 1991, **14**, 60-67.
- Gow A. J., Stamler J. S., *Nature*, 1998, **391**, 169-173.
- Jaffrey S. R., Snyder S. H., *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1995, **11**, 417-440.
- Lyons C. R., *Adv. Immunol.*, 1995, **60**, 323-371.
- Marletta M. A., *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 12231-12234.
- Mayer B., Hemmels B., *Trends in biological Science*, 1997, **22**, 477-481.
- McDonald L. J., Murad F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1996, **211**, 1-6.
- Melino G., Bernassola F., Knight R. A., et al., *Nature*, 1997, **388**, 432-433.
- Moncada S., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 2002-2012.
- Schulz J. B., Matthews R. T., Beal M. F., *Curr. Opin. Neurol.*, 1995, **8**, 480-486.
- Snyder S. H., Bredt D. S., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, **12**, 125-128.
- Yacoub M., Polak J. M., *Nature*, 1997, **385**, 385.

PAOLO ASCENZI, ANDREA BELLELLI, MARCO COLASANTI,
ROBERTA FRUTTERO, ALBERTO GASCO,
TIZIANA PERSICHINI E GIORGIO VENTURINI

MONOSSIDO DI CARBONIO

f. monoxyde de carbone. - 1. carbon monoxide. - 1. Kohlenmonoxid.

SOMMARIO

Recenti acquisizioni sul ruolo fisiologico del monossido di carbonio (CO) (col. 3798). - Formazione del CO nell'organismo ed enzima responsabile (emeoxygenasi) (col. 3799). - CO come messaggero biologico (col. 3801). - CO e funzioni nervose (col. 3802).

Recenti acquisizioni sul ruolo fisiologico del monossido di carbonio (CO)

Il monossido di carbonio (CO) costituisce, come il monossido di azoto ([v.*]; nitrossido, NO), una nuova classe di molecole messaggere di natura gassosa, fino a poco tempo fa ritenute solo inquinanti ambientali.

Il possibile ruolo fisiologico di CO nell'organismo è stato studiato solo a partire dalla seconda metà degli anni '80 e sue azioni sono state sostanzialmente individuate, come per il gas radicalico NO, a livello sia della muscolatura liscia che del sistema nervoso centrale (S.N.C.) (Marks et al., 1991; Verma et al., 1993; Dawson e Snyder, 1994). CO è più stabile di NO, ma sembra possedere funzioni biologiche sugli stessi distretti, come vasodilatazione (Furchgott e Jothianandan, 1991; Johnson et al., 1995) e neurotrasmissione, con potenza minore. In particolare, sulla muscolatura liscia CO causa un rilasciamento di tipo non adrenergico non colinergico a livello gastroenterico (Rattan e Chakder, 1993) ed azioni vasodilatatrici. Azioni di CO sono state anche segnalate a livello della muscolatura cardiaca. Nel S.N.C. (v. sotto) CO partecipa al controllo di neuroni ippocampali, è coinvolto nella regolazione del potenziamento a lungo termine (v. SINAPSI**), considerato il substrato fisiologico della

memoria a lungo termine, come pure nell'attivazione dei recettori a N-metil-D-aspartato (NMDA) (v. RECETTORI [v.*; v.**]) da parte del glutammato, e modula la funzione di neuroni olfattori. Può interferire, come si vedrà in prosieguo, sull'adattamento dell'organismo allo stress e sulle funzioni gonadiche (Costa *et al.*, 1996; Brann *et al.*, 1997). Agisce come regolatore fisiologico dell'attività sensoriale dei glomi carotidei (Prabhakar *et al.*, 1995). Oltre a ciò, CO è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica (Brune e Ulrich, 1987).

Il CO è anche in grado di modulare l'ingresso di ioni quali Ca^{2+} e K^+ in vari tipi cellulari: infatti CO inibisce, in modo reversibile, l'ingresso di Ca^{2+} nelle cellule muscolari lisce, mentre stimola l'ingresso di K^+ nelle cellule epiteliali della cornea del coniglio.

Formazione del CO nell'organismo ed enzima responsabile (emeoossigenasi)

La produzione endogena di CO è stata già descritta verso la fine del XIX secolo e dimostrata a partire dagli anni '50. CO, nell'uomo sano, si forma dal catabolismo dei gruppi eme di emoproteine al tasso di circa 0,4 ml/h; inoltre, circa il 40% di questa produzione si può attribuire al catabolismo di emoproteine diverse dall'emoglobina (mioglobina, catalasi, citocromi, etc.). La produzione di CO, inoltre, si mantiene costante negli individui di sesso maschile durante l'arco della giornata e nel corso dei mesi, mentre nelle

donne durante il ciclo mestruale si verifica un aumento della produzione di CO che risulta più elevato nella fase progestinica del ciclo rispetto a quella estrogenica.

Il CO è un prodotto del catabolismo dell'eme, contenuto nelle emoproteine, ad opera del sistema enzimatico denominato emeoossigenasi (EC 1.14.99.3) (Maines, 1992; Shibahara, 1994). L'emeoossigenasi, EO, inizia il normale catabolismo dei gruppi eminici aprendo l'anello porfinico nella forma di biliverdina (BV) che è successivamente convertita a bilirubina dalla biliverdina riduttasi (v. anche: BILIARI PIGMENTI; PORFIRINE). In particolare EO catalizza l'ossidazione dell'eme a spese di tre molecole di O_2 e di equivalenti riducenti donati dalla NADPH-citocromo P450 riduttasi. L'emeoossigenasi è una proteina di membrana presente in numerosi organi come la milza, il fegato e il cervello ed impiega l'eme sia come gruppo prostetico che come substrato.

La riduzione dell'eme complessato ad EO da parte della NADPH-citocromo P450 riduttasi comporta il passaggio del ferro contenuto nell'anello porfinico dallo stato III a quello II, cioè in forma ferrosa.

Tale complesso EO-eme-Fe(II) si lega rapidamente all'ossigeno formando un composto reattivo che si trasforma in un intermedio ad azione più ossidante differente dall'eme per l'aggiunta di un gruppo ossidrilico a livello del ponte metinico in posizione α e perciò chiamato α -meso-idrossieme (fig. 1). L' α -meso-idrossieme è a sua volta ossi-

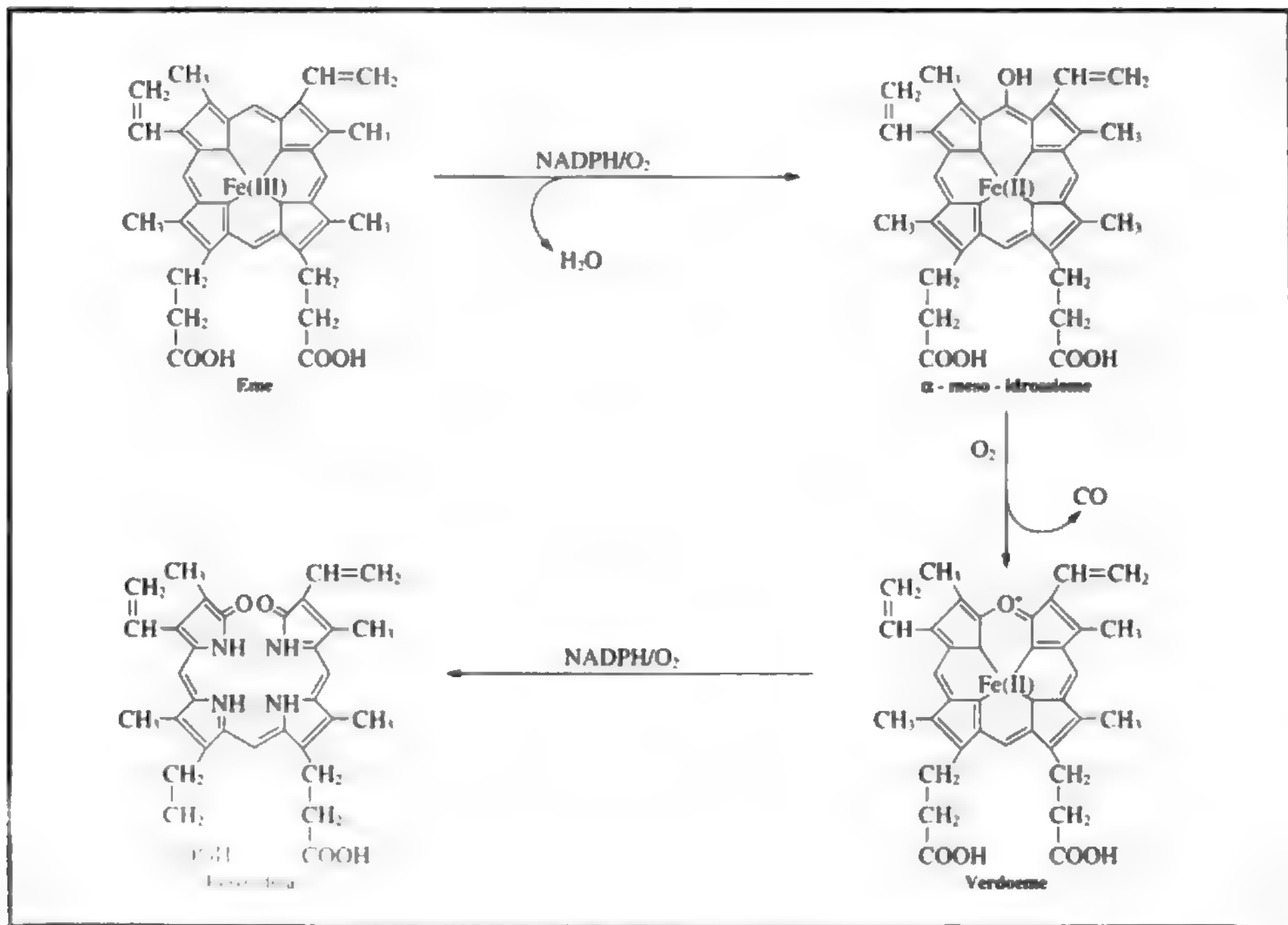


Fig. 1. Intermedi reattivi che si formano durante l'ossidazione dell'eme a biliverdina ad opera dell'emeoossigenasi. (Wilks e Ortiz de Montellano, 1993).

dato in un altro intermedio chiamato *verdoeme* ed è durante questo passaggio che si ha la liberazione di CO a partire dal carbonio del ponte metinico in α . Il ciclo si chiude con la trasformazione del *verdoeme* in BV-IX α a spese dell'ossigeno molecolare con l'aggiunta di ulteriori elettroni forniti dal NADPH attraverso la via della citocromo P450 riduttasi.

La BV è, a sua volta, ridotta nei mammiferi a livello del carbonio in posizione γ dal sistema enzimatico citosolico della biliverdina-riduttasi (BV-riduttasi) e si trasforma in bilirubina, BR-IX α (nei vertebrati posti più in basso nella scala filogenetica la BV è il prodotto finale della degradazione dell'eme).

L'emeossigenasi non può essere considerata di per sé una emoproteina, ma dopo aver legato il gruppo eme ne acquisisce le caratteristiche molecolari e spettrali, formando un complesso enzima-substrato.

EO è presente nelle forme denominate EO-1 e EO-2, rispettivamente inducibile e costitutiva. Questi due isoenzimi si differenziano fra di loro per caratteristiche biochimiche, per la diversa distribuzione nei vari organi (in prevalenza EO-1: milza e fegato; in prevalenza EO-2: testicoli e cervello) e per essere prodotti di geni differenti.

Per quanto riguarda la distribuzione nel cervello dei due isoenzimi, i primi studi mostrarono che la forma predominante era EO-2 e che EO-1 risultava addirittura assente; in seguito con l'affinarsi della tecnica di ibridazione *in situ* si è potuto evidenziare la presenza anche di EO-1 e farne una mappatura (tab. 1). È comunque indubbio che nel cervello del ratto adulto vi sia una grande abbondanza di EO-2, come dimostrato dalle quantità di mRNA formato da 1,3 e 1,9 kb, mentre di molto inferiori sono le quantità di mRNA 1,8 kb specifico dell'isoenzima 1. EO-1 è in effetti presente solo in neuroni selezionati, quali ad es. quelli del giro dentato del complesso ippocampale e quelli dei nuclei paraventricolari ipotalamici.

EO-2 è l'isoforma maggiormente coinvolta nella produzione di CO da parte del cervello. Inoltre, EO-2 possiede un elemento che risponde (aumento del suo trascritto) a glicocorticoidi, sia pure a concentrazioni elevate (Maines *et al.*, 1995), a differenza di EO-1, considerata una *heat shock protein* o *stress protein response* (HSP32) che è sensibile a stimoli differenti, compresi donatori di NO (Takahashi *et al.*, 1996), a dimostrazione di possibili interazioni NO/CO nel cervello.

Il trascritto di EO-1 aumenta di circa 20 volte nell'ora seguente all'inizio dell'ipertermia o alla somministrazione di stimolanti immuno-infiammatori come il lipopolisaccaride batterico (LPS), mentre quelli di EO-2 restano invariati. In verità, l'induzione di EO-1 avviene anche a livello della sintesi proteica poiché lo shock termico aumenta la quantità di proteine *cross*-reattive con EO-1 di circa 4 volte.

EO-1 è anche indotta da ioni di metalli pesanti (ad es., cadmio e ferro), composti sulfidrilici, luce ultravioletta, perossido di idrogeno e arsenito sodico.

Nel ratto EO-1 può essere indotta nella microglia di tutto il cervello come una risposta generale, parenchimale, alla presenza di ossiemoglobina nello spazio subaracnoideo (come dopo una emorragia subaracnoidea) e non come risposta allo stress.

EO-1 può essere un importante componente nella difesa intracellulare contro stress ossidativi.

CO come messaggero biologico

Il monossido di carbonio, così come NO, è in grado di legarsi a vari sistemi enzimatici dotati di un gruppo prostetico eme (EO, guanililciclasi [GC], nitrossidosintasi [NOS], ci-

TAB. 1. DISTRIBUZIONE RELATIVA DEI DUE ISOENZIMI EO NEL CERVELLO DI RATTO

(modificata da Ewing e Maines, 1992)

	EO-2	EO-1	
		Controllo	Shock termico
Telencefalo			
Corpo striato	+	A	G
Corteccia frontale	+	A	G
Corteccia piriforme	+	A	G
Ippocampo			
Cellule dei granuli	+	A	G
Giro dentato	+	+++	G
Diencefalo			
Nucleo paraventricolare	A	++	N
Nucleo supraottico	++	A	G
Substantia nigra	++	+	G
Nucleo ipotalamico ventromediale	++	+++	G
Tronco encefalico			
Nucleo cocleare	++	++	G, N
Nucleo dorsale del rafe	+++	+++	G
Nucleo del facciale	+++	++	G
Collicolo inferiore	+++	+++	G
Lemnisco laterale	+++	+++	G
Nucleo genicolato mediale	+++	A	G
Nucleo del corpo trapezoide	+++	+	G
Nucleo motore del trigemino	+++	+++	G
Nucleo rosso	+++	+++	G
Cervelletto			
Glia di Bergmann	A	A	G
Cellule di Purkinje	++	++	N
Tratto fibroso	++	A	G
Cellule dei granuli	+	A	G

La scala + $\rightarrow$ +++ si riferisce alle quantità di isoforma riscontrata nelle singole aree cerebrali. A = assente; G = aumento di EO-1 immunoreattiva in cellule gliali; N = aumento di EO-1 immunoreattiva in cellule neuronali.

lossigenasi [COX], etc.). I primi studi basati sul modello sperimentale della deossiemoglobina hanno mostrato che l'atomo di ferro di cui è dotato il gruppo prostetico eme è legato con un legame semplice ad un atomo di azoto di un residuo di istidina e, a causa di ciò, l'atomo di ferro tende a fuoriuscire dal piano dell'eme assumendo così una configurazione penta-coordinata ad alto *spin*. Dopo l'arrivo di NO, e secondo alcuni autori di CO, si forma un complesso esa-coordinato a basso *spin* e il ferro tende a rientrare nel piano della porfirina, attivando così i vari enzimi. I sistemi di secondi messaggeri coinvolti nella trasduzione del segnale operato da CO sono molteplici.

Il significato biologico di CO sarebbe legato alla sua capacità di attivare, in maniera analoga al monossido di azoto (NO), l'enzima guanililciclasi (GC) solubile (Maines, 1993) con conseguente aumento delle concentrazioni intracellulari di cGMP (guanosinmonofosfato ciclico). L'aumento di cGMP in effetti media le ricordate azioni di rilasciamento della muscolatura liscia e l'inibizione dell'aggregazione piastrinica.

CO e funzioni nervose

CO è proposto come un messaggero nervoso attivo in analogia con il NO. CO, come NO, è implicato come si è detto

nel potenziamento a lungo termine, un meccanismo cellulare sotteso a certe forme di apprendimento e di memoria (Bernabeu *et al.*, 1995; Fin *et al.*, 1994; Stevens e Wang, 1993; Verma *et al.*, 1993; Zhuo *et al.*, 1993) anche se esistono voci contrastanti (Bing *et al.*, 1995; Meffert *et al.*, 1994; Poss *et al.*, 1995). CO modula l'eccitabilità delle cellule di Purkinje (Nathanson *et al.*, 1995) e la funzione di neuroni olfattori *in vitro*.

CO induce un'alterazione a lungo termine della α_1 -Na⁺, K⁺-ATPasi cerebrale (Nathanson *et al.*, 1995).

CO può essere una potenziale molecola messaggera per eventi mediati dal recettore per l'N-metil-D-aspartato, ad es. in situazioni di stress cronico. In realtà, l'induzione di EO-1 (una aumentata potenzialità per generare CO conseguentemente a esposizione ad un induttore o ad inducenti dell'enzima), in uno con la capacità costitutiva dei neuroni ippocampali CA₁-CA₂ di generare CO tramite reazioni catalizzate da EO-2, potrebbero comportare aumentata eccitabilità neuronale e contribuire agli eventi mediati dal recettore NMDA che interessano l'ippocampo in situazioni di stress cronico.

L'mRNA dell'EO-1 risulta indotto nei neuroni ed in cellule similgliali nella neocortex, nell'ippocampo e nel talamo dopo ischemia transitoria del cervello anteriore (Takeda *et al.*, 1994). Recenti studi hanno dimostrato che l'mRNA per EO-1 e la stessa proteina sono aumentati nella corteccia e nei vasi cerebrali in pazienti con malattia di Alzheimer (v. ALZHEIMER, MALATTIA DI [v.; v.*; v.**]), indicando che EO-1 può essere implicata nella fisiopatologia della detta malattia (Premkumar *et al.*, 1995; Skipper *et al.*, 1995).

Nelle emorragie subaracnoidee, si rileva un forte aumento della espressione di EO-1 a livello microgliale. Questo fenomeno viene considerato come una risposta parenchimale alla presenza di ossiemoglobina nello spazio subaracnoideo e può essere protettivo contro la perossidazione lipidica, la formazione diffusa di radicali liberi (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]), il danno ossidativo e lo spasmo a carico dei vasi indotto dalla emoglobina, aumentando il metabolismo dell'eme pro-ossidante e con ciò la sua depurazione e permettendo alle cellule di sequestrare cataliticamente ferro attivo con la ferritina nonché la produzione dell'antiossidante bilirubina. La degradazione dell'eme inoltre produce CO che, tramite la GC e l'aumento di cGMP (v. anche: EMOGLOBINE**), può modulare il flusso cerebrale attraverso vasodilatazione (Matz *et al.*, 1996).

Il CO è stato trovato in grado di ridurre la secrezione di corticotropin-releasing hormone (CRH) (Pozzoli *et al.*, 1994), vasopressina (Mancuso *et al.*, 1997) ed ossitocina (Kostoglou-Athanassiou *et al.*, 1996), benché Parkes *et al.* (1994) abbiano osservato aumento del rilascio di CRH da cellule ipotalamiche in coltura. Il gas è altresì in grado di stimolare la liberazione di gonadorelina sia da espianti ipotalamici (Lamar *et al.*, 1996) che da linee neuronali immortalizzate (Lamar *et al.*, 1997).

L'inibizione della secrezione di CRH e di AVP (arginin-vasopressina) (Costa *et al.*, 1996) da parte di CO potrebbe rappresentare un fenomeno di compenso a smodate sollecitazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nelle reazioni di stress.

Il legame fra rilascio di AVP e produzione di CO da parte di EO mostra notevole interesse anche da un punto di vista clinico. In varie condizioni patologiche come le porfirie (v.; v.***) e, in particolare, la porfiria acuta intermittente (PAI), caratterizzata da una carenza congenita dell'enzima porfobilinogeno deaminasi, si assiste alla riduzione della disponibilità dell'eme. I pazienti con PAI, fra le altre anomalie cliniche, mostrano una sindrome da inappropriata secrezione di AVP (v. INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH,

SINDROME DA [v.; v.*]) responsabile di una severa iponatre-mia a fronte di una (a) normale capacità di concentrare le urine, (b) normale funzionalità renale e surrenale ed (c) assenza di edema. Questi correlati molecolari e clinici sono in accordo con l'ipotesi che il rilascio di AVP è fisiologicamente inibito da CO e che tale meccanismo di regolazione può venir meno in caso di ridotta disponibilità di eme. In aggiunta, iponatre-mia ed inappropriato rilascio di AVP sono stati individuati in una paziente sofferente di intossicazione da piombo (v. SATURNISMO [v.; v.*]), patologia legata ad una deficitaria sintesi di eme dovuta ad interferenza del metallo con gli enzimi δ -amino-levulinico deidratasi, coproporfirinogeno ossidasi e ferrochelatasi. L'inappropriata secrezione di AVP può, perciò, essere considerata come un evento comune successivo ad una ridotta disponibilità di eme.

V. anche: SEGNALI CELLULARI**.

Bibliografia

- Bernabeu R., Princ F., Levi de Stein M. *et al.*, *Neuroreport*, 1995, 6, 516.
 Bing O., Grundemar L., Ny L. *et al.*, *Neuroreport*, 1995, 6, 1241.
 Brann D. W., Bhat G. K., Lamar C. A., Mahesh V. B., *Neuroendocrinol.*, 1997, 65, 385.
 Brune B., Ullrich V., *Mol. Pharmacol.*, 1987, 32, 497.
 Costa A., Poma P., Navarra P. *et al.*, *J. Endocrinol.*, 1996, 149, 199.
 Dawson T. M., Snyder S. H., *J. Neurosci.*, 1994, 14, 5147.
 Ewing J. F., Maines M. D., *Molecular and Cellular Neurosci.*, 1992, 3, 559.
 Fin C., Schmitz P. K., Da Silva R. C. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, 271, 227.
 Furchgott R. F., Jothanandan D., *Blood Vessels*, 1991, 28, 52.
 Hawkins R. D., Kandel E. R., Siegelbaum S. A., *Annu. Rev. Neurosci.*, 1993, 16, 625.
 Johnson R. A., Laversa M., Askari B. *et al.*, *Hypertension*, 1995, 25, 166.
 Koide T., Weilock T., Siesjö B., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1986, 6, 395.
 Kostoglou-Athanassiou L., Forsling M., Navarra P., Grossman A., *Mol. Brain Res.*, 1996, 42, 301.
 Lamar C. A., Mahesh V. B., Brann D. W., *11th International Congress of Endocrinology*, June 12-15, 1996, San Francisco, Abstract P1-387.
 Lamar C. A., Mahesh V. B., Brann D. W., *Endocrinology*, 1997, 137, 790.
 Maines M. D., *Heme oxygenase in clinical applications and functions*, 1992, CRC Press, Boca Raton, Florida.
 Maines M. D., *Mol. Cell. Neurosci.*, 1993, 4, 389.
 Maines M. D., Eke B. C., Weber C. M., Ewing J. F., *J. Neurochem.*, 1995, 64, 1769.
 Maines M. D., Trakshel G. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1131, 166.
 Mancuso C., Kostoglou-Athanassiou L., Forsling M. *et al.*, *Mol. Brain Res.*, 1997, 50, 267.
 Marks G., Brien J., Nakatsu K., McLaughlin B., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, 12, 185.
 Matz P., Turner C., Weinstein P. R. *et al.*, *Brain Res.*, 1996, 713, 211.
 McCoubrey W. K. Jr., Maines M. D., *Gene*, 1994, 139, 155.
 McFwen B. S., *Prog. Brain Res.*, 1992, 931, 365.
 Meffert M. K., Haley J. E., Schuman E. H. *et al.*, *Neuron*, 1994, 13, 1225.
 Nathanson J. A., Scavone C., Scanlon C., McKee M., *Neuron*, 1995, 14, 781.
 Parkes D., Kasekow J., Vale W., *Brain Res.*, 1994, 646, 315.
 Poss K. D., Thomas M. J., Ebrahizre A. K. *et al.*, *Neuron*, 1995, 15, 867.
 Pozzoli G., Mancuso C., Mirtella A. *et al.*, *Endocrinology*, 1994, 135, 2314.
 Prabhakar N. R., Dinerman J. L., Agani F. H., Snyder S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 1994.
 Premkumar D. R. D., Smith M. A., Richey P. L. *et al.*, *J. Neurochem.*, 1995, 65, 1399.
 Rattan S., Chakder S., *Am. J. Physiol.*, 1993, 265, G799.
 Shibahara S. ed., *Regulation of Heme Protein Synthesis*, 1994, Alpha Med Press, Medina, Ohio, p. 103.
 Skipper H. M., Cisse S., Stopa E. G., *Ann. Neurol.*, 1995, 37, 758.
 Stevens C. F., Wang Y., *Nature*, 1993, 364, 147.
 Takahashi K., Hara E., Suzuki H. *et al.*, *J. Neurochem.*, 1996, 67, 482.
 Takeda A., Onodera H., Sugimoto A. *et al.*, *Brain Res.*, 1994, 666, 120.

- Verma A., Hirsch D., Glatt C. et al., *Science*, 1993, 259, 381.
 Wilks A., Ortiz de Montellano P. R., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 22362.
 Zhuo M., Small S., Kandel E. A., Hawkins R. D., *Science*, 1993, 260, 1946.

PAOLO PREZIOSI

MORTE [v. vol. IX, coll. 1973-1985]

MORTE CLINICA (v. vol. IX, coll. 1978-1985)

SOMMARIO

Introduzione (col. 3805). - **Morte cerebrale nell'adulto** (col. 3805): *Premessa e definizione. - Provvedimenti legislativi sull'accertamento dello stato di morte ai fini di trapianto. - Indagini diagnostiche nella morte cerebrale dell'adulto. - Morte cerebrale nel neonato e nel bambino* (col. 3809): *Definizione e provvedimenti legislativi. - Principali indagini diagnostiche nella morte cerebrale nel bambino. - Considerazioni conclusive.*

Introduzione

Per una definizione e trattazione generale della morte clinica ai fini di trapianto, si rinvia alla voce **CADAVERE****. In questa sede dedicheremo un ampio spazio, sempre ai fini di trapianto, all'accertamento della *morte cerebrale nell'adulto* e della *morte cerebrale nel neonato e nel bambino*. In questo secondo caso l'accertamento deve essere particolarmente accurato in quanto si deve tenere conto del particolare profilo anatomico-funzionale di questi piccoli pazienti.

Morte cerebrale nell'adulto

Premessa e definizione

La condizione di *morte cerebrale*, più correttamente intesa come *morte encefalica*, viene concordemente identificata con la totale e irreversibile perdita delle funzioni cerebrali conseguente alla completa cessazione dell'afflusso di ossigeno a livello delle strutture sia sopra- che sottotentoriali.

Il denominatore comune dei diversi fattori che concorrono a determinare tale condizione è rappresentato dalla totale interruzione del flusso ematico cerebrale e dai successivi danni perfusionali derivanti agli emisferi e alle strutture troncoencefaliche dall'abolizione del flusso ematico stesso.

Le cause responsabili dell'insorgere di tali meccanismi sono da identificare nella rapida evoluzione di gravi patologie che determinano marcate e protratte cadute dei valori pressori arteriosi, o nei repentini aumenti della pressione intracranica susseguenti a danni emorragici cerebrali, a processi espansivi di natura neoplastica, a traumi cranioencefalici, a complesse malattie dismetaboliche.

Grande importanza riveste, sotto il profilo diagnostico, l'approfondimento dei criteri valutativi sia etiologici che anatomofunzionali.

I primi riguardano la possibilità di escludere o di confermare l'eventuale presenza di forme di intossicazione esogena, i secondi si riferiscono, invece, alla verifica e all'accertamento dei danni subiti dalle strutture encefaliche in seguito all'avvenuto arresto del circolo cerebrale (le condizioni che più frequentemente possono verificarsi riguardano i pazienti con indizi etiologici insufficienti o del tutto assenti, oppure i bambini di età inferiore all'anno di vita [v. sotto] a causa della carenza di concreti elementi di studio che consentano, in essi, una corretta valutazione clinica).

Ferma restando la validità e la fondatezza di quelli che sono da considerare concetti diagnostici basilari, e cioè: che la causa dell'evento che ha provocato lo stato di incoscienza (*coma*) deve essere conclamata, che la gravità delle

lesioni verificatesi deve essere sufficiente a determinare la condizione di morte dell'encefalo, che non debbono sussistere dubbi circa l'irreversibilità del danno subito dalle strutture encefaliche e troncoencefaliche, è importante ricordare come la *m. cerebrale*, susseguente all'arresto della funzione cardiocircolatoria, sia un evento che si manifesta in tempi diversi e in maniera graduale nelle singole strutture del cervello, interessando dapprima le attività corticali e cerebellari per estendersi, successivamente, alle aree filogeneticamente meno recenti come quelle rappresentate dal centro del respiro che può continuare a funzionare anche in presenza di una grave compromissione della attività corticale.

Sia la definizione di *m. cardiaca*, condizione caratterizzata dalla scomparsa dei battiti e della attività miocardica con tracciato ECG isoelettrico (v. **MORTE, morte cardiaca**, IX, 1978-1980), che la definizione di *m. cerebrale*, documentata da EEG piatto e dalla totale e irrimediabile compromissione delle funzioni cerebrali e troncoencefaliche, intendono esprimere, in pratica, il medesimo concetto di *m.*, quello della completa e non più recuperabile perdita da parte dell'organismo della capacità di mantenere intatta la propria autonoma unità funzionale.

Queste considerazioni, che vanno necessariamente estese alle problematiche relative alla non sempre agevole definizione dei confini che separano la *m. clinica* dalla *m. biologica*, investono in maniera diretta anche il campo del *prelievo e del trapianto di organi*.

Ed è proprio sotto tale ultimo aspetto che si rende necessario il riferimento a norme che disciplinino le procedure di accertamento della morte affinché le stesse prescindano dai destini del cadavere (v.**) e vengano comunque mantenute rigorosamente distinte da quelle che contemplano l'autorizzazione all'espanto.

Le possibilità di studio offerte oggi dalla moderna tecnologia e i profondi contenuti scientifici, etici e morali che sono alla base dell'insieme delle procedure utilizzate per giungere a conclusioni diagnostiche esenti da errore meriterebbero, forse, una maggiore divulgazione presso la pubblica opinione al fine di allontanare da essa residui e comprensibili motivi di dubbio e di diffidenza.

È questo un problema di natura culturale che non riguarda in maniera esclusiva il nostro paese ma che affonda le sue radici in campo internazionale a causa delle difformità legislative e dei diversi orientamenti diagnostici sul concetto di *m.* vigenti nelle singole nazioni.

La confusione determinatasi a tale livello e le polemiche suscitate dalla non univoca accettazione dei criteri clinici e tecnico-strumentali utilizzati ai fini diagnostici derivano in gran parte proprio dalla diversa interpretazione data dalle legislazioni dei vari paesi all'evento terminale della vita e ai fenomeni degenerativi connessi all'evento stesso (*m. cardiaca*, *m. corticale*, *m. cerebrale*, *m. troncoencefalica*, *m. clinica*, *m. biologica*).

Provvedimenti legislativi sull'accertamento dello stato di morte ai fini di trapianto

Con il varo di recenti provvedimenti legislativi (legge n. 578 promulgata il 29 dicembre 1993 e successivo decreto del Ministero della Sanità n. 582 del 22 agosto 1994) lo Stato italiano ha provveduto a colmare, in gran parte, le lacune normative ancora esistenti in materia di accertamento e certificazione della *m.*

I passi più importanti e significativi della su citata legge e del relativo decreto ministeriale possono venire così riassunti:

a) La *m. cerebrale* si identifica con la cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo.

b) La *m. per arresto cardiaco* si intende avvenuta quando la respirazione e la circolazione sono cessate per un intervallo di tempo tale da comportare la perdita irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo e può essere accertata con le modalità definite con decreto emanato dal Ministro della Sanità (appresso riportate).

c) Nei pazienti affetti da lesioni encefaliche, sottoposti a misure rianimative, la *m.* può sopravvenire per il verificarsi delle condizioni precedentemente citate (stato di incoscienza, assenza dei riflessi del tronco e di respiro autonomo, silenzio elettrico cerebrale).

d) L'iter diagnostico-terapeutico, finalizzato anche alla certezza della diagnosi etiopatogenetica, deve prevedere, nelle sottoelencate situazioni particolari, l'esecuzione di ulteriori indagini complementari atte ad evidenziare l'esistenza del flusso ematico cerebrale. Tali situazioni sono rappresentate: dai bambini di età inferiore a un anno, dalla presenza di fattori concomitanti quali l'azione di farmaci depressivi del S.N.C., l'ipotermia, le alterazioni endocrino-metaboliche, l'ipotensione sistemica di grado tale da interferire sul quadro clinico complessivo (in alternativa al rilievo del flusso ematico cerebrale, lo studio può essere procrastinato fino alla avvenuta normalizzazione delle situazioni predette), ed, infine, dai casi che non consentono una diagnosi etiopatogenetica certa o che impediscono l'esecuzione dei riflessi del tronco o dell'EEG.

e) Nei pazienti affetti da lesioni encefaliche, sottoposti a misure rianimative (esclusi i casi particolari), la morte è accertata quando si riscontra, durante il periodo di osservazione, la contemporanea presenza delle seguenti condizioni:

- Stato di incoscienza.
- Assenza di riflesso corneale, riflesso fotomotore, riflesso oculocefalico e oculovestibolare, assenza di reazioni a stimoli dolorifici portati sul territorio di innervazione del trigemino, assenza di riflesso carenale e di respirazione spontanea dopo sospensione della ventilazione artificiale fino al raggiungimento di ipercapnia accertata da 60 mmHg con pH ematico minore di 7,40.
- Silenzio elettrico cerebrale (*EEG piatto*) documentato con tracciato eseguito secondo le norme precisate nell'allegato n. 1 del decreto (utilizzazione di almeno 8 elettrodi posti simmetricamente sullo scalpo, presenza di silenzio elettrico cerebrale definito come «assenza di attività elettrica di origine cerebrale spontanea e provocata, di ampiezza superiore a 2 microvolts su qualsiasi regione del capo per una durata continuativa di 30 minuti»).
- Le registrazioni vanno effettuate su carta al momento della determinazione della condizione di cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo e ripetute a metà e alla fine del periodo di osservazione.

Assenza di flusso ematico cerebrale, preventivamente documentata, nelle «situazioni particolari».

f) I riflessi spinali, spontanei o provocati, non hanno rilevanza alcuna ai fini dell'accertamento della *m.* essendo essi compatibili con la condizione di cessazione irreversibile di tutte le funzioni encefaliche.

g) Nel neonato, l'accertamento della morte può essere eseguito soltanto se la nascita è avvenuta dopo la 38ª settimana di gestazione e comunque solo dopo il compimento della prima settimana di vita extrauterina.

h) L'articolo n. 4 del decreto precisa che la durata della osservazione, ai fini dell'accertamento della *m.*, deve essere non inferiore a: 6 ore per gli adulti e per i bambini di età superiore a cinque anni, a 12 ore per i bambini di età compresa tra 1 e 5 anni, a 24 ore per i bambini di età inferiore a un anno.

i) In tutti i casi di danno cerebrale anossico il periodo di osservazione non può iniziare prima che siano trascorse 24 ore dal momento del verificarsi dell'insulto anossico stesso.

La simultaneità di tutte le condizioni previste dalla legge e dal successivo decreto ministeriale deve essere rilevata dal collegio medico almeno tre volte (all'inizio, a metà e alla fine del periodo di osservazione), mentre la verifica di assenza di flusso ematico non va ripetuta.

l) L'accertamento della morte nei pazienti affetti da lesioni encefaliche, in trattamento rianimativo, è effettuato da un collegio medico nominato dalla direzione sanitaria dell'Istituto ospedaliero o universitario di pertinenza ed è composto da un medico legale o, in sua assenza, da un medico della direzione sanitaria o da un anatomopatologo, da un medico specialista in anestesia e rianimazione e da un medico neurofisiologo o, in sua mancanza, da un neurologo o da un neurochirurgo esperti in elettroencefalografia. I componenti del collegio medico debbono essere dipendenti di Istituti sanitari pubblici.

Indagini diagnostiche nella morte cerebrale dell'adulto

Un corretto procedimento diagnostico deve basarsi, oltre che sui rilievi clinici e sulle risultanze dell'esame EEG, sulla possibilità di eseguire indagini tecnico-strumentali, eventualmente tra loro associate, da riservare, in particolar modo, a quadri clinici notevolmente complessi.

1. *Studio EEG.* — Come è stato già osservato, l'esame EEG, indagine essenziale ai fini della documentazione della cessazione irreversibile di tutte le funzioni dell'encefalo (silenzio elettrico cerebrale), va eseguito secondo le norme precisate nell'allegato n. 1 del decreto, con registrazioni effettuate su carta e ripetute a metà e alla fine del periodo di osservazione.

Se la validità del tracciato è da ritenere indiscutibile nel paziente adulto, maggiore prudenza richiede la sua interpretazione in età pediatrica e neonatale a causa delle peculiari caratteristiche anatomofunzionali del bambino di età inferiore all'anno di vita (v. sotto: *morte cerebrale nel neonato e nel bambino*).

2. *Valutazione del flusso ematico cerebrale.* — Per ciò che concerne la possibilità di impiego di sistemi in grado di documentare l'eventuale assenza di flusso ematico cerebrale è da osservare che, mentre la *tomografia ad emissione di singoli fotoni* (SPECT) consente uno studio globale del flusso ematico a livello delle strutture sia cerebrali che troncoencefaliche così come la *tomografia ad emissione di positroni* (PET) che, oltre a possedere tali caratteristiche, permette anche di accertare il grado di perfusione dell'encefalo e di valutare quantitativamente sia l'entità del flusso che il metabolismo cerebrale, l'*angioscintigrafia dei vasi cerebrali*, essendo uno studio circoscritto al solo territorio delle arterie cerebrali media e anteriore, consente una buona valutazione del flusso ematico soltanto a livello sopratentoriale (Lynn, 1983).

3. *Studio dei potenziali evocati.* — Lo studio dei potenziali evocati (visivi, uditivi, somatosensoriali) costituisce una ulteriore possibilità di indagine da inserire nel contesto dei singoli test utilizzati ai fini diagnostici per la valutazione della funzionalità del S.N.C. anche nei pazienti nei quali non sia attuabile un esame neurologico tradizionale (stato di coma, effetto di farmaci ad azione miorisolutiva o sedativa) (Rossini, 1983).

Soprattutto la registrazione di quelli somatosensoriali è da considerare di particolare rilevanza durante le fasi della osservazione, sia perché in grado di fornire utili indicazioni sulle reali condizioni anatomofunzionali delle strutture corticali e troncoencefaliche, sia perché permette di aggiungere ulteriori e validi elementi alla diagnosi di *m. cerebrale* o di smentire la diagnosi stessa in presenza di intossicazioni di origine esogena.

4. *Monitoraggio della temperatura corporea.* - Una considerazione a parte merita il monitoraggio della temperatura corporea, controllo da ritenere indispensabile e di particolare utilità sia nel paziente adulto che nel bambino per il significato che assume, nei pazienti in trattamento rianimativo, il progressivo decrescere della temperatura verso valori sensibilmente inferiori a quelli fisiologici, evento da ritenere sempre e comunque un chiaro segno premonitore di possibili incipienti danni parenchimali a livello cerebrale.

5. *Studio della trasmissione neuromuscolare.* - Anche lo studio della trasmissione neuromuscolare, per quanto non frequentemente eseguito e spesso trascurato, può rivelarsi di grande efficacia ai fini diagnostici in quanto in grado di escludere o di confermare, in casi particolarmente complessi, la presenza di blocchi indotti da farmaci ad azione miorisolutiva.

6. *Monitoraggio della pressione intracranica.* - Più delicata e non esente da rischi va invece considerata l'utilizzazione di tecniche di tipo invasivo impiegate, in taluni pazienti, per il rilievo dei valori pressori endocranici.

L'adozione di tali tecniche, da considerare peraltro di notevole ausilio nel controllo dei disturbi neurologici provocati dal progressivo aumento della pressione intracranica (fino alla comparsa di danni cerebrali definitivi), può difatti rendersi responsabile dell'insorgere di gravi complicanze, le più temibili delle quali sono rappresentate dalla puntura accidentale del cervello, dalle infezioni, da danni emorragici, da difficoltà tecniche, dalla impossibilità di reperire il ventricolo in caso di edema cerebrale imponente (Laviani *et al.*, 1990).

Queste potenzialità lesive debbono far attentamente riflettere, quindi, prima di decidere l'eventuale utilizzazione della tecnica da riservare, comunque, a casi particolari e a pazienti le cui condizioni cliniche ne consentano l'impiego.

Se il monitoraggio cruento può esporre il paziente ai rischi descritti, quello incruento, di possibile esecuzione soltanto nel bambino di età inferiore ai 6 mesi, ne è del tutto esente (v. sotto *morte cerebrale nel neonato e nel bambino*).

Morte cerebrale nel neonato e nel bambino

Definizione e provvedimenti legislativi

Soltanto in epoca recente la legislazione italiana ha provveduto a definire, con la promulgazione di adeguate norme di legge (v. sopra: *morte cerebrale nell'adulto*), i criteri e le procedure da seguire per l'accertamento della m. nel neonato e nel bambino, soprattutto se di età inferiore all'anno di vita.

Tali norme, oltre a contemplare in maniera esauriente le diverse realtà costituite dai piccoli pazienti rispetto all'individuo adulto (sotto il profilo anatomofunzionale), sanciscono le modifiche apportate alla durata del periodo di osservazione e, con esse, quelle relative alla più ampia facoltà di studio e di indagine concessa alle commissioni mediche preposte all'accertamento della condizione di m.

Per ciò che concerne gli aspetti di maggior interesse, clinico e operativo, contenuti nella vigente regolamentazione, si rimanda a quanto esposto nel precedente capitolo (v. sopra *morte cerebrale nell'adulto*).

In questa sede ricordiamo alcuni specifici elementi concernenti l'accertamento della m. cerebrale nel neonato e nel bambino:

a) nel neonato, l'accertamento della morte può essere eseguito solo se la nascita è avvenuta dopo la 38^a settimana di gestazione e comunque non prima di una settimana di vita extrauterina;

b) la durata della osservazione, ai fini dell'accertamento della m., non deve essere inferiore a 6 ore per i bambini di

età superiore ai 5 anni, a 12 ore per i bambini di età compresa tra 1 e 5 anni, a 24 ore nei bambini di età inferiore a 1 anno.

La ratifica di questi provvedimenti è venuta oggi ad arricchire di nuove e preziose opportunità di studio il campo delle procedure diagnostiche riservate a pazienti di così piccola età.

Bisogna difatti considerare che, nel neonato e nel bambino che non abbia ancora compiuto il 12^o mese di vita, le maggiori difficoltà, ai fini diagnostici, sono rappresentate e dalla ridotta disponibilità di elementi valutativi del coma e dalla scarsa affidabilità dei risultati forniti da talune delle più comuni indagini tecnico-strumentali utilizzate invece abitualmente nel paziente adulto.

A svolgere un ruolo determinante in tal senso concorrono e intervengono le seguenti condizioni:

1) Lo stato di immaturità anatomofunzionale che caratterizza le strutture del S.N.C. nei primi mesi di vita e la maggiore resistenza denotata dal parenchima cerebrale all'insulto anossico-ischemico (nel neonato e nel lattante è possibile osservare un pieno recupero delle funzioni nervose anche dopo prolungati periodi di ipossia).

2) La scelta di idonei criteri di valutazione clinica e l'impiego di adeguati sistemi di indagine strumentale che, in particolar modo nel nato pretermine, non potranno mai prescindere dal grado di sviluppo raggiunto dalle singole strutture nervose e, quindi, dall'età gestazionale (si tenga presente che il tono muscolare e i riflessi del troncocefalo cominciano a manifestarsi soltanto tra la 28^a e la 36^a settimana di vita intrauterina).

3) Le difficoltà di esecuzione del tracciato EEG e quelle connesse ad una sua corretta interpretazione in bambini di età compresa tra 0 e 12 mesi a causa dell'incompleto sviluppo raggiunto dalle strutture nervose e per motivi attinenti al non agevole o insufficiente posizionamento degli elettrodi, operazione sempre fortemente condizionata dalle ridotte dimensioni del cranio (in tale epoca della vita un tracciato isoelettrico prolungato potrebbe non presentare i necessari requisiti di attendibilità).

4) La pratica impossibilità di verificare condizioni di respiro autonomo nel neonato «critico» e in quello pretermine per problemi di svezamento dal ventilatore meccanico.

5) La non facile valutazione, nel primo semestre di vita, dello stato di sofferenza del cervello (in caso di edema) e della regolarità del flusso ematico cerebrale a causa delle possibili interferenze esercitate dalla parziale cedevolezza della scatola cranica, condizione che potrebbe mascherare, in taluni casi, gli effetti svolti dalla aumentata pressione endocranica sulla perfusione cerebrale.

6) I diversi tempi che intercorrono, rispetto a quanto si verifica nel paziente adulto, tra l'accertamento della m. cerebrale e l'arresto della funzione cardiocircolatoria. Questi tempi sono, nel bambino, notevolmente più lunghi e corrispondono, mediamente, alle 2-3 settimane (Aschwal e Schneider, 1987).

7) La difficoltosa verifica del *test dell'apnea*, esame di complessa esecuzione e quindi non correttamente valutabile, soprattutto nei bambini più piccoli, non essendo stata ancora individuata la soglia apnoica critica da rapportare alle singole fasce dell'età pediatrica. A causa di tali difficoltà, il valore da attribuire al test dovrebbe essere necessariamente simile e comunque non inferiore a quello ritenuto valido nel paziente adulto (assenza del riflesso carotideo e di respirazione spontanea dopo sospensione della ventilazione artificiale fino al raggiungimento di una ipercapnia accertata di 60 mmHg con pH ematico inferiore a 7,40) escludendo, ovviamente, eventuali interferenze esercitate da particolari condizioni come l'ipotermia o l'effetto di farmaci ad azione neuroprotettiva (farmaci peraltro di largo impiego in rianimazione pediatrica e neonatale) (Outwater e Rockoff, 1987).

8) Nel neonato, soprattutto se pretermine, l'ipotermia, deprimendo l'attività del S.N.C., può simulare quadri di m. cerebrale.

Una delle più frequenti e insidiose cause di perdita di calore in questi piccoli pazienti deve essere considerata l'inadeguato o difettoso funzionamento dei tradizionali sistemi di regolazione automatica della temperatura di cui sono fornite le termocucine. Quando si verificano tali condizioni, una non corretta interpretazione della depressa o assente attività elettrica del cervello, potrebbe facilmente indurre in errori diagnostici.

9) A differenza di quel che avviene nel paziente adulto, è del tutto raro che, nel neonato e nel lattante, la condizione di *m. cerebrale* venga a realizzarsi attraverso il meccanismo del tamponamento del circolo cerebrale (conseguente al progressivo aumento della pressione intracranica). Qualora tale meccanismo venga egualmente a compiersi, alterando gravemente la pressione di perfusione degli emisferi fino ad arrestarla, la lassità delle suture ossee non ancora consolidate e la parziale cedevolezza della scatola cranica possono concorrere, come è stato già osservato, a mitigarne notevolmente gli effetti (nel neonato il silenzio elettrico cerebrale potrebbe essere compatibile con un flusso ematico depresso ma ancora sufficientemente conservato).

10) La compromissione funzionale del tronco non deve essere necessariamente considerata, nei primi mesi di vita, secondaria al danno subito dagli emisferi cerebrali (la cui integrità risulta essere, peraltro, sempre di difficile valutazione), così come non sarebbe corretto limitare, in particolar modo nel nato pretermine, lo studio del S.N.C. alla sola reattività di questa struttura (il cui grado di sviluppo e di maturazione è sempre strettamente correlato all'età gestazionale).

11) Allo stato attuale non è possibile disporre di sistemi di indagine tecnico-strumentale né di elementi di valutazione clinica in grado di consentire accertamenti diagnostici attendibili sia nel neonato pretermine che in quello a termine nei primi giorni di vita extrauterina. Questi pazienti vanno pertanto prudenzialmente esclusi da qualsiasi tipo di procedura diagnostica in quanto sarebbe estremamente difficile, se non del tutto impossibile, dimostrare in essi l'esistenza di lesioni strutturali encefaliche, sia ecograficamente sia attraverso l'esame tomografico (Comitato Nazionale Bioetica, 1991).

Principali indagini diagnostiche nella morte cerebrale nel bambino

Sulla base delle considerazioni sopra esposte appare quindi evidente come la messa a punto di corretti protocolli diagnostici non possa prescindere, nel paziente in età pediatrica, dalla disponibilità di sistemi di studio mirati alla valutazione del flusso ematico cerebrale, nonché di altri integranti quelli abitualmente utilizzati.

L'angioscintigrafia cerebrale, la flussimetria doppler ad onda continua, la flussimetria doppler intracranica, la tomografia computerizzata ad emissione di singoli fotoni e quella ad emissione di positroni, pur con le difficoltà tecniche che ciascuna metodica può comportare, sono da ritenere, al momento, le indagini dotate del maggior indice di affidabilità e le sole in grado di fornire elementi di certezza circa l'estensione e l'irreversibilità delle lesioni stabilitesi a livello encefalico.

Su tali linee si è espresso anche il comitato nazionale per la bioetica che, nell'elaborare il documento finale sulla «definizione e l'accertamento della morte nell'uomo» (15 febbraio 1991), ha affrontato, per la prima volta e in maniera concreta, le problematiche relative alla peculiare condizione anatomofunzionale del neonato e del bambino (Comitato Nazionale Bioetica, 1991).

Se si considera l'incompleto sviluppo raggiunto dal S.N.C. alla nascita, è ancor più facile rendersi conto di come le maggiori difficoltà diagnostiche riguardino proprio il neonato non consentendo, lo stato di immaturità delle strutture centrali, una corretta valutazione del grado di sofferenza del cervello prima che siano trascorsi almeno 8-10 giorni dall'insorgere dell'evento lesivo.

Pur ribadendo la validità di tali concetti, assolutamente da non sottovalutare, è da ritenere che lo studio del flusso ematico cerebrale rappresenti l'indagine più utile e spesso determinante per il riconoscimento e la valutazione di numerose patologie neurologiche, tipiche delle prime settimane di vita, soprattutto alla luce della deficitaria efficienza dei meccanismi di autoregolazione del flusso ematico stesso, condizione che rende i neonati in genere, e quelli asfittici e pretermine in particolare, più che mai espo-

sti al rischio di lesioni encefaliche di tipo sia emorragico che ischemico.

1. *Angioscintigrafia cerebrale.* - Considerando l'invasività della metodica e i non trascurabili rischi che l'angiografia tradizionale può comportare ai piccoli pazienti, vengono oggi preferiti più sicuri sistemi di indagine per la valutazione del flusso ematico cerebrale nel contesto delle procedure espletate per l'accertamento della condizione di *m.*

La metodica attualmente più utilizzata è quella angioscintigrafica basata sull'impiego di traccianti marcati (^{99m}Tc) in grado di superare la barriera ematoencefalica e di fissarsi ai neuroni per un margine di tempo compreso tra le 4 e le 6 h.

L'esecuzione di questo tipo di esame può oggi avvalersi dell'eventuale impiego di apparecchiature portatili da utilizzare negli stessi box di degenza al fine di non esporre i piccoli pazienti al rischio di ulteriori danni durante le manovre di trasporto (Goodman *et al.*, 1985).

Come abbiamo già ricordato, i principali limiti dell'indagine sono rappresentati dal fatto che lo studio, rimanendo circoscritto al solo territorio delle arterie cerebrali media e anteriore, consente una buona valutazione del flusso ematico prevalentemente a livello sopratentoriale e una valutazione soltanto parziale delle strutture sottotentoriali (esclusione del tronco) (Lynn, 1983).

L'assenza di flusso ematico, documentata scintigraficamente, e la contemporanea presenza di silenzio elettrico cerebrale (EEG piatto) sono da ritenere, secondo alcuni AA. (Drake *et al.*, 1986), elementi sufficienti e decisivi per avallare la diagnosi di *m. cerebrale* nel bambino.

2. *Doppler dei vasi cerebrali per via transcranica.* - Può essere considerato, nel contesto delle varie indagini utilizzate nel bambino, un ulteriore elemento di conferma alla diagnosi clinica ed elettrofisiologica di *m. cerebrale*. L'esame consente di individuare, in caso di aumento irreversibile della pressione endocranica, l'eventuale completa cessazione del flusso ematico nel distretto cerebrale.

Uno dei rilievi mossi alla metodica è quello di non poter essere considerata, in assoluto, un mezzo di indagine determinante ai fini diagnostici in quanto difficilmente riproducibile, talvolta, nello stesso paziente ed essendo, i segnali ultrasonografici, soggetti a interpretazioni spesso tra loro difformi.

Una ulteriore possibilità di studio è rappresentata, nei bambini di età inferiore ai 6 mesi (con fontanella anteriore ancora non saldata), dall'ecodoppler transfontanellare, metodica che consente di indagare, abbastanza attendibilmente, l'entità e la velocità del flusso ematico cerebrale, nonostante le critiche mosse al suo impiego in particolari situazioni cliniche. Si ritiene, infatti, che la parziale cedevolezza della scatola cranica possa incidere negativamente, in presenza di edema degli emisferi, sulla attendibilità dei risultati conseguiti.

Secondo Mc Menamin e Volpe (1983), l'avvenuta cessazione del flusso ematico cerebrale, accertata mediante l'impiego di metodiche di questo tipo, consente di formulare, come nel caso dell'esame angioscintigrafico, diagnosi di *m. cerebrale* purché siano contemporaneamente presenti segni clinici ed EEG di irreversibilità delle lesioni neurologiche istauratesi (*tracciato EEG isoelettrico*).

3. *Tomografia ad emissione di singoli fotoni (SPECT) e tomografia ad emissione di positroni (PET).* - Entrambe le tecniche rendono possibile uno studio globale del flusso ematico a livello sia cerebrale che troncoencefalico (v. sopra: *Morte cerebrale nell'adulto*).

Esse sono da considerare, allo stato attuale, i sistemi di indagine più attendibili e utili per uno studio approfondito della perfusione dell'encefalo. Il loro impiego, oltre a presentare il vantaggio della non invasività, risulta essere

ben tollerato anche dai pazienti di età inferiore ai 6 mesi di vita.

Purtroppo sia la SPECT che la PET, metodiche caratterizzate da un alto costo di esercizio, non sono ancora sufficientemente diffuse e disponibili nel nostro Paese.

4. Esame elettroencefalografico (EEG). – A prescindere dalla difficile interpretazione del tracciato nei bambini più piccoli, l'esame può conservare inalterata tutta la sua validità se inserito nel contesto di altri elementi valutativi, sia clinici che strumentali.

La sua esecuzione è da ritenere particolarmente indicata, così come la sua ripetizione, soprattutto nei casi in cui il tracciato iniziale abbia evidenziato chiari segni di una pseudoattività elettrica.

Maggiore prudenza richiede invece l'interpretazione dell'esame in epoca neonatale. Nei pazienti rientranti in questa fascia di età, numerosi fattori possono infatti influenzare negativamente la validità del tracciato: la scarsa ampiezza della attività cerebrale, la presenza di artefatti da correlare alla elevata frequenza cardiaca e alla elevata frequenza respiratoria (condizioni peculiari dell'età neonatale), il difficoltoso e non sempre corretto posizionamento degli elettrodi a causa delle ridotte dimensioni del cranio (questi possono risultare o troppo ravvicinati tra loro o numericamente insufficienti).

A questo proposito è interessante riportare il giudizio espresso dall'«American EEG Society» nel 1986. Essa consiglia, per il neonato, il posizionamento sullo scalpo di almeno 11 elettrodi adattandone la distanza alle dimensioni dello scalpo stesso, nonché l'esecuzione di almeno due tracciati, intervallati da 24 ore e della durata di 30 minuti.

5. Studio dei potenziali evocati. – Lo studio, che è basato sulla possibilità di registrare l'attività elettrica generata da una popolazione di neuroni in risposta a stimoli portati su determinati sistemi sensoriali, contempla tre tipi di potenziali: quello visivo (VEP), quello uditivo del tronco (ABR), quello somatosensoriale (SEP) (Giron *et al.*, 1985; Pittoni *et al.*, 1987).

L'esame offre la possibilità di eseguire una attendibile valutazione della funzionalità del S.N.C. nei pazienti in stato di coma (per etiologie diverse) e in tutti quelli le cui condizioni cliniche non consentano l'esecuzione di uno studio neurologico classico (Rossini, 1983).

Più realisticamente è però da osservare che la registrazione dei potenziali evocati, e in particolare di quelli somatosensoriali, oltre ad essere scarsamente attendibile per le note condizioni di immaturità anatomofunzionale del S.N.C. alla nascita, è tuttora suffragata da una insufficiente esperienza clinica, qualitativa e quantitativa, sia nel neonato che nel lattante (Dear e Godfrey, 1985; Goodwin *et al.*, 1991).

Ne consegue che questo tipo di indagine, per poter essere ritenuto utile ai fini diagnostici, deve necessariamente tener conto del grado di sviluppo raggiunto dalle strutture troncoencefaliche. Esso può pertanto trovare applicazione e fornire risultati affidabili soltanto nei bambini che abbiano superato il 4°-6° mese di vita.

L'unica eccezione è rappresentata, in epoca neonatale, dalla particolare condizione anatomofunzionale dei neonati anencefali. In questi pazienti, soprattutto in quelli affetti dalle varietà cliniche più gravi della complessa malformazione (completa assenza degli emisferi cerebrali), sarebbe difatti del tutto improponibile e inattuabile un accurato studio EEG.

6. Monitoraggio della temperatura corporea. – Il controllo della temperatura corporea nei bambini di più basso peso e di più piccola età è da ritenere una delle misure indispensabili e di maggiore utilità tra quelle da attuare nei centri intensivi neonatali.

L'esperienza clinica ha difatti ampiamente dimostrato che il progressivo decrescere della temperatura verso valori

inferiori a quelli fisiologici (36,5 °C) debba essere sempre interpretato, in questi piccoli pazienti, come un chiaro segno premonitore di incipiente danno cerebrale.

Quando un tale evento si verifica, il tracciato EEG comincia ad evidenziare i primi segni di sofferenza e a denunciare le prime gravi alterazioni già a partire da valori inferiori ai 34-35 °C per divenire manifestamente isoelettrico (EEG piatto), successivamente, con l'ulteriore decrescere della temperatura (in questi casi è richiesta molta prudenza nella valutazione del tracciato).

7. Studio della trasmissione neuromuscolare. – Il monitoraggio della trasmissione neuromuscolare mediante l'impiego di generatori elettrici in grado di provocare stimoli sovramassimali ad un nervo motorio è da ritenere uno dei metodi più efficaci per escludere o confermare la presenza di blocchi indotti da farmaci ad azione miorisolutiva.

Lo studio consiste nel rilievo di eventuali alterazioni interessanti la trasmissione dello stimolo ed anche nella possibilità di documentare in termini di certezza, la condizione di blocco in caso di curarizzazione persistente. Quando vengono somministrati farmaci di questo tipo, le onde descritte dai potenziali d'azione tendono inizialmente a ridurre la loro escursione in altezza per determinare, in una fase successiva, un appiattimento del tracciato con la loro scomparsa (Gasparetto e Fierro, 1987; Wylie *et al.*, 1982).

8. Monitoraggio in cruento della pressione endocranica. – L'impiego di sistemi di tipo non invasivo per il controllo dei valori pressori endocranici in pazienti con fontanella anteriore ancora aperta (primi 4-6 mesi di vita), può rappresentare una ulteriore possibilità di studio, particolarmente utile e indicata ai fini sia diagnostici che terapeutici.

I disturbi neurologici provocati dalla ipertensione endocranica, fino alla comparsa di danni cerebrali irreversibili, possono manifestarsi, in questa epoca della vita, attraverso l'innescarsi di un duplice meccanismo: *a)* riduzione della perfusione cerebrale con conseguente danno ischemico, *b)* dislocazione delle strutture nervose endocraniche con ripercussioni generali di grado elevato.

Le cause che più frequentemente incidono sull'aumento dei valori pressori sono da identificare negli episodi emorragici endoventricolari, nell'idrocefalo postemorragico, nelle asfissie perinatali e neonatali, nella evoluzione di malattie dismetaboliche come la sindrome di Reye, o di altre patologie acute come le meningiti batteriche.

A differenza di quel che può verificarsi con l'adozione di tecniche invasive, tecniche nelle quali l'insorgere di complicanze è un evento da dover sempre temere e prevedere, la tecnica incruenta, applicabile nel neonato e nel lattante, non comporta rischi di alcun genere.

Essa prevede, difatti, il solo posizionamento cutaneo di un sensore in corrispondenza della fontanella anteriore con possibilità di realizzare, in maniera estremamente facile, un monitoraggio continuo, grafico e visivo, dei valori pressori ricavati.

Il sensore attualmente più utilizzato, preferito ad altri quali il trasduttore di appianazione o il tonometro, è quello che sfrutta il principio della rifrazione dell'impulso luminoso da una membrana in equilibrio pressorio pneumatico. Con il suo impiego, oltre a poter ottenere valori attendibili sulle condizioni pressorie e sullo stato di sofferenza del cervello per periodi di tempo equivalenti a 4 ore consecutive, è possibile realizzare un confronto continuo di più indici vitali, tramite il collegamento dell'elettrodo sensore a monitor plurimodulari (Hill e Volpe, 1981; Laviani *et al.*, 1990).

Considerazioni conclusive

Per ciò che concerne la validità di taluni dei test strumentali fin qui considerati, riteniamo necessario porre ancora una volta l'accento sulla prudenza che richiede l'interpretazione del tracciato elettroencefalografico nel neonato e nel bam-

bino di età inferiore all'anno di vita. Tale indagine, per quanto in grado di fornire utili informazioni sulla attività elettrica corticale, può rivelarsi, in questi pazienti, del tutto inaffidabile sotto il profilo diagnostico.

A tale proposito sono da ritenere particolarmente significativi i casi riportati in letteratura internazionale di bambini di età compresa tra 0 e 12 mesi, tutti sottoposti a trattamento rianimativo, alcuni con quadri di m. cerebrale accertata angiograficamente o mediante eco-doppler (assenza di flusso ematico) ma con segni di attività elettrica cerebrale ancora presente, altri con flusso ematico conservato ma con tracciato elettroencefalografico isoelettrico.

Tutti questi pazienti, deceduti nonostante il protrarsi nel tempo della ventilazione meccanica e delle usuali terapie rianimative, presentarono all'esame autopsico una estesa necrosi di entrambi gli emisferi.

Tali considerazioni debbono far attentamente riflettere sulle reali difficoltà diagnostiche che frequentemente comporta la corretta interpretazione di esami comunque basati ai fini di un tempestivo accertamento della m. (tracciato elettroencefalografico e studio del flusso ematico endocranico) e sull'importanza che riveste, in questi pazienti, la disponibilità di ulteriori indagini specialistiche integranti quelle più comunemente utilizzate.

Tale è, sostanzialmente, l'orientamento seguito anche dalla statunitense «Task force for the determination of brain death in children» che, oltre a definire nel 1987 i criteri e i tempi di accertamento della m., raccomanda, soprattutto per i neonati, la contemporanea presenza non di uno soltanto ma di tutti i criteri enunciati nel documento (Comitato Nazionale Bioetica, 1991; Special Task Force, 1987).

Di particolare rilevanza e di non agevole soluzione sono, infine, i problemi sollevati dai neonati anencefali a causa dei delicati quesiti di natura clinica, deontologica e medico-legale da essi posti.

Questa grave e complessa malformazione che si determina precocemente nella vita fetale (probabilmente tra il 22° e 24° giorno di gestazione) per un difetto di sviluppo del tubo neurale, è associata in una alta percentuale di casi a difetti congeniti interessanti altri organi e apparati ed è caratterizzata da un indice di mortalità pari, praticamente, al 100% (il decesso sopravviene abitualmente nei primi giorni di vita extrauterina o, al massimo, entro 1-2 settimane dalla nascita) (McGillivray, 1988).

Escludendo la praticabilità dell'esame elettroencefalografico, l'unica possibilità di indagine da poter prendere in qualche modo in considerazione è rappresentata, pur con le dovute riserve, dallo studio dei potenziali evocati.

Il gruppo di studio dell'università statunitense di Loma Linda ha effettuato ricerche approfondite sul bambino anencefalo giungendo a verificare, attraverso l'applicazione di due distinti protocolli su 12 pazienti, la possibilità di instaurare trattamenti medici precoci allo scopo di mantenere ben funzionanti gli organi utili al trapianto fino al momento del sopraggiungere della m. cerebrale (Peabody et al., 1989).

I tentativi compiuti sono stati praticamente coronati da insuccesso e le conclusioni cui il gruppo è giunto hanno escluso qualsiasi possibilità di considerare tali pazienti potenziali donatori di organi in quanto, per legge, si sarebbe dovuta verificare, ancor prima della comparsa di altre condizioni, la m. del tronco cerebrale per poter emettere una diagnosi di certezza.

È da rilevare difatti che, una volta accertata la m. del tronco e il conseguente definitivo arresto della funzione cardiaca, qualsiasi forma di trattamento intensivistico rianimativo, per il mantenimento in condizioni soddisfacenti degli organi destinati ad eventuale trapianto, si renderebbe del tutto inutile, così come, l'esecuzione di precoci terapie rianimative, consentendo anche la soprav-

vivenza del tronco cerebrale, impedirebbe di formulare diagnosi di m.

Il vero problema risiede dunque nella peculiare condizione anatomofunzionale presentata dai neonati anencefali: un tronco cerebrale funzionante, anche se quasi sempre solo parzialmente, con contemporanea totale assenza di attività cerebrale per il mancato sviluppo degli emisferi, condizione che potrebbe autorizzare a non porre sullo stesso piano il valore che riveste la funzionalità del tronco in questi pazienti (essa può essere assicurata e prolungata soltanto mediante l'impiego della ventilazione meccanica) con quello che riveste in tutti gli altri (Fost, 1989).

Considerando l'estrema gravità della prognosi e il sistematico fallimento di qualsiasi forma di trattamento comunque tentata, è stata anche formulata l'ipotesi di poter classificare il neonato anencefalo come un paziente già privo di vita sin dalla nascita (in quanto non dotato di strutture telencefaliche), ipotesi che, se accettata giuridicamente e scientificamente, consentirebbe di procedere all'eventuale espianto ancor prima che si verifichi l'arresto delle funzioni cardiaca e respiratoria.

Noi riteniamo che, pur trattandosi di pazienti per i quali non esiste alcuna possibilità né di miglioramento né di sopravvivenza a medio o a lungo termine, non sarebbe assolutamente lecito avallare nei loro confronti un tal tipo di procedura, del resto non accettata eticamente e non convalidata da nessuna legislazione in campo internazionale.

Bibliografia

- Aguglia U., Quattrone A., *Monitoraggio in Anestesia e Rianimazione*, 1987, Editoriale BIOS, pp. 203-211.
- Aschwal S. et al., *Ann. Neurol.*, 1989, **41**, 539-546.
- Aschwal S., *Clin. Perinat.*, 1989, **16**, 501.
- Aschwal S., Schneider S., *Pediatrics*, 1989, **84**, 429.
- Aschwal S., Schneider S., *Advances in Pediatrics*, 1991, **38**, 181-202.
- Aschwal S., Schneider S., *Pediatr. Neurol.*, 1987, **3**, 5-69.
- Belsh J. M., Chokroverty S., *Electroenc. Clin. Neurol.*, 1987, **68**, 75.
- Caminiti G., *Monitoraggio in Anestesia e Rianimazione*, 1987, Editoriale BIOS, pp. 235-259.
- Clark F. I., Desch L. W., *Pediatrics*, 1990, **85**, 1126.
- Comitato Nazionale Bioetica, *Medicina e Morale*, 1991, **3**, 543-557.
- Cuocolo R., *Minerva Anestesiologica*, 1985, **51**, 183-190.
- Dear R. F., Godfrey D. J., *Arch. Dis. Child.*, 1985, **60**, 17-19.
- Drake B. et al., *Pediatrics*, 1986, **78**, 107-112.
- Fost N., *Clinics in Perinat.*, 1989, **16**, 2, 331-337.
- Freeman J. M., Ferry P. C., *Pediatrics*, 1988, **82**, 301.
- Gasparetto A., Fierro G., *Monitoraggio in Anestesia e Rianimazione*, 1987, Editoriale BIOS, pp. 271-276.
- Giron G. P. et al., *Minerva Anestesiologica*, 1985, **51**, 231.
- Girvin J. et al., *J. Heart Lung Transplant.*, 1993, **12**, 6, part. 2, S371.
- Goodman J. M. et al., *Neurosurgery*, 1985, **16**, 492-496.
- Goodwin S. R. et al., *Crit. Care Med.*, 1991, **19**, 518-524.
- Hassler W. et al., *Neurosurgery*, 1988, **68**, 745.
- Hill A., Volpe J. J., *J. Pediatr.*, 1981, **98**, 974.
- Laviani R. et al., *L'Anestesia, la Rianimazione e la Terapia Intensiva negli stati di emergenza materno-neonatale*, 1990, Ediz. Multigraf, Roma, pp. 383-387.
- Lynn J., *JAMA*, 1983, **250**, 612.
- McGillivray B. C., *Transplant Proc.*, 1988, **20** (4), Suppl. 5, 9-11.
- Medical Task Force on Anencephaly, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **322**, 669.
- Menamin J. B., Volpe J. J., *Ann. Neurol.*, 1983, **14**, 302.
- Outwater K. M., Rockoff M. A., *Crit. Care Med.*, 1987, **12**, 357-358.
- Pallis C., *Br. Med. J.* (ISBN), 1983, **286**, 284-287.
- Peabody J. L. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1989, **321**, 344-350.
- Pezzani C. et al., *Neuropediatrics*, 1986, **17**, 11.
- Pittoni C. et al., *Monitoraggio in Anestesia e Rianimazione*, 1987, Editoriale BIOS, pp. 203-211.
- Report of Special Task Force (Guidelines for the determination of brain death in children), *Pediatrics*, 1987, **80**, 298-300.
- Rossini P. M., *Riv. Ital. di EEG e Neurofis. Clin.*, 1983, suppl. 2, 1.
- Suter P. M., *Intensive Critical Care Digest*, 1992, Vol. II, n. 3, 40-41.
- Van Bunnem Y. et al., *Annales de Radiologie*, 1989, **32**, 4, 279.
- Volpe J. J., *Pediatrics*, 1987, **80**, 296.
- Wetzel R. C. et al., *Anesth. Analg.*, 1985, **64**, 125.
- Wylie W. D., Churchill Davidson H. V., *Anestesia*, 1982, Casa Ed. Ambrosiana, Milano, p. 713.

FRANCO GIANTURCO

MORTE IMPROVVISA [per la morte improvvisa dell'adulto v. vol. IX, coll. 1985-1994; Agg. I, coll. *5212-5220]

SINDROME DELLA MORTE IMPROVVISA DEL LATTANTE [v. vol. IX, coll. 1994-1998]

SOMMARIO

Definizione e generalità (col. 3817). - **Incidenza ed epidemiologia** (col. 3817). - **Patogenesi della SIDS** (col. 3819). - **Fattori di rischio** (col. 3819). - **Fattori causali** (col. 3819): *Ipotesi metabolica*. - *Ipotesi infettiva*. - *Ipotesi respiratoria*. - *Ipotesi cardiaca*. - **Individuazione dei bambini a rischio** (col. 3822). - **Prevenzione** (col. 3823). - **Conclusioni** (col. 3824).

Definizione e generalità

La *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS) è la morte improvvisa ed inaspettata di un lattante di età compresa tra un mese ed un anno di vita che rimane inspiegata dopo l'effettuazione di un'indagine *post-mortem* completa. Questa deve comprendere l'autopsia, l'esame delle circostanze del decesso e la revisione della storia clinica del caso. L'inspiegabilità del decesso deve fondarsi sull'applicazione di un rigoroso protocollo autoptico che consenta di escludere cause riconoscibili di morte e sull'indagine relativa alla «scena del decesso». Questo secondo momento prevede una anamnesi minuziosa finalizzata a precisare le circostanze ambientali nelle quali si è verificata la morte (posizione del bambino durante il sonno, temperatura dell'ambiente, uso di stupefacenti e/o fumo di sigaretta dei genitori) e la registrazione di quei disturbi «banali» (iperidrosi, flogosi delle vie aeree superiori, diarrea, ipotonia ed ipo-reattività) che talvolta precedono l'evento SIDS.

Solo quando queste condizioni sono interamente rispettate si può formulare diagnosi di SIDS ed ascrivere il caso in questione al Capitolo R96 della Classificazione internazionale delle malattie.

La non osservanza di queste norme, oltre a rappresentare un impedimento al miglioramento delle nostre conoscenze sulla sindrome, può far sì che rimangano impuniti alcuni casi di infanticidio, non vengano diagnosticate patologie di natura genetico-metabolica o rilevati casi di «*mal-practice medica*» e che, infine, non vengano evidenziati problemi relativi alla sicurezza di alcuni prodotti per l'infanzia (culle, cuscini, imbottiture, etc.).

Incidenza ed epidemiologia

Nei Paesi industrializzati la SIDS rappresenta la prima causa di morte nell'età compresa tra 1 e 12 mesi, con un rapporto femmine/maschi di 1:1,6. La SIDS si verifica in ogni parte del mondo; i ceti meno abbienti sono i più colpiti ma le classi agiate non ne sono risparmiate. L'80% dei decessi si verifica nei primi 5 mesi con un picco di massima incidenza tra 2 e 4 mesi. Complessivamente la SIDS è responsabile del 40% delle morti nel periodo post-neonatale.

Negli U.S.A. si registra un'incidenza di SIDS di circa l'1,5 per mille nati vivi, il che equivale a oltre 5000 morti l'anno. In Germania, nei Paesi dell'Europa Centrale e in Inghilterra l'incidenza è, in genere, sovrapponibile a quella statunitense. I dati relativi alla mortalità per SIDS diventano ancora più significativi se il numero dei decessi viene rapportato ai cosiddetti «anni di vita potenziale persi prima dei 65 anni (AVPP)». Su questa base la SIDS nel 1985 rappresentava negli U.S.A. la 7^a causa di AVPP, configurandosi come problema di assoluta rilevanza sociale.

L'Italia e la Grecia sono gli unici Paesi dell'Europa occidentale dei quali non si conosce l'incidenza nazionale della SIDS. Nel nostro paese esistono solo dati epidemiologici parziali relativi a singole realtà regionali. I più recenti si riferiscono alla Lombardia e all'Emilia Romagna. Nel primo caso sono il risultato di una indagine prospettica effettuata dal 1984 al 1990 a Milano ed *hinterland*, su un campione di 133.499 neonati. I casi di SIDS sono stati 73 con una incidenza dello 0,55 per mille; gli stessi risultati sono scaturiti da recenti indagini retrospettive effettuate in Emilia Romagna e a Firenze. Se questi dati fossero sicuramente attendibili ed estensibili a tutta la realtà nazionale, il nostro Paese rientrerebbe nelle aree a bassa incidenza di SIDS.

In tab. I viene indicata l'incidenza della SIDS in alcuni Paesi, rapportata alla percentuale di conferme all'indagine autoptica, quando presente.

TAB. I. DISTRIBUZIONE PERCENTUALE DI SIDS IN ALCUNI PAESI

(modificata da K. Fitzgerald, *SIDS Global Strategy Task Force*, Agosto 1994)

Paese	N. SIDS/anno	% di autopsie	SIDS/1000 nati vivi
Arabia Saudita	?	?	?
Australia	308	100	1
Austria	180	solitamente	2
Belgio	240	talvolta	1,7
Canada	360	100	0,9
Danimarca	103	100	1,65
Finlandia	38	100	0,6
Francia	1400	variabile	1,8
Germania	2000	< 50	2-2,5
Giappone	400	15	0,68
Grecia	18	?	?
Hong-Kong	21	100	0,3
Inghilterra e Galles	108	100	1,44
EIRE	170	solitamente	2,5
Irlanda Nord	38	solitamente	1,45
Israele	?	?	?
Italia	?	talvolta	?
N. Zelanda	100	100	1,45
Norvegia	74	100	1,2
Olanda	200	78	1,3
Papua N. Guinea	nessuno	nessuno	0
Rep. Ceca	?	?	0,9
Russia	?	?	0
Scotia	88	100	0,9
Singapore	nessuno	?	0
Slovacchia	?	?	0,89
Sud Africa	?	?	3,8
Svezia	121	100	1
Ungheria	?	?	?
U.S.A.	5230	solitamente	1,5
Zimbabwe	?	mai	?

MORTE IMPROVVISA

Patogenesi della SIDS

Ogni anno vengono pubblicati su riviste specializzate oltre 200 contributi scientifici sulla SIDS, ad indicare l'elevato interesse e la pluralità di approccio a questa tematica. Circa 400 ipotesi etiopatogenetiche sono state proposte senza che allo stato attuale delle conoscenze nessuna abbia trovato unanimi consensi.

Alla sindrome sono stati correlati fattori di rischio e fattori causali.

Fattori di rischio

Elenchiamo i fattori di rischio di maggiore rilevanza e incidenza:

età materna e parità: è segnalata una maggiore incidenza nelle giovani madri (età < 19 anni), specie se pluripare;

razza nera;

stagionalità: maggiore frequenza nella stagione invernale limitatamente alla fascia di età compresa fra 6 e 12 mesi;

nascita pretermine, specie se associata a basso peso per l'età gestazionale;

uso materno di sostanze stupefacenti (cocaina, oppiacei) e fumo di sigarette;

alimentazione con latte non materno;

temperatura ambientale (ipertermia);

posizione prona durante il sonno.

Fattori causali

I possibili fattori causali sono schematicamente suddivisibili in quattro gruppi: alterazioni metaboliche; fenomeni infettivi; depressione respiratoria durante il sonno; anomalie di funzionamento cardiaco non su base malformativa.

Ipotesi metabolica

Il nesso etiopatogenetico tra malattie metaboliche congenite e SIDS risale a circa 30 anni fa. Recentemente tale ipotesi è stata riproposta da una serie di studi tendenti ad attribuire almeno il 5% dei casi di SIDS a quadri dismetabolici.

Si tratta di patologie accomunate dalla possibilità di determinare un coma ipoglicemico in caso di digiuno prolungato o febbre (fig. 1). Tra queste, il deficit di Acil-CoA dei-

drogenasi a media catena (MCADD: *Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*) potrebbe essere alla base del 3% dei casi di SIDS. La MCADD è caratterizzata da un deficit della β -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi ed ha una incidenza di 1/10.000-15.000 nati nell'Europa nord-occidentale. La sintomatologia clinica è caratterizzata da vomito, letargia, epatopatia e coma ipoglicemico. La diagnosi precoce di questo quadro clinico è immediata in quanto si basa sul dosaggio urinario quantitativo della n-esanoilglicina, della 3-fenil-propionil-glicina e della suberil-glicina. Anche se relativamente poco frequenti i deficit metabolici vanno attentamente ricercati tutte le volte in cui si verifica più di un decesso per SIDS nello stesso nucleo familiare.

Ipotesi infettiva

Il ruolo nel determinismo della SIDS di agenti infettivi è sostenuto dal frequente rilievo anamnestico di blande infezioni delle vie aeree superiori nelle due settimane che precedono la morte e dalla considerazione associata al noto decremento degli anticorpi materni proprio intorno ai 2-4 mesi di vita, età di massima incidenza di SIDS. L'agente più spesso chiamato in causa è il Virus Respiratorio Sinciziale (RSV) in quanto può provocare, nel 20-25% dei bambini ospedalizzati, crisi di apnea che, talvolta, rappresentano il sintomo di esordio dell'infezione. Questo agente è tuttavia difficilmente isolabile nelle strutture vitali del tronco dell'encefalo. Marker della presenza del virus potrebbe essere l'interferone-alfa che è stato ritrovato in aspirati naso-bronchiali di bambini deceduti per SIDS. È inoltre ipotizzabile un sinergismo tra il RSV e le tossine pirogogene stafilococciche e streptococciche; la conseguente ipertermia potrebbe favorire un ulteriore rilascio di tossine innescando così un circolo vizioso. Va ricordato che recentissime indagini epidemiologiche hanno fatto registrare, nei paesi in cui sono stati adottati programmi di prevenzione, la scomparsa del classico picco invernale dei decessi nei bambini di età compresa fra 2 e 4 mesi.

Ipotesi respiratoria

Secondo questa ipotesi la SIDS troverebbe una correlazione etiopatogenetica con apnee imputabili ad immaturità

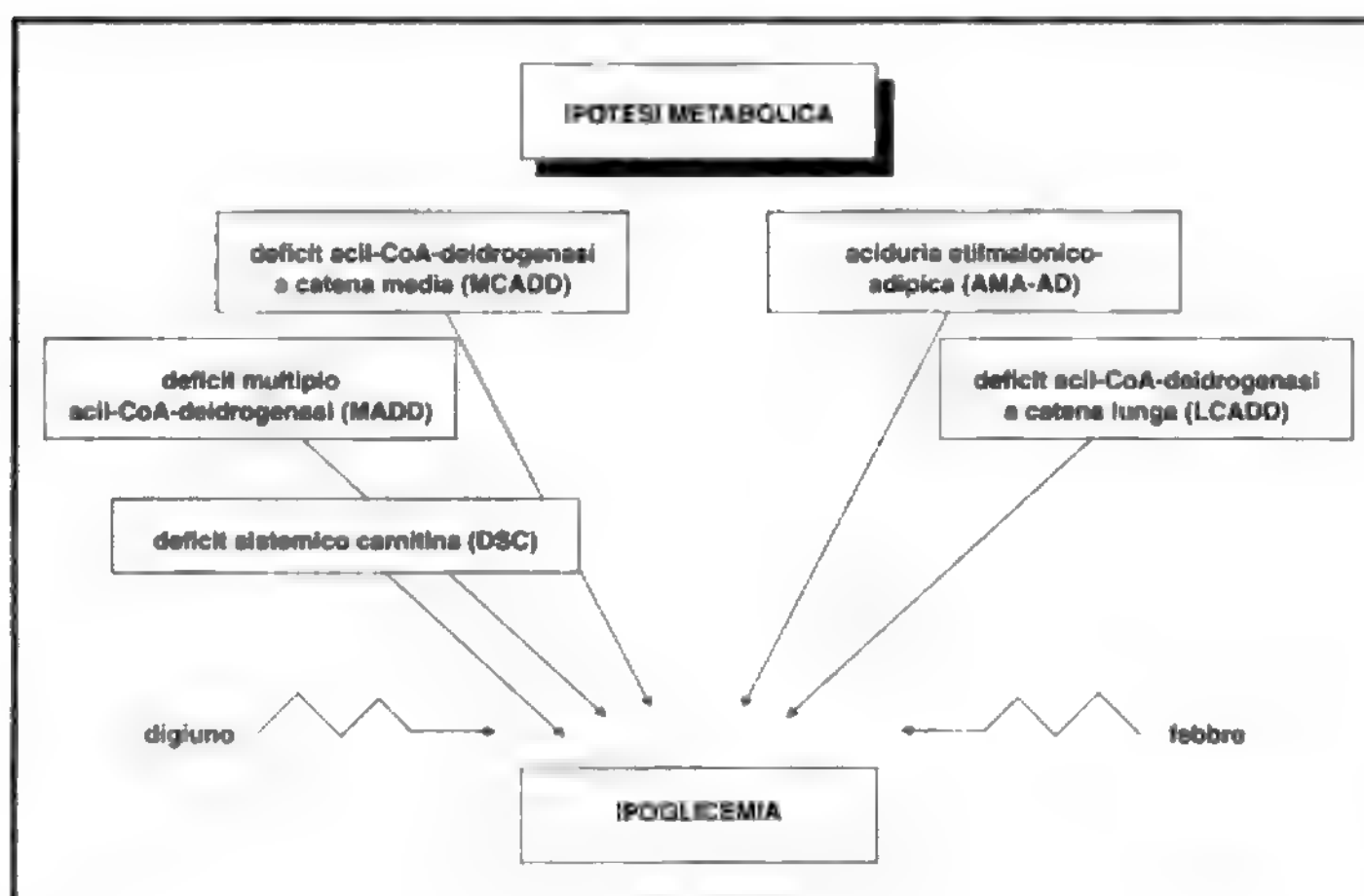


Fig. 1. Ipoglicemia e SIDS. (Da Rinaldo, 1994, ridisegnata e modificata)

o lesione dei centri respiratori bulbari, a spasmo vagale, a ostruzione delle vie aeree superiori o inferiori o a reflusso gastroesofageo. Già Marfan circa un secolo fa spiegava così la morte improvvisa del lattante: «In analogia alle apnee dell'immaturato, il lattante dimentica di respirare».

Nel 1972 fu pubblicato negli U.S.A. il caso di due bambini che avevano presentato episodi di apnea prolungata durante il sonno e che erano successivamente deceduti. A partire da questa segnalazione si diffusero rapidamente programmi di ricerca sullo studio delle apnee durante il sonno ed il monitoraggio domiciliare dei bambini ritenuti a rischio.

Le registrazioni cardiorespirografiche effettuate nell'arco di questo ventennio non hanno però dimostrato alcun valore predittivo. Questi risultati, tuttavia, non inficiano l'ipotesi patogenetica dell'asfissia, in quanto il semplice studio del quadro respiratorio non consente una valutazione globale della funzionalità respiratoria. Infatti, in alcuni bambini con rilievi anamnestici di un *Apparent Life-Threatening Events* (ALTE), episodio drammatico che sembra preludere alla morte, caratterizzato dalla variabile associazione di apnea, pallore o cianosi e ipotonia, è stata individuata una ridotta sensibilità dei chemorecettori bulbari alla pCO_2 e dei glomi aortici e carotidei alla pO_2 , associata ad una labilità nella reazione di risveglio (*arousal*) all'ipossia e all'ipercapnia.

La reazione di risveglio a sua volta è inibita dalla ipossia cronica e tende fisiologicamente ad indebolirsi proprio a partire dal 2°-3° mese di vita. La possibilità che l'ipossia cronica sia una condizione base di SIDS sembra essere validata anche dagli studi di Rognum e Saugstad sul metabolismo dell'ipoxantina, sostanza che si accumula in condizioni di ipossia cronica ed è in grado di compromettere con un meccanismo di *feedback* la funzione respiratoria (fig. 2).

Le elevate concentrazioni di ipoxantina nell'umor vitreo e nelle urine, unitamente all'ipertrofia della tonaca muscolare delle arteriole polmonari, all'anomala ritenzione del grasso bruno perisurrenalico, all'aumento dell'eritropoiesi extramidollare, alla presenza di petecchie timiche ed alla anomala proliferazione astrogliale del tronco dell'encefalo, costituiscono reperti fortemente suggestivi di uno stato ipossico antecedente l'evento SIDS. Inoltre i decessi per SIDS si verificano mentre il bambino dorme o si presume che dorma. Il sonno nella sua evoluzione presenta com-

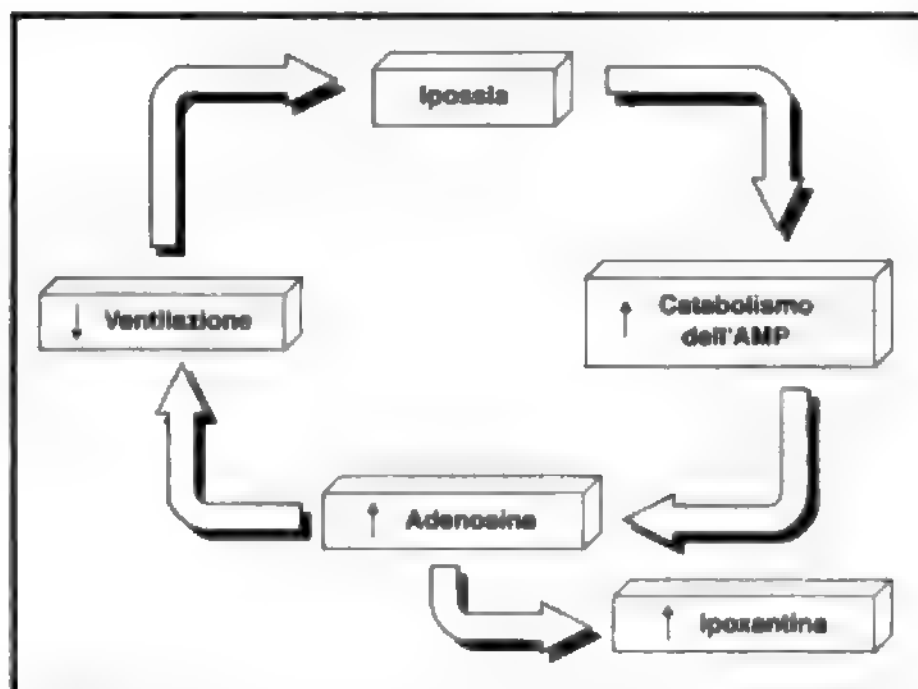


Fig. 2. Ipossia cronica e SIDS. (Da Hunt, 1992, ridisegnata e modificata).

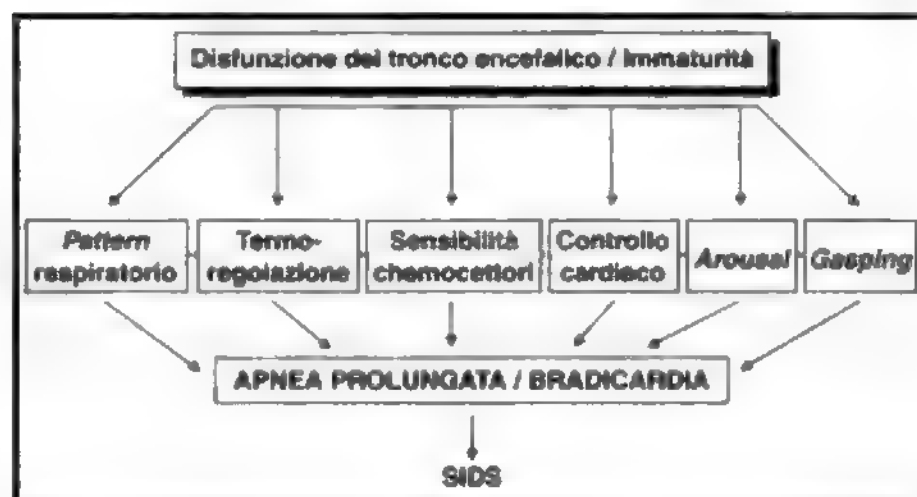


Fig. 3. Disfunzione del S.N.C. e SIDS. (Da Hunt, 1992, ridisegnata e modificata).

plesse interrelazioni anatomofisiologiche con l'attività cardiorespiratoria. Di notevole interesse sono gli studi della Cornwell condotti su un gruppo di 30 bambini ALTE: i bambini di sesso maschile (a maggior rischio di SIDS) hanno presentato una tendenza complessiva a dormire di più e ad addormentarsi in fase REM, manifestando così un quadro indicativo di una immaturità del S.N.C.

Ipotesi cardiaca

Secondo l'ipotesi cardiaca la SIDS sarebbe imputabile alla *sindrome del QT lungo* o a bradicardie riflesse di origine vagale. La classica ipotesi di Schwartz fa risalire l'alterazione di base ad una ridotta attività dei nervi cardiaci simpatici delle sezioni di destra con transitoria predominanza di quelli di sinistra, notoriamente aritmogeni.

In pazienti clinicamente asintomatici, il *marker* di questa condizione sarebbe rappresentato dall'allungamento dell'intervallo QT dell'elettrocardiogramma. Ne conseguirebbe un aumento della durata del periodo vulnerabile, con maggiore rischio di episodi di fibrillazione ventricolare.

Per quanto concerne la morte improvvisa del bambino (SIDS), il lavoro di Schwartz *et al.* (1998) dimostra che un prolungamento dell'intervallo QT durante la prima settimana di vita è fortemente associato alla SIDS (v. QT LUNGO, SINDROME DI**).

L'analisi dinamica dell'intervallo R-R sembra invece confermare la presenza di una più elevata frequenza cardiaca con minore variabilità nei bambini a rischio.

Questo caratteristico quadro sembrerebbe determinato da una iperattività simpatica e/o da una ipofunzionalità parasimpatica che, oltre ad essere responsabili della instabilità cardiaca, potrebbero essere la spia di una complessa disregolazione del sistema nervoso autonomo (S.N.A.) in grado di coinvolgere anche altre funzioni vitali, ed in particolare quella respiratoria e quella termoregolatrice.

In fig. 3, riportiamo schematicamente un modello patogenetico che consente di superare la dicotomia tra ipotesi cardiaca ed ipotesi respiratoria. Il substrato anatomico della disfunzione risiederebbe nella alterata mielinizzazione delle fibre nervose che dal sistema limbico si proiettano al tronco dell'encefalo e/o in lesioni di natura ipoplasica del nucleo arcuato.

Individuazione dei bambini a rischio

In base alle direttive fornite dal «National Institute of Health Consensus Development Conference on Infantile Apnea and Home monitoring» ed alla valutazione critica della letteratura più recente sull'argomento si possono considerare a rischio i seguenti gruppi di bambini:

- a) lattanti che hanno presentato uno o più episodi di ALTE che hanno richiesto intervento rianimatorio;
- b) fratelli o gemelli di vittime di SIDS;
- c) neonati pretermine sintomatici;
- d) figli di tossicodipendenti.

Tuttavia rientrano in queste categorie a rischio solo una piccola parte dei bambini colpiti da SIDS: nella maggioranza dei casi non è stato possibile rilevare anamnesticamente sintomi di allarme né una patologia ben identificabile. Un ALTE, come abbiamo accennato in precedenza, è un episodio che spaventa l'osservatore essendo caratterizzato dalla variabile associazione di apnea, pallore o cianosi e ipotonia o rigidità. Questo termine sostituisce quello di *near-miss for SIDS* (vicino alla morte per SIDS) in quanto la relazione causale tra le due manifestazioni è tuttora oggetto di discussione; basti pensare che una SIDS viene preceduta da un ALTE solo nel 7% dei casi. Il controverso rapporto tra ALTE e SIDS è esplicitato dai seguenti dati: l'incidenza di ALTE, nei lattanti, oscilla nelle varie casistiche dallo 0,6 al 6%; nell'82% dei casi, tali episodi, si verificano durante il giorno, quando chi accudisce il bambino è sveglio, ed hanno una insorgenza più precoce (2-3 settimane) rispetto al picco di massima incidenza di SIDS.

Dall'ampia casistica di Kahn *et al.*, comprendente 3799 lattanti, emerge che solo nel 62% degli episodi di ALTE è stato possibile risalire ad una precisa causa medica o chirurgica, restando idiopatici oltre 1/3 dei casi.

I fratelli o i gemelli dei bambini deceduti per SIDS presentano un rischio cinque volte maggiore rispetto alla popolazione generale.

I neonati pretermine costituiscono il 18% dei bambini deceduti per SIDS, ma vanno considerati a rischio esclusivamente quelli che continuano a presentare episodi di apnea dopo la trentaseiesima settimana di gestazione (pretermine sintomatici).

Prevenzione

Il cardine della prevenzione della SIDS è rappresentato dalla eliminazione dei seguenti quattro fattori di rischio controllabili ed unanimemente accettati dalla comunità scientifica internazionale: posizione prona durante il sonno, ipertermia ambientale, fumo di sigaretta sia passivo che in gravidanza ed allattamento artificiale. Allo stato attuale delle conoscenze, il fattore di rischio più strettamente correlato alla SIDS è rappresentato dalla *posizione prona* nel sonno, motivo per cui sono state avviate in alcuni paesi campagne di prevenzione su larga scala. Ci riferiamo in particolare al «New Zealand Cot Death Prevention Programme» (Marzo 1991) ed alle risoluzioni del «Chief Medical Officer for the Department of Health for the United Kingdom» (Ottobre 1991) e dell'«American Academy of Pediatrics Task Force on Infant Positioning and SIDS» (Giugno 1992) e del recentissimo «Lutte Contre La Morte Subite du Nourisson» (Francia, Ottobre 1994) che consigliano di porre «i bambini a termine, normali, esclusivamente in posizione supina durante il sonno».

I meccanismi patogenetici responsabili del decesso, innescati dalla posizione prona, potrebbero essere, la riorespirazione della CO₂ (*rebreathing*), l'ipertermia e/o la maggiore durata del sonno ed il minore numero di risvegli (*arousals*). Recenti studi indicano nel *rebreathing* un meccanismo estremamente pericoloso in quanto i bambini tendono ad assumere la posizione «a faccia in giù» in risposta ad uno stimolo freddo e a mantenerla più a lungo se riposano su materassi soffici. Sebbene un lattante sia in grado di sollevare e ruotare il capo, potrebbe mantenere tale posizione fino ad una grave asfissia ed ipercapnia. Tale ipotesi sarebbe, comunque, difficilmente spiegabile senza presup-

porre una associata labilità di base in grado di compromettere le reazioni di *arousal* (risposte di risveglio) e *gaspings* (autorianimazione), che rappresentano i due principali meccanismi di sopravvivenza che intervengono per interrompere la progressione verso la SIDS.

È importante sottolineare che l'applicazione dei programmi di prevenzione ha portato ad una sensibile diminuzione della mortalità per SIDS, stimabile in circa il 50%. Anche se le basi razionali di questo successo non possono essere del tutto precisate, sono stati probabilmente sottratti alla morte diverse migliaia di bambini.

La relazione tra nicotina e SIDS viene fortemente suggerita da recentissime indagini statistiche e dall'elevata concentrazione di *cotidina*, metabolita della nicotina, nel pericardio di alcuni bambini vittime di SIDS.

Per quanto riguarda l'allattamento materno va sottolineato come nei bambini allattati al seno si riscontri un positivo maggior numero di *arousals* durante il sonno.

L'ipertermia, infine, può alterare profondamente il quadro respiratorio determinando una transitoria disattivazione dei centri respiratori bulbari.

Questi fattori di rischio possano potenziarsi a vicenda: la posizione prona, ad es., determina un minor numero di *arousals* durante il sonno, così come gli effetti della nicotina nei figli di madri fumatrici, ed al tempo stesso può essere associata ad una minore dispersione del calore corporeo.

Se l'applicazione delle norme di prevenzione è fuori discussione la reale utilità del monitoraggio domiciliare dei bambini a rischio deve ancora essere convalidata. Nel nostro Centro SIDS vengono sottoposti a monitoraggio cardiorespiratorio domiciliare documentato i pretermine sintomatici, i bambini con episodi di ALTE idiopatico, ed i fratelli o gemelli di vittime di SIDS. Per i neonati figli di tossicodipendenti la decisione di intraprendere un periodo di monitoraggio viene presa di volta in volta tenuto conto dello stato ansioso e dell'adesione dei genitori.

Utilizziamo esclusivamente monitor dotati di memoria analogica e numerica («data recorder») che consente la decodificazione delle tracce di allarme di apnea e/o bradicardia. I genitori vengono meticolosamente istruiti sul funzionamento dell'apparecchiatura, sui limiti e benefici del monitoraggio e sulle manovre rianimatorie da mettere in atto in caso di allarme. I dati, qualora il bambino abiti in zone lontane dal Centro SIDS, possono essere inviati via *modem* e decodificati in tempo reale. Il monitoraggio può essere ragionevolmente sospeso dopo un periodo asintomatico di circa 4-5 mesi.

Conclusioni

Le morti per SIDS presentano un profilo caratteristico: stretta correlazione con il sonno, maggior incidenza tra il secondo ed il quarto mese di vita, predilezione per il sesso maschile, mancanza di reperti autopsici inequivocabilmente correlabili all'evento.

L'individuazione e la successiva limitazione di alcuni fattori di rischio (posizione prona durante il sonno, ipertermia ambientale, fumo passivo di sigaretta ed uso di stupefacenti, allattamento artificiale) hanno determinato in alcune aree geografiche un sensibile decremento delle morti in culla.

La posizione prona durante il sonno, oltre ad essere il fattore di rischio più strettamente correlato alla SIDS, è anche quello più facilmente controllabile; va quindi fortemente disincentivata. Tutto ciò presuppone l'avvio, anche nella nostra realtà, di campagne di informazione rivolte sia ai pediatri che alla popolazione. Questo tipo di scelta non dovrebbe incontrare particolare resistenza se si pensa che

l'indicazione a far dormire i bambini in posizione prona è partita solo intorno agli anni sessanta, suffragata dall'osservazione della miglior ventilazione dei neonati pretermine posti in tale posizione.

Il successo dell'intervento preventivo non deve comunque far cadere la tensione e l'interesse scientifico per le molte problematiche sollevate dall'evento SIDS.

Attualmente non è possibile individuare con certezza i bambini a rischio né tantomeno precisare il rapporto esistente tra ALTE e SIDS.

L'etiopatogenesi, nonostante la notevole quantità di conoscenze scientifiche, resta sostanzialmente oscura. È verosimile poi che non tutti i bambini vittime di SIDS muoiano a causa del medesimo meccanismo fisiopatologico. Gli studi prospettici sull'intervallo QT dell'ECG e sulla variabilità della frequenza cardiaca, suffragati da alcuni significativi reperti autoptici, potrebbero chiarire i meccanismi cardiaci eventualmente implicati nella sindrome. Lo screening elettrocardiografico neonatale può consentire l'individuazione precoce di una significativa percentuale di neonati a rischio di SIDS, permettendo quindi l'attuazione di misure preventive mediante la somministrazione di β -bloccanti durante il primo anno di vita.

La labilità delle risposte di arousal e gasping dipendente da una immaturità o da una lesione delle strutture tronco-encefaliche potrebbe spiegare la particolare vulnerabilità del controllo respiratorio durante il sonno.

Questi sono, in estrema sintesi, i problemi scientifici più rilevanti ma ad essi va aggiunto l'impatto psico-sociale, spesso devastante che accompagna una morte in culla.

Vogliamo infine ribadire l'urgenza dell'approvazione metodologica di «consenso familiare» per l'attuazione del riscontro autoptico e dell'indagine sulla scena del decesso, per poter finalmente ottenere dati nazionali attendibili che consentano di inquadrare, anche in Italia, questa sindrome nelle sue reali dimensioni. Sarà allora più semplice poter intraprendere coerenti campagne di informazione e prevenzione, impiegare risorse umane e tecnologiche per una razionale distribuzione regionale dei Centri SIDS ed avviare programmi di ricerca su questa malattia il cui «primo sintomo è la morte».

Bibliografia

- American Academy of Pediatric Task Force. *Pediatrics*, 1985, **129**, 76.
- Bevilacqua G., Volta A., Baroni M. et al., *Riv. Ital. Ped.*, 1993, **19**, 25.
- Blackwell C. C., Saadi A. T., Raza M. W. et al., *J. Clinical Pathology*, 1992, **45**, 20.
- Bolton D. P. G., Taylor B. J., Campbell A. J. et al., *Arch. Dis. Child.*, 1993, **69**, 187.
- Chiodini B. A., Thach B. T., *J. Pediatr.*, 1993, **123**, 686.
- Colan S. D., Liberthson R. R., Shannon D. C., Kelly D. H., *Pediatr. Cardiol.*, 1984, **5**, 267.
- Cornwell A. C., Laxminarayan S. J., *Sleep Res.*, 1993, **2**, 110.
- Davidson A., Donzelli G. P., Piumelli R. et al., *Proc. 4th SIDS International Conference*, Washington, 1996.
- Donzelli G. P. et al., *Europ. J. Pediatr.*, 1995, **154**, Suppl. 1.
- Donzelli G. P., Piumelli R., Landini L., Paternoster M. F., *Proc. 5th SIDS International Conference*, Rouen, 1998, p. 213.
- Donzelli G. P., Piumelli R., Moroni M. et al., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 107.
- Dwyer T., Ponsonby A.-L. B., Newman N., Gibbons L. E., *Lancet*, 1991, **337**, 1244.
- Filiano J. J., Kinney H. C., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1992, **51**, 394.
- Grancini F., Rosinenti P., Palla F., Schwartz P. J. et al., *Proceedings of Founding Congress dell'European Society for the Study and Prevention of Infant Death*, Rouen, 1991, p. 9.
- Hunt C. E., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 557.

- Hunt C. E., *Sudden Infant Death Syndrome*, in Beckerman R. C., Brouillette R. T., Hunt C. E. eds., *Respiratory Control Disorders in Infant and Children*, 1992, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 190-211.
- Hunt C. E., *Nelson Text-Book Pediatrics*, 1996, Saunders, Philadelphia, pp. 1991-1995.
- Kahn A., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 81.
- Kahn A., Grosswasser J., Sottiaux M. et al., *Pediatrics*, 1993, **91**, 1112.
- Matturri L., Martini L., Rossi L., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 75.
- Meny R. G., Carrol J. L., Carbone M. T., Kelly D. H., *Pediatrics*, 1994, **6**, 17.
- Milerad J., Opdal S., Vege A., Rognum T. O., *Proceedings of 3rd SIDS International Conference*, Stavanger, July 31st-August 4th, 1994, p. 52.
- Piumelli R. et al., *Relazione Congresso Nazionale Soc. Italiana Pediatria*, Torino, 22-24 sett. 1998.
- Rinaldo P., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 67.
- Schwartz P. J., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (24), 1709-1714.
- Stramba-Badiale M., Porta N., Fradiani M. et al., in Donzelli G. P., Piumelli R. eds., «S.I.D.S. Morte Improvvisa del Lattante. Istituzioni, cultura e comunità». *Atti del I Convegno Nazionale*, Firenze 25-26 Febbraio 1994, 1994, NICOMP L.E., p. 53.
- Taylor J. A., Sanderson M., *J. Pediatrics*, 1995, **126**, 887.
- Willinger M., Hoffman H. J., Hartford R. B., *Report of Meeting Held January 13 and 14, 1994*, National Institute of Health, Bethesda, MD, *Pediatrics*, 1994, **93**, 814.

GIANPAOLO DONZELLI

MOSAICISMO

1. mosaicism.

Si indica con mosaicismo [m.] la compresenza, nello stesso individuo (mosaico), di linee cellulari con patrimoni genetici non identici derivate tuttavia da un unico zigote. Pertanto il fenomeno del m. è da ricondursi al verificarsi di una mutazione di qualsivoglia entità (genica, cromosomica o genomica) in singole cellule dell'organismo ad uno stadio successivo alla fecondazione e alla trasmissione di tale mutazione alle cellule figlie (fig. 1); sussiste m. se la mutazione in questione è compatibile con la sopravvivenza cellulare.

Per estensione, con l'espressione m. funzionale si indica la compresenza, nello stesso individuo, di cellule che esprimono insieme di geni diversi. Nel senso più lato ciò può arrivare a comprendere l'intero processo differenziale, in cui tipi cellulari distinti esprimono insieme di geni non allelici specifici. Tuttavia sembra più appropriato l'uso del termine nel caso in cui linee cellulari diverse esprimono singole forme alleliche dello stesso gene in modo alternativo. È il caso dell'inattivazione casuale del cromosoma X negli individui di sesso femminile, che porta all'espressione di uno solo dei due alleli per tutti i geni soggetti all'inattivazione (lionizzazione, v. GENETICA MEDICA*, col. *3359).

Ad eccezione di questa forma particolare, il m. implica una modificazione del contenuto informativo del patrimonio genetico cellulare. Rientra fra questi il caso delle mutazioni programmate nelle popolazioni cellulari del sistema immunitario che subiscono riarrangiamenti del DNA a livello dei geni immunoglobulinici o del recettore delle cellule T. In questi casi il dispiegamento dell'intero repertorio anticorpale dell'organismo è il risultato di un esteso m. in cui cellule di ogni clone sono portatrici di geni riarrangiati in modo differente.

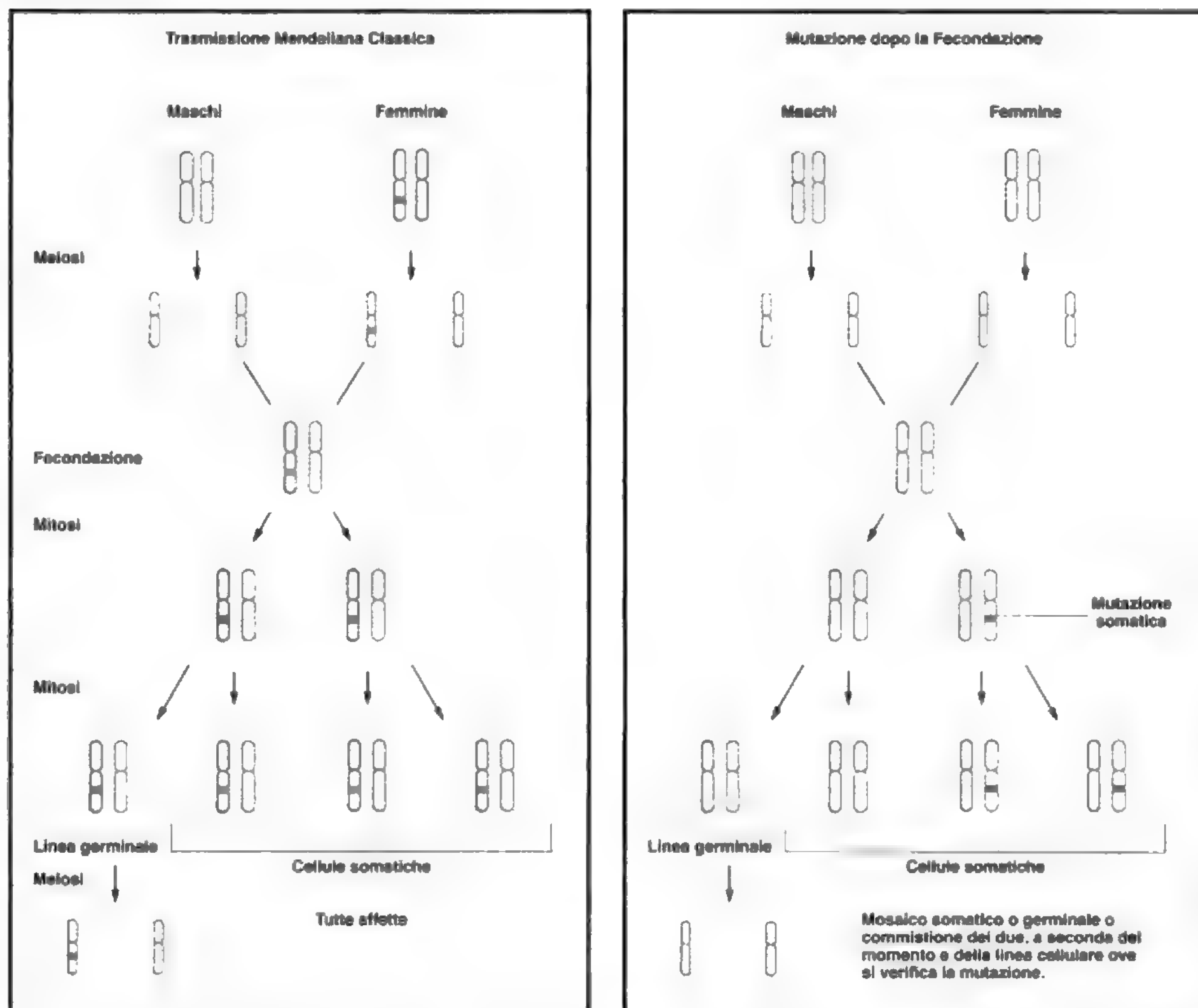


Fig. 1. Confronto fra trasmissione mendeliana e m. genetico. Il quadro di sinistra mostra la tipica trasmissione mendeliana di un gene mutante (barra rossa sul cromosoma schematizzato) attraverso due generazioni. La mutazione è presente in tutte le cellule somatiche e germinali della progenie della madre portatrice e può essere a sua volta trasmessa alla seconda generazione filiale. Il quadro di destra mostra una mutazione somatica che insorge dopo la fecondazione, dando origine ad una persona con mosaicismo. Il momento e la natura della mutazione determinano se questa può essere trasmessa alla successiva generazione. (Da Bernardi e Giusella, 1994, per gentile concessione, modificata).

Per quanto riguarda il m. per mutazioni accidentali bisogna innanzitutto considerare che il tasso di mutazione stimato di circa 10^{-6} per gene per divisione cellulare, se confrontato con il numero totale di cellule che costituiscono l'organismo (circa 10^{14}), fa prevedere che in realtà tutti gli individui siano mosaici per più di una mutazione. Le conseguenze per l'organismo sono tuttavia la risultante di diversi fattori fra cui il momento (*timing*) dello sviluppo ontogenetico in cui una specifica mutazione si verifica, i tessuti prodotti dalle cellule mutanti o che le contengono, nonché il o i geni che ne sono colpiti.

La categoria di mutazioni più studiata in questo contesto è quella delle *aneuploidie*, ove il m. consiste nella compresenza di popolazioni cellulari con cariotipi differenti. L'analisi dei blastomeri di embrioni prodotti mediante fecondazione *in vitro* dimostra che il meccanismo più frequente di formazione di mosaici è la non-disgiunzione mitotica. Tut-

tavia una quota notevole di tutti i mosaici è costituita da combinazioni cariotipiche $2n/4n$ e $2n/n$. Tali anomalie si generano prevalentemente nella 2ª e 3ª divisione mitotica, dopo la fusione dei pronuclei maschile e femminile (Munne *et al.*, 1994).

L'incidenza globale di m. per mutazioni cromosomiche è stata stimata attorno allo 0,20% (Wilson *et al.*, 1989) su materiale prelevato mediante amniocentesi. In materiale derivato da villi coriali tale valore risulta apparentemente più elevato a causa di un'alta incidenza di m. nel tessuto placentare, che tuttavia non interessa il resto dell'embrione (*placental confined mosaicism*) (Wang *et al.*, 1994).

Uno studio analitico del m. per mutazioni geniche appare assai più complesso per la necessità di individuare specifiche mutazioni in tessuti che possono non esprimere il gene mutante. Tuttavia nel caso di mutazioni dominanti ed in particolare dominanti letali il fenotipo affetto si può mani-

festare, seppure in modo parziale, ed essere pertanto osservato in mosaici (Bernards e Gusella, 1994). Per la particolare categoria delle mutazioni dinamiche dovute all'espansione di unità trinucleotidiche (v. CLONAGGIO POSIZIONALE**; TRINUCLEOTIDI INSTABILI, MALATTIE DA**) è stato recentemente evidenziato a livello del DNA un elevato grado di m. nei tessuti degli individui portatori dell'espansione (Telenius *et al.*, 1994; Chong *et al.*, 1995). Non è chiaro in quale misura la presenza di m. sia correlata all'entità dell'espressione del fenotipo mutante.

Qualora il m. interessi la linea cellulare che darà origine alle cellule germinali, una percentuale o la totalità di queste potrà essere portatrice di una mutazione anche in assenza di alcuna manifestazione del carattere mutante nel soggetto. Il m. ha pertanto importanti implicazioni per il genotipo della sua prole e per la valutazione del rischio di ricorrenza. In un classico lavoro, Hartl (1971) ha valutato gli effetti del mosaicismo germinale in membri di fratrie con individui affetti da caratteri dominanti e genitori normali. L'autore ha dimostrato come la presenza di due o più membri affetti faccia optare per l'ipotesi del m. (rispetto a quella di ricorrenza di una stessa mutazione) e questo determina un rischio per i successivi membri di ereditare la stessa mutazione fra il 20 e il 35%. Tale intervallo non è significativamente alterato in funzione dei diversi modi di gametogenesi assunti nel modello. Il m. germinale può quindi spiegare la trasmissione di caratteri autosomici dominanti a più figli da parte di individui normali. Esso è stato inoltre invocato per spiegare la instabilità intergenerazionale delle mutazioni dinamiche (Telenius *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1995).

È da notare infine che l'origine somatica della maggior parte delle mutazioni (e quindi associata al m.) è stata recentemente considerata il meccanismo più verosimile per spiegare differenze fra i due sessi nel tasso di mutazione. Infatti il numero molto superiore di divisioni mitotiche che intercorrono fra la formazione dello zigote e la produzione dei gameti nei maschi rispetto alle femmine è in grado di spiegare il maggior tasso di mutazioni geniche nei primi (Shimmin *et al.*, 1993).

Bibliografia

- Bernards A., Gusella J. F., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331** (21), 1447.
Chong S. S. *et al.*, *Nature Genetics*, 1995, **10** (3), 344.
Hartl D. L., *Am. J. Hum. Genet.*, 1971, **23**, 124.
Munne S. *et al.*, *Biol. Reprod.*, 1994, **51**, 373.
Shimmin L. C. *et al.*, *Nature*, 1993, **362**, 745.
Telenius H. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **6**, 409.
Telenius H. *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 1995, **4**, 189.
Wang B. T. *et al.*, *Am. J. Med. Genet.*, 1994, **53**, 307.
Wilson M. G. *et al.*, *Am. J. Med. Genet.*, 1989, **32**, 506.

ANDREA NOVELLETTI

MOTONEURONE, MALATTIE DEL

F. *maladies du motoneurone*. - I. *motor neuron diseases*.

SOMMARIO

Definizione e introduzione (col. 3829). - **Forme primitive** (col. 3831). - **Forme sporadiche secondarie** (col. 3832): *Cause fisiche*. - *Tossine e sostanze chimiche*. - *Infezioni*. - *Tumori e malattie immunitarie*. - *Malattie endocrine*.

Definizione e introduzione

Con il termine «malattie del motoneurone» si indica un ampio gruppo di disturbi che coinvolgono il neurone di moto e si possono manifestare sia nei bambini che negli adulti (tab. I). Queste malattie sono caratterizzate da una disfunzione delle cellule delle corna anteriori del midollo

TAB. I. MALATTIE DEL MOTONEURONE

(da Tandan, 1991)

1) Sindromi del I neurone di moto

Ereditarie

- Paraplegia spastica ereditaria (v. PARAPLEGIA SPASTICA EREDITARIA) o familiare (v. PARAPLEGIA SPASTICA FAMILIARE**)
- Adrenomieloneuropatia
- Altre

Acquisite

- Sclerosi laterale primaria (v. *2242)
- Paralisi pseudobulbare progressiva (v. MOTONEURONE, MALATTIE DEL**)
- Paraparesi spastica tropicale
- Altre

2) Sindromi del II neurone di moto

Ereditarie

- ATROFIA MUSCOLARE SPINALE I, II, III (v. DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI [v.], [v.*], [v.**]; ATASSIE SPINOCEREBELLARI**)
- Paralisi bulbare giovanile
- Atrofia bulbo-spinale (malattia di Kennedy) (v. MOTONEURONE, MALATTIE DEL**, *2243)
- Atrofia muscolare spinale distale
- Deficit di esosaminidasi A (v. MOTONEURONE, MALATTIE DEL**)
- Altre

Acquisite

- Poliomielite acuta anteriore (v. POLIOMIELITE)
- Atrofia muscolare post-polio (v. POLIOMIELITE)
- Amiotrofia focale (monomielica)
- Altre

3) Sindromi del I e II neurone di moto

Ereditarie

- SLA familiare (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**)
- Deficit di esosaminidasi

Acquisite

- SLA sporadica (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**)
- Sindrome SLA-Parkinson-demenza (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**)
- Sindromi simil-SLA, in corso di altre patologie

spinale (motoneurone inferiore o II neurone di moto), che può manifestarsi sia attraverso una riduzione della loro funzione, che attraverso una loro iperattività (Rowland, 1991; Leigh e Ray-Chaudhuri, 1994). I segni clinici di ipofunzione sono costituiti da debolezza e atrofia muscolare, perdita dei riflessi osteo-tendinei negli arti interessati. Segni di iperfunzione sono invece le miochimie, le fascicolazioni, i crampi e spasmi muscolari. Vi sono inoltre situazioni cliniche che coinvolgono anche i motoneuroni del tronco encefalico, o il motoneurone superiore (I neurone di moto). I segni di coinvolgimento del motoneurone superiore sono la presenza del segno di Babinski, del segno di Hoffman, il clono, riflessi osteo-tendinei scattanti con allargamento dell'area riflessogena. Nelle malattie del motoneurone sono di solito assenti i disturbi della sensibilità, degli sfinteri, della motilità oculare estrinseca, segni di interessamento cerebellare e del sistema visivo, parkinsonismo e demenza.

In base alla sede della lesione le sindromi riscontrabili sono le seguenti (Louwerse *et al.*, 1991):

1) Atrofia muscolare spinale (SMA): è una malattia progressiva delle cellule delle corna anteriori associata o meno con interessamento dei nuclei motori bulbari (v. anche DISTROFIE E ATROFIE MUSCOLARI**, *atrofia muscolare spinale* (coll. **1646-1648).

2) Sclerosi laterale amiotrofica (SLA): chiamata anche

MOTONEURONE

con il termine «malattia del motoneurone», è una forma progressiva; vi è il contemporaneo interessamento del motoneurone superiore e inferiore con o senza il coinvolgimento dei neuroni bulbari e dei fasci cortico bulbari (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**).

3) Sclerosi laterale primaria: è una malattia progressiva dei fasci piramidali (cordoni laterali del midollo) con o senza contemporaneo interessamento dei tratti cortico-bulbari.

4) Paralisi bulbare progressiva: malattia dei nuclei motori bulbari con o senza contemporaneo coinvolgimento del tratto cortico bulbare.

La commissione istituita *ad hoc* della Federazione Mondiale di Neurologia ha raggruppato le malattie del motoneurone sotto la voce «Atrofie Muscolari Spinali e altri Disordini dei Neuroni Motori» (WFN, 1988). Tale classificazione distingue le forme in:

- ereditarie con anomalie biochimiche sconosciute e note;
- congenite;
- ad etiologia non determinata;
- secondarie;
- sindromi caratterizzate da iperattività del motoneurone.

Forme primitive

Le forme ereditarie con anomalia biochimica ignota includono 28 sindromi autosomiche dominanti, 37 sindromi autosomiche recessive, 7 sindromi X-linked. Le atrofie muscolari spinali di più frequente riscontro, quali ad esempio la malattia di Werdnig-Hoffman e di Kugelberg-Welander, vengono trasmesse in modo recessivo e coinvolgono la muscolatura prossimale degli arti. Atrofie muscolari spinali che coinvolgono la muscolatura distale degli arti si trasmettono principalmente in modo recessivo; talora invece come tratto dominante. Una forma particolare di atrofia muscolare bulbo-spinale si associa con ginecomastia (*malattia di Kennedy*) e si trasmette con modalità X-linked; è causata da una mutazione del gene del recettore androgeno Xq 21-22 per una espansione del trinucleotide (CAG)_n (La Spada *et al.*, 1991). Atrofie muscolari spinali recessive possono essere associate con altri disturbi quali ad esempio ritardo mentale, sordità, oftalmoplegia, retinite pigmentosa, paraparesi spastica, coreo-acantocitosi.

Atrofie muscolari di tipo spinale talora rientrano nel quadro clinico di malattie multisistemiche ereditarie dominanti come la corea di Huntington, la malattia di Pick, la malattia di Machado-Joseph, l'atrofia olivo-ponto-cerebellare tipo IV. In alcuni casi l'atrofia muscolare può interessare preminentemente i muscoli del cingolo scapolare ed i peronei (atrofia scapolo-peroneale); o solamente un arto (forma monomelica). Quest'ultima forma si comporta in modo più benigno rispetto alle altre in quanto dopo una progressione lenta per alcuni anni vi è poi una stazionarietà del disturbo; è sporadica, l'insorgenza è insidiosa nella seconda-terza decade; vengono risparmiati i nervi cranici ed il tronco (Oryema *et al.*, 1990).

Le atrofie muscolari spinali recessive in cui è nota l'alterazione biochimica sono associate con deficit di esosaminidasi A (gangliosidosi G_{M2} [v. GANGLIOSIDOSI**]); deficit lisosomali multipli; adrenoleucodistrofia; fenilchetonuria; aciduria idrossivalerica; ceroido-lipofuscinosi.

Vi sono tipi di malattie del motoneurone che si manifestano preminentemente o esclusivamente in determinati gruppi etnici: il deficit di esosaminidasi A negli ebrei Ashkenazi; una paraparesi spastica con amiotrofia delle mani in Tunisia e Libano; una paralisi bulbare con perdita dell'udito e mimpolimoclono delle dita nel sud dell'India,

quadro di coinvolgimento definito «tipo Madras»; la sindrome SLA-Parkinson-demenza dell'isola di Guam; la malattia di Machado-Joseph in Portogallo e Isole Azzorre.

Le forme congenite sono poche e rare. Tra esse la sindrome di Mobius, dovuta ad agenesia dei nuclei dei nervi cranici.

Anche un'artrogriposi multiplex congenita può essere l'espressione clinica di una patologia del motoneurone. La sclerosi laterale amiotrofica è classificata come forma sporadica a etiologia non determinata ed è trattata in una voce a se stante (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**).

Forme sporadiche secondarie

Il riconoscimento delle forme sporadiche secondarie è importante non solo per la prognosi, ma per la possibilità di trattamento (tab. II, modificata da Louwerse, 1991).

Cause fisiche

Traumi del midollo spinale causano facilmente lesioni dei motoneuroni. Se vi sia invece una qualche relazione tra lo sviluppo di una malattia cronica del motoneurone ed un precedente trauma midollare non è chiaro; studi casi-controllo non hanno portato a conclusioni certe (Deapen e Henderson, 1986).

Una mielopatia cervico-toracica da spondilopatia, oppure anomalie della giunzione cranio-vertebrale possono determinare un quadro tipo SLA o SMA. Occasionalmente anche una siringomielia e siringobulbia possono presentarsi inizialmente con segni di patologia del motoneurone prima che compaia la tipica dissociazione della sensibilità. Tumori extradurali cervicali, meningiomi e neurinomi del *foramen magnum*, neurofibromi, esostosi ereditarie multiple, una gliomatosi cerebrospinale diffusa possono manifestarsi con

TAB. II. MALATTIE DEL MOTONEURONE SPORADICHE, SECONDARIE, DELL'ADULTO

(modificata da Louwerse *et al.*, 1991)

A) Cause fisiche

Trauma del midollo spinale
Compressione del midollo spinale e del tronco encefalico
Ischemia delle corna anteriori
Grave shock elettrico
Radioterapia

B) Tossine/sostanze chimiche/metalli

Esotossine batteriche
Metalli ed elementi in traccia
Sostanze tossiche industriali, solventi, pesticidi
Aminoacidi eccitotossici
Farmaci
Stricnina

C) Infezioni

Virali
Batteriche
Protozoi
Prioni

D) Tumori e malattie immunitarie

Linfoma
Paraproteinemia monoclonale
Anticorpi antigangliosidi

E) Malattie endocrine

Iperinsulinismo
Iperteroidismo
Iperparatiroidismo

segni di disfunzione del primo e/o secondo motoneurone (Louwerse *et al.*, 1991). Lo studio con Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) è attualmente il metodo più adatto per individuare le patologie del midollo spinale e della fossa cranica posteriore.

Un'amiotrofia secondaria a danno selettivo delle cellule delle corna anteriori può essere determinata da un'ischemia acuta o, più facilmente, da una vasculopatia cronica. Malformazioni arterovenose spinali con contemporaneo coinvolgimento del motoneurone superiore e inferiore possono simulare un quadro clinico di SLA. Anche la compromissione del motoneurone inferiore da danno radioterapico è probabilmente secondaria ad un processo ischemico da lesione dell'endotelio vascolare; la comparsa dei sintomi varia da pochi mesi a due anni circa dall'epoca della terapia radiante (Tan e Pye, 1991).

Lo sviluppo di una malattia del motoneurone come conseguenza di uno shock elettrico è nota da molti anni; la sintomatologia può iniziare entro due o più anni. Un'ipotesi per spiegare tale latenza è che il danno elettrico determini un danno subletale che rende le cellule delle corna anteriori più vulnerabili poi ad altri fattori (Gallagher e Talbert, 1990).

Tossine e sostanze chimiche

Le esotossine del tetano e del botulismo danno rispettivamente segni di disfunzione del motoneurone superiore e di quello inferiore. I metalli e gli elementi in traccia associati con una neuropatia sono il piombo, il mercurio, l'alluminio, il manganese ed il selenio. Alcuni studi sostengono vi sia un'associazione statisticamente significativa tra lavoro nell'industria del cuoio con esposizione a solventi e sviluppo successivo di malattie del motoneurone (Hawkes *et al.*, 1989).

Un'esposizione cronica ad organofosfati può determinare quadri simili ad una SLA, una SMA o ad una paralisi bulbare progressiva. Meno chiara una relazione causale con l'intossicazione da pesticidi organici (Pall *et al.*, 1987).

Deficit motori cronici da neuropatia o assonopatia sono stati osservati quali sequela di ingestione di molluschi contaminati con acido domoico, un aminoacido eccitotossico strutturalmente correlato con il glutammato (Teitelbaum *et al.*, 1990). È noto che un eccesso di aminoacidi eccitatori è dannoso per il sistema nervoso centrale (Choi, 1988).

Segni di disfunzione del motoneurone sono stati segnalati dopo assunzione di dapsona, difenilidantoina, stricnina, overdose di amitriptilina (Leys e Petit, 1990). Un'associazione con una reazione anafilattica è stata ipotizzata in alcuni casi di ipersensibilità alla penicillina con sintomi conosciuti come reazioni pseudoallergiche o sindrome di Hoigne (Behan e Bakheit, 1991).

Infezioni

Il virus della poliomielite e altri enterovirus come il Coxsackie determinano una paralisi acuta per lesione delle cellule delle corna anteriori. Vi sono casi in cui a distanza di molti anni dall'infezione iniziale poliomielitica compare debolezza lentamente progressiva ed atrofia muscolare in un muscolo precedentemente affetto o, meno frequentemente, in muscoli risparmiati nel corso della malattia iniziale. Il ritmo di progressione è molto variabile; può non esservi una progressione. Viene chiamata sindrome post polio; è una diagnosi clinica (Dalakas, 1990).

Alcuni pazienti affetti da infezione HTLV-1 presentano un quadro clinico ed autoptico simile a quello di una sclerosi laterale amiotrofica; nel loro siero e liquor è riscontrabile un aumentato titolo di anticorpi anti HTLV-1 (Kuroda

e Sugihara, 1991). Solitamente l'infezione HTLV-1 determina una paraparesi spastica, detta paraparesi tropicale spastica (v. MIELITI**, coll. **3698-3701). Vi è per ora un solo caso riportato di SLA associata con infezione HIV (Hoffman *et al.*, 1985).

Infezioni da spirochete, quali la sifilide e la borreliosi (malattia di Lyme) possono causare disfunzioni del motoneurone. Un interessamento acuto delle cellule delle corna anteriori è stato anche riscontrato nel corso di una infezione da *Toxoplasma gondii* in un soggetto non immunodepresso. È evidente che il loro riconoscimento è importante per le possibilità di trattamento con terapia adeguata. Un'amiotrofia è riscontrabile anche nella malattia di Creutzfeldt-Jakob.

Tumori e malattie immunitarie

Una malattia del motoneurone associata con linfoma è nota dal 1963. Successivamente è stato documentato che sindromi del motoneurone sia inferiore che superiore possono essere associate con linfoma di Hodgkin e non-Hodgkin (Younger *et al.*, 1991). In una parte dei pazienti la disfunzione neurologica precede la diagnosi di tumore. Il riscontro di paraproteinemia monoclonale, l'incremento della proteinorachia e la presenza di bande oligoclonali nel liquor costituiscono i caposaldi per la diagnosi. Ciò suggerisce che un disturbo immunologico possa svolgere un ruolo di mediatore per lo sviluppo della sindrome neurologica. In circa il 9,8% di pazienti con malattia del motoneurone è possibile evidenziare una paraproteinemia attraverso il metodo della immunofissazione elettroforetica. Risale al 1982 il primo riscontro di una sindrome motoria pura da coinvolgimento dell'assone associata con una macroglubulinemia.

La malattia del motoneurone è raramente espressione paraneoplastica di una neoplasia, quale il carcinoma delle cellule renali ed il carcinoma bronchiale.

Vi sono neuropatie motorie pure (*assonopatie*) che simulano una patologia del corpo cellulare (*neuropatia*) senza segni di coinvolgimento del motoneurone superiore. La distinzione tra le due forme non è sempre facile sul piano clinico ed elettrofisiologico. Il loro riconoscimento è importante perché spesso esse sono immunomediata e responsive ad un trattamento con un immunosoppressore (ciclofosfamide) o con immunoglobuline endovena. Alcuni pazienti con segni di patologia del neurone di moto inferiore hanno un alto tasso di anticorpi antiganglioside G_{M1}, il che suggerisce un possibile meccanismo immunomediato (Kornberg e Pestronk, 1995). Sono forme a prevalente inizio distale, asimmetriche, con progressione lenta. Sintomi e segni sensitivi sono assenti o di scarso significato clinico. Elettrofisiologicamente vi sono persistenti blocchi di conduzione prossimale multifocale nei nervi motori. Questo fatto deporrebbe per una neuropatia motoria pura e non per un danno del corpo cellulare. La distinzione però tra le due forme (assonopatia e neuropatia) non è sempre facile sul piano clinico ed elettrofisiologico. È stata riportata anche una malattia del motoneurone senza blocchi di conduzione ma con presenza di anticorpi anti G_{M1}.

Malattie endocrine

In pazienti anziani con diabete mellito non trattato o non riconosciuto è possibile riscontrare un'amiotrofia.

Assai raramente, tra le complicazioni neuromuscolari nell'ipertiroidismo, vi è un disturbo del motoneurone; in questi casi sono più facilmente riscontrabili segni di disfunzione del motoneurone superiore che di quello inferiore. I segni neurologici possono precedere di mesi o anni la comparsa della disfunzione endocrina. Il trattamento dell'ipertiroidismo riduce o fa scomparire i segni neurologici. Non è

chiaro se la disfunzione cellulare sia effetto diretto dell'ormone tiroideo o sia prodotta da mutamenti intracellulari di elettroliti o enzimi; il meccanismo sembra comunque reversibile (Shaw, 1988). La funzione tiroidea dovrebbe essere particolarmente valutata in pazienti anziani e in quelli che assumono betabloccanti poiché l'ipertiroidismo è spesso clinicamente mascherato in tali condizioni.

Un'amiotrofia spinale, con prevalente coinvolgimento dei segmenti prossimali degli arti inferiori, può essere associata con un iperparatiroidismo primitivo o secondario; il trattamento chirurgico o medico della patologia sottostante può risolvere i sintomi (Patten ed Engel, 1982).

Le disfunzioni del motoneurone che si manifestano con segni di iperattività sono state raccolte in uno specifico gruppo. Sulla sede di origine della disfunzione spesso non vi è accordo oppure dati successivi alla stesura della classificazione hanno individuato tale sede alla periferia del nervo come è il caso dei crampi muscolari.

Bibliografia

- Argov Z., Navan R., *Ann. Neurol.*, 1984, **16**, 14.
 Behan P. O., Bakheit A. M., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1991, **54**, 90.
 Choi D. W., *Neuron.*, 1988, **1**, 623.
 Dalakas M., *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1990, **2**, 901.
 Dalakas M., Pezeshkpour G. H., *Ann. Neurol.*, 1988, **23**, S 38.
 Deapen D. M., Henderson B. E., *Am. J. Epidemiol.*, 1986, **123**, 790.
 Gallagher J. P., Talbert O. R., *Acta Neurol. Scand.*, 1990, **83**, 79.
 Hawkes C. H. et al., *Lancet*, 1989, **1**, 73.
 Hoffmann P. M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1985, **313**, 324.
 Kornberg A. J., Pestronk A., *Ann. Neurol.*, 1995, **37**(S1), 43.
 Kuroda Y., Sugihara H., *J. Neurol. Sci.*, 1991, **106**, 199.
 La Spada A.R. et al., *Nature*, 1991, **352**, 77.
 Leigh P. N., Ray-Chaudhuri K., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1994, **57**, 886.
 Leys D., Petit H., *BMJ*, 1990, **300**, 614.
 Louwerse E. S. et al., *Differential Diagnosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis, Progressive Spinal Muscular Atrophy and Progressive Bulbar Palsy in Adults*, in Vinken P. J., Bruyn G. W., Klawans H. L. eds., *Handbook of Clinical Neurology*, 1991, **15**(59), 383. Elsevier, Amsterdam.
 Orvema J. et al., *Can. J. Neurol. Sci.*, 1990, **17**, 124.
 Pál H. S. et al., *Lancet*, 1987, **II**, 685.
 Patten B. M., Engel W. K., *Phosphate and Parathyroid Disorders Associated with the Syndrome of Amyotrophic Lateral Sclerosis*, in Rowland L. P., *Advances in Neurology*, 1982, **36**, 181. Raven Press, New York.
 Rowland L. P., *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.*, 1991, **4**, 699.
 Shaw P. J., *BMJ*, 1988, **297**, 1395.
 Tan S. V., Pye I. F., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1991, **54**, 469.
 Tandan R., *Disorders of upper and lower motor neurons*, in Bradley W. G., Daroff R. B., Fenichel G. M., Marsden C. D. eds., *Neurology in clinical practice*, 1991, Butterworth-Heinemann, Boston, p. 1687.
 Teitelbaum J. S. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1990, **322**, 1781.
 World Federation of Neurology, *J. Neurol. Sci.*, 1988, **86**, 333.
 Younger D. S. et al., *Ann. Neurol.*, 1991, **29**, 78.

GIULIANO TOMELLERI

MUCOPOLISACCARIDOSI [v. vol. IX, coll. 2088-2096]

SOMMARIO

Classificazione (col. 3836). - **Genetica** (col. 3836). - **Diagnosi** (col. 3837). - **Trattamento generale** (col. 3838). - **Terapia** (col. 3839).

Classificazione

La attuale classificazione della mucopolisaccaridosi (tab. I) presenta due modificazioni sostanziali rispetto alla precedente ed include la localizzazione cromosomica dei geni codificanti le attività enzimatiche implicate nella degradazione dei mucopolisaccaridi (v. IX, 2078).

L'ampio spettro clinico del difetto della α -iduronidasi che spazia da una forma ad esordio precoce e prognosi infausta entro i primi anni di vita a forme ad esordio tardivo, compatibili con una normale aspettativa di vita, e l'osservazione di figli di consanguinei con il cosiddetto fenotipo intermedio Hurler-Scheie (v. MUCOPOLISACCARIDOSI, IX, 2090), contrastante con l'ipotesi del composto genetico, hanno indotto ad unificare i tre sottotipi in un unico tipo I. Poiché il fenotipo clinico è soggetto a variazioni nel tempo non prevedibili al momento della diagnosi, è preferibile abbandonare gli eponimi Hurler e Scheie e fare riferimento solo al difetto enzimatico.

La seconda modificazione sostanziale riguarda la m. tipo IV per la quale si è resa necessaria la distinzione in tipo IVA e IVB a seguito del riscontro del difetto della β -galattosidasi in soggetti con fenotipo Morquio (v. IX, 2092). Si tratta di una mutazione del gene codificante la β -galattosidasi che colpisce l'attività di idrolisi del galattoso terminale nel cheratansolfato, lasciando intatta la funzione di degradazione del ganglioside GM₁ (v. VI, 2120; XIV, 128) nelle cellule nervose.

I progressi compiuti nel campo delle m. riguardano la genetica, la diagnosi, il trattamento e la terapia.

Genetica

Le m. sono senza dubbio malattie singolarmente rare e gli scarsi dati epidemiologici non riflettono la situazione reale.

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELLE MUCOPOLISACCARIDOSI

Tipo	Eponimo	Enzima deficitario	Localizzazione cromosomica	MPS urine*
I	Hurler-Scheie	α -iduronidasi	4p16.3	HS, DS
II	Hunter	iduronato solfatasi	Xq27-28	HS, DS
IIIA	Sanfilippo A	eparan-N-solfatasi	17q25.3	HS
IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetilglucosaminidasi	17q21.1	HS
IIIC	Sanfilippo C	acetil-CoA- α glucosaminide-N-acetiltransferasi	—	HS
IIID	Sanfilippo D	N-acetilglucosamina 6-solfatasi	12q14	HS
IVA	Morquio A	N-acetilgalattosamina 6-solfatasi	16q24	KS
IVB	Morquio B	β -galattosidasi	3	KS
VI	Maroteaux-Lamy	arisulfatasi B	5q13-q14	DS
VII	Sly	β -glucuronidasi	7q21.1-q22	HS, DS

* HS = eparansolfato; DS = dermatansolfato; KS = cheratansolfato (v. IX, 2078)

La carenza diagnostica negli anni passati e la diagnostica prenatale in anni più recenti hanno probabilmente contribuito ad una sottostima dell'incidenza.

Nella Columbia Britannica è stata rilevata nel periodo 1952-1988 una incidenza di 1:100.000 per il tipo I, 1:78.000 per il tipo II, 1:300.000 per il tipo IV e 1:216.000 per il tipo VI. Dati più recenti ottenuti sempre nella Columbia Britannica riferiscono incidenza minore (1:144.000 per il tipo I e 1:111.000 per il tipo II). Il tipo III, in considerazione della scarsità dei sintomi dismorfici, è senz'altro sottodiagnosticato e l'elevata incidenza (1:24.000) rilevata in Olanda riflette l'impegno diagnostico. La distribuzione dei sottotipi della malattia di Santfilippo (v. IX, 2092) varia con l'appartenenza etnica dei pazienti. In Olanda la prevalenza è nell'ordine IIIA, IIIB, IIIC mentre in Inghilterra è presente pressoché esclusivamente il tipo IIIA. Il tipo IIID è molto raro. Anche il tipo VII è molto raro e limitato a poche dozzine di casi riportati in letteratura.

In Italia non esistono informazioni epidemiologiche complete, ma solo dati derivanti dalla raccolta della casistica di centri attivi nella diagnosi biochimica, indicativi della frequenza relativa dei singoli tipi, piuttosto che dell'incidenza nella popolazione generale.

L'Associazione Italiana delle Mucopolisaccaridosi (via A. Carli 23 - 37131, Verona - tel. 045/8401117), attiva dal 1991, ha pubblicato sul bollettino trimestrale dell'aprile 1998 il numero dei casi di cui è a conoscenza: tipo I = 52, tipo II = 94, tipo III = 101, tipo IV = 34, tipo VI = 13. Questa distribuzione, che risente sia dell'adesione delle famiglie all'Associazione, sia della collaborazione della classe medica a diffonderne l'esistenza, è abbastanza sovrapponibile a quella risultante dalla sintesi dell'attività dei centri diagnostici.

La genetica molecolare è il settore di maggiore sviluppo delle conoscenze delle m. Quasi tutti i geni delle attività enzimatiche implicate nella degradazione di mucopolisaccaridi sono stati clonati ed è stata identificata la loro localizzazione cromosomica. La disponibilità del cDNA (*copy DNA*) ha dato inizio all'analisi delle mutazioni nei pazienti e alla correlazione genotipo-fenotipo. Le m. per le quali questo studio è più avanzato sono il tipo I e il tipo II.

In 73 soggetti europei con deficit della α -iduronidasi tre mutazioni coprono il 53% degli alleli mutati e sono responsabili di un fenotipo grave in omozigosi e a gravità variabile in eterozigosi con un allele sconosciuto. L'eterogeneità delle mutazioni è ampia nei soggetti con m. tipo II. Sono state dimostrate delezioni complete o incomplete o riarrangiamenti del gene dell'iduronato solfatasi in circa un quinto dei pazienti di diversa origine etnica con fenotipo grave. Numerose sono le mutazioni puntiformi riportate nella letteratura che non hanno finora permesso una correlazione genotipo-fenotipo.

Sono in corso studi mutazionali nelle m. IIID di cui è disponibile il cDNA mentre alcuni laboratori hanno in corso lo studio di mutazioni degli altri sottotipi della malattia di Santfilippo.

Le informazioni relative alle mutazioni nelle m. IVA e IVB sono relative solo a malati giapponesi.

L'analisi delle mutazioni nelle m. VI e VII è relativa a pochi casi. Le due mutazioni riscontrate in omozigosi in due pazienti con il tipo VI sembrano indicative di una correlazione genotipo-fenotipo: la delezione di una base che non consente la sintesi della proteina enzimatica è associata con un fenotipo grave e una mutazione puntiforme che riduce la stabilità della proteina senza alterarne la sintesi è presente nel paziente con il fenotipo a gravità intermedia.

Diagnosi

Al sospetto clinico seguono nell'ordine l'analisi dei mucopolisaccaridi urinari e quella enzimatica.

L'accumulo dei mucopolisaccaridi nelle urine è evidenziato con test di *screening* rapidi ed economici, ma soggetti a risultati falsamente positivi o negativi, o con un test

semiquantitativo più affidabile, basato sulla metacromasia in soluzione del complesso colorante-mucopolisaccaridi. L'escrezione di mucopolisaccaridi è normale nella malattia di Morquio e in rari casi di malattia di Santfilippo. L'analisi qualitativa di una mucopolisaccariduria, patologica o normale con sospetto di m. tipo III o IV, richiede metodi più lunghi e complessi che evidenziano il tipo o i tipi di mucopolisaccaridi eliminati.

Gli aspetti clinici e radiologici e il tipo di mucopolisaccaridi presenti nelle urine selezionano il dosaggio enzimatico, che è eseguito su leucociti, fibroblasti e, per il tipo II e IIIB, anche su plasma. Solo la determinazione degli enzimi deficitari nei tipi IIIA e IIIC richiede substrati radioattivi non in commercio ed è perciò limitata a pochi laboratori.

La *diagnosi molecolare* non è al momento attuale necessaria per diagnosi di m., ma dovrebbe essere raccolta in laboratori con specifiche e selezionate competenze nel tentativo di valutare l'esistenza di una correlazione genotipo-fenotipo ai fini della prognosi, delle indicazioni terapeutiche e della consulenza genetica.

La *diagnosi enzimatica* di eterozigosi delle forme ad ereditarietà autosomica recessiva trova indicazione nei familiari del caso indice, deve essere richiesta a laboratori con prolungata ed ampia esperienza di diagnosi enzimatica ed è affidabile in presenza di attività enzimatiche basse, a causa della sovrapposizione al confine tra controlli ed eterozigoti. La diagnosi enzimatica di portatrice del tipo II ad ereditarietà legata alla X non è affidabile. L'impiego di un microsatellite mappante in prossimità del gene della iduronato solfatasi si è rivelato un prezioso strumento per la diagnosi di eterozigote del tipo II (Carrozzo *et al.*, 1994).

La *diagnosi prenatale* è possibile sull'omogenato di villi coriali nel primo trimestre o sulla coltura degli amniociti nel secondo trimestre per tutti i sette tipi (Fensom e Benson, 1994). La diagnosi prenatale del tipo I nel primo trimestre richiede particolare cautela a causa della bassa attività della α -iduronidasi sui villi coriali. La diagnosi enzimatica del tipo II deve sempre essere associata alla determinazione del sesso fetale. A causa dell'inattivazione *non random* o della selezione delle cellule con il gene mutato, l'attività della iduronato solfatasi sulle cellule di un feto di sesso femminile può essere bassa come quella nelle cellule di un feto di sesso maschile affetto.

La conoscenza della mutazione nel caso indice aumenta l'affidabilità della diagnosi enzimatica di eterozigosi e di quella prenatale.

Trattamento generale

La prospettiva di terapie specifiche ha favorito un controllo longitudinale dei pazienti molto più attento e scrupoloso che in passato. I diversi specialisti sono coinvolti nella valutazione sistematica della funzione di diversi organi ed apparati per l'attuazione tempestiva di quei provvedimenti che rallentano o riducono gli effetti del danno progressivo della malattia e migliorano la qualità di vita dei malati.

Le difficoltà ed i rischi dell'anestesia che hanno sempre ostacolato ogni approccio invasivo possono essere superati da uno *staff* anestesilogico esperto e preparato al trattamento delle complicanze potenziali.

Il monitoraggio con le neuroimmagini delle dimensioni dei ventricoli cerebrali e della morfologia del midollo spinale è uno strumento prezioso ai fini dell'indicazione e del tempo di esecuzione dell'intervento derivativo e di quello di stabilizzazione delle vertebre cervicali.

L'esplorazione neurofisiologica contribuisce a decisioni chirurgiche prima che si instaurino danni irreversibili. Il successo dell'intervento di decompressione del nervo mediano in pazienti con sindrome del tunnel carpale è infatti

legato alla precocità, cioè alla sua esecuzione in uno stadio presintomatico o quasi.

Le complicanze oculari non sono purtroppo modificabili da misure preventive o terapeutiche. Il trapianto di cornea nei casi con opacità corneale ha un successo limitato nel tempo.

L'inserimento di tubicini endoauricolari riduce le conseguenze dell'otite cronica e rallenta la progressiva riduzione dell'udito.

La fisioterapia iniziata precocemente può prolungare la funzione delle articolazioni, che presentano limitazioni in tutti i casi ad eccezione della malattia di Morquio, in cui esiste lassità articolare.

L'ostruzione cronica delle vie aeree superiori è un problema rilevante soprattutto nei casi a maggiore sopravvivenza e può essere tale da richiedere la tracheotomia. La tonsillectomia e la adenoidectomia hanno un beneficio transitorio. Efficace sembra la respirazione nasale con pressione positiva ed ossigeno.

Il monitoraggio ecocardiografico è necessario per il decorso della patologia cardiovascolare e le eventuali indicazioni a trattamenti specifici. La profilassi dell'endocardite batterica deve essere applicata in tutti i pazienti con complicanze cardiache.

Terapia

L'unico procedimento che al momento attuale può modificare il decorso di alcuni sintomi è il *trapianto di midollo osseo*. Nei modelli animali delle m. tipo I, VI e VII sottoposti a trapianto di midollo osseo si è assistito ad una riduzione dell'accumulo, variabile a seconda dei tessuti, e a un decorso nell'insieme meno grave e più prolungato della malattia.

Nell'uomo, nonostante l'esperienza relativa a circa 150 casi, per la maggior parte tipo I, non si è ancora giunti a conclusioni univoche. Numerosi fattori quali il tipo di donatore, il condizionamento immunologico, l'età di esecuzione, il grado di compromissione clinica e il tipo di m. influenzano la risposta al trapianto. Un donatore HLA compatibile è una premessa favorevole, mentre un donatore non HLA compatibile aumenta non solo la mortalità ma anche la morbidità perché richiede farmaci più tossici per evitare le reazioni di rigetto. Altra premessa favorevole è l'esecuzione precoce prima della comparsa di handicap fisico e mentale significativi (Hoogerbrugge *et al.*, 1995).

In linea generale i risultati del trapianto di midollo sembrano soddisfacenti nel tipo I, incostanti nel tipo II e scarsi o assenti nel tipo III.

Nei pazienti con m. tipo I trapiantati, soprattutto se il trapianto è avvenuto in giovane età, si assiste al miglioramento delle funzioni uditive, visiva, cardiaca, respiratoria, articolare, alla riduzione della ventricolomegalia e, in alcuni casi, del dismorfismo facciale (Whitley *et al.*, 1993). Le alterazioni scheletriche rimangono invariate, ma la crescita staturale continua.

Mentre è stata dimostrata una riduzione dell'accumulo a livello viscerale e una normalizzazione dell'escrezione urinaria di mucopolisaccaridi post-trapianto, non esiste ancora una sicura evidenza dell'efficacia sul sistema nervoso centrale. L'arresto del deterioramento neurologico, la progressione delle funzioni intellettive possono essere spiegati anche solo con il miglioramento delle funzioni extranervose e, in particolare, con il miglioramento dello stato di ossigenazione oppure, in considerazione dell'eterogeneità clinica, con la storia naturale della malattia. La correlazione genotipo-fenotipo sembra indispensabile per una corretta valutazione della risposta al trapianto di midollo.

In conclusione, al momento attuale i requisiti per il trapianto di midollo appaiono la giovane età, una condizione

clinica presintomatica o quasi, un donatore HLA compatibile e la possibilità di uno scrupoloso monitoraggio pre- e post-trapianto. In altre circostanze le indicazioni sono più discutibili e devono essere vagliate da una *équipe* di esperti insieme ai genitori. Nei soggetti con il tipo VI che non comporta difetto mentale, il trapianto di midollo non modifica la patologia ossea, ma può essere di beneficio in quanto migliora la capacità visiva e riduce l'ipossia cronica aggravante la patologia cardiaca.

Lo sviluppo della *terapia enzimatica* sostitutiva è stato limitato dal fattore costo/beneficio. All'elevato impegno scientifico ed economico per la produzione commerciale di un enzima efficace, non corrisponde un sufficiente numero di malati che ne possono usufruire.

Come per altre malattie genetiche, le aspettative sono rivolte alla *terapia genica*, le cui applicazioni in campo umano appaiono ancora lontane.

È stato sviluppato un vettore retrovirale contenente il gene della β -glicuronidasi capace di normalizzare il metabolismo di mucopolisaccaridi *in vitro* nei fibroblasti deficitari e *in vivo* infettando le cellule midollari del modello animale del tipo VII. L'espressione clinica del gene della β -glicuronidasi nelle cellule del sistema nervoso del topo affetto utilizzando un vettore derivato dall'*herpesvirus*, pur non producendo risultati clinici, sembra promettente per la correzione del difetto enzimatico a livello delle cellule nervose (Wolfe *et al.*, 1993).

Bibliografia

- Carozzo R., Tonlorenzi R. *et al.*, *Riv. It. Ped.*, 1994, 20, 68.
Fensom A. H., Bensom P., *Prenat. Diagn.*, 1994, 14, 1.
Hoogerbrugge P., Brouwer O. F., Bordigoni F. *et al.*, *Lancet*, 1995, 345, 1398.
Neufeld E. F., Muenzer K., *The Mucopolysaccharidoses*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, 7 ed., vol. II, McGraw-Hill, New York.
Whitley C. A., *The Mucopolisaccharidoses*, in McKusick V. A. ed., *Metabolic Disorders of Connective Tissue*, 1993, 5 ed., Mosby, St. Louis.
Whitley C. B., Belani K. G., Chang P. N. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 46, 209.
Wolfe J. H., Deshmane S. L., Fraser N. W., *Nature Genetics*, 1992, 1, 379.

ROSANNA GATTI

MUCOVISCIDOSI [v. vol. IX, coll. 2100-2123; Agg. I, coll. *5222-5237]

SOMMARIO

INTRODUZIONE	col. 3841
GENETICA	col. 3841
Il gene della mucoviscidosi (col. 3841): <i>Struttura del gene</i> . - <i>Espressione e localizzazione del CFTR</i> . - <i>Mutazioni</i> (col. 3842): <i>Metodiche per l'individuazione delle mutazioni</i> . - <i>Mutazioni del gene CFTR</i> . - <i>Correlazioni fenotipo-genotipo</i> .	
IPOTESI E TENTATIVI DI TERAPIA GENICA	col. 3844
Introduzione (col. 3844). - Razionale della terapia genica della mucoviscidosi (FC) (col. 3844). - Vettori per il trasferimento del gene CFTR-cDNA alle cellule delle vie respiratorie (col. 3845): <i>Retrovirus</i> . - <i>Adenovirus</i> . - <i>Vettori molecolari non virali</i> . - <i>Sperimentazione sull'uomo</i> (col. 3846). - <i>Prospettive future</i> (col. 3847).	
DIAGNOSI PRENATALE	col. 3848
Diagnosi prenatale biochimica (col. 3848). - Diagnosi prenatale molecolare (col. 3848).	
TERAPIA	col. 3850
Terapia antibiotica domiciliare e.v. (col. 3850). - Terapia dell'emotisi (col. 3851). - Principi di ossigenoterapia domiciliare (col. 3852): <i>Introduzione</i> . - <i>Modalità tecniche</i> . - <i>Vantaggi dell'O₂ liquido</i> . - Intervento nutrizionale nella mucoviscidosi (col. 3854): <i>Opoterapia</i> . - <i>Dietoterapia</i> .	

INTRODUZIONE

Nell'ultimo quinquennio l'intensificazione della ricerca, stimolata e favorita dalle conoscenze acquisite con la genetica molecolare applicata alla biologia umana, ha permesso di ampliare e approfondire temi di diagnosi, di clinica e di terapia della mucoviscidosi [m.] o fibrosi cistica [FC].

È stato così possibile migliorare ulteriormente la prognosi dei malati, aprire nuove possibilità di diagnosi precoce e individuare promettenti possibilità di terapia genica.

Alcune di queste acquisizioni hanno permesso di aggiornare la terapia, di liberalizzare la dieta e di migliorare la qualità della vita dei malati. Altre, costituiscono una base incoraggiante per affrontare con prospettive concrete di soluzione la prevenzione primaria della malattia mediante l'identificazione dell'eterozigote e della terapia genica mirata a correggere l'errore metabolico presente negli epitelii secretori dei malati e prevenire le alterazioni anatomico-funzionali progressive e irrefrenabili che da detto errore derivano.

GENETICA

Il gene della mucoviscidosi

Negli ultimi anni, c'è stato un sostanziale progresso nella genetica della m. o fibrosi cistica [FC].

Il gene che codifica il regolatore transmembrana della FC (CFTR) è stato identificato nel 1989 da almeno 3 gruppi di ricercatori dopo anni di ricerche (Rommens *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

Oltre alla comprensione del difetto patogenetico di base, l'isolamento del gene ha aperto nuove strade per una eventuale terapia genica (v. sotto; v. anche TERAPIA GENICA [v.*; v.**]).

Struttura del gene

Il gene CFTR abbraccia circa 230 kilobasi (230 000 basi) di DNA genomico sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q31).

Il locus è costituito da 27 esoni (regioni codificanti) numerati da 1 a 24 (tra cui 6a, b-14a, b-17a, b). La maggior parte di questi è costituita da un numero di coppie di basi compreso tra 50 e 250 (50-250 b.p.) con l'eccezione dell'esone 13 che abbraccia 723 coppie di basi.

Il gene in questione è stato chiamato CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (fig. 1). Codifica per una proteina di 1480 aminoacidi provenienti da una sequenza di DNA di circa 6,2 kb. La proteina CFTR appartiene alla famiglia delle proteine ABC-transporter superfamily. È costituita da 2 regioni simili, ognuna delle quali contiene: a) una regione nucleotide-legante (NBD: *Nucleotide [ATP] Binding Domain*); b) un dominio di legame di membrana (MSD: *Membrane Spanning Domain*).

La quinta regione chiamata dominio di regolazione (R-Domain) codifica per l'esone 13 il quale contiene substrati di legame multipli per la proteinkinasi A e C. Questa è una peculiarità unica del CFTR che non si ritrova in altre proteine ABC-transportatrici.

Espressione e localizzazione del CFTR

L'espressione del CFTR è evidenziata dalla dimostrazione di CFTR mRNA e della proteina CFTR.

La dimostrazione dell'mRNA CFTR include l'ibridazione *in situ*, la *northern blot*-analisi e la RT-PCR (in quest'ultima l'RNA messaggero [mRNA] è convertito a cDNA da una transcriptasi inversa; quindi il cDNA viene amplificato mediante una reazione a catena dall'enzima polimerasi [PCR]).

La proteina CFTR è stata evidenziata da una varietà di antisieri policlonali e anticorpi monoclonali diretti contro il CFTR; in entrambi i casi, nella loro preparazione sono stati usati peptidi CFTR come fonti immunogene.

Attualmente l'espressione del CFTR è stata localizzata negli epitelii delle seguenti strutture d'organo: dotti pancreatici, dotti delle ghiandole salivari, bronchi, canalicoli biliari, cripte intestinali (Robert *et al.*, 1995).

Durante lo sviluppo fetale l'espressione del CFTR è stata accertata dalla 18ª settimana nel pancreas, dotti genitali, polmone e intestino.

Mutazioni

Metodiche per l'individuazione delle mutazioni

Le tecniche per lo studio delle mutazioni impiegano DNA genomico o RNA messaggero (Saiki, 1988) poiché non è possibile analizzare 230 kilobasi di DNA per ogni mutazione, particolarmente per un locus che non esibisce delezioni o riarrangiamenti strutturali, per cui loci come questi sono analizzabili mediante la tecnica dei campi pulsanti su gel-elettroforesi utile per individuare una piccola quantità di geni mutanti.

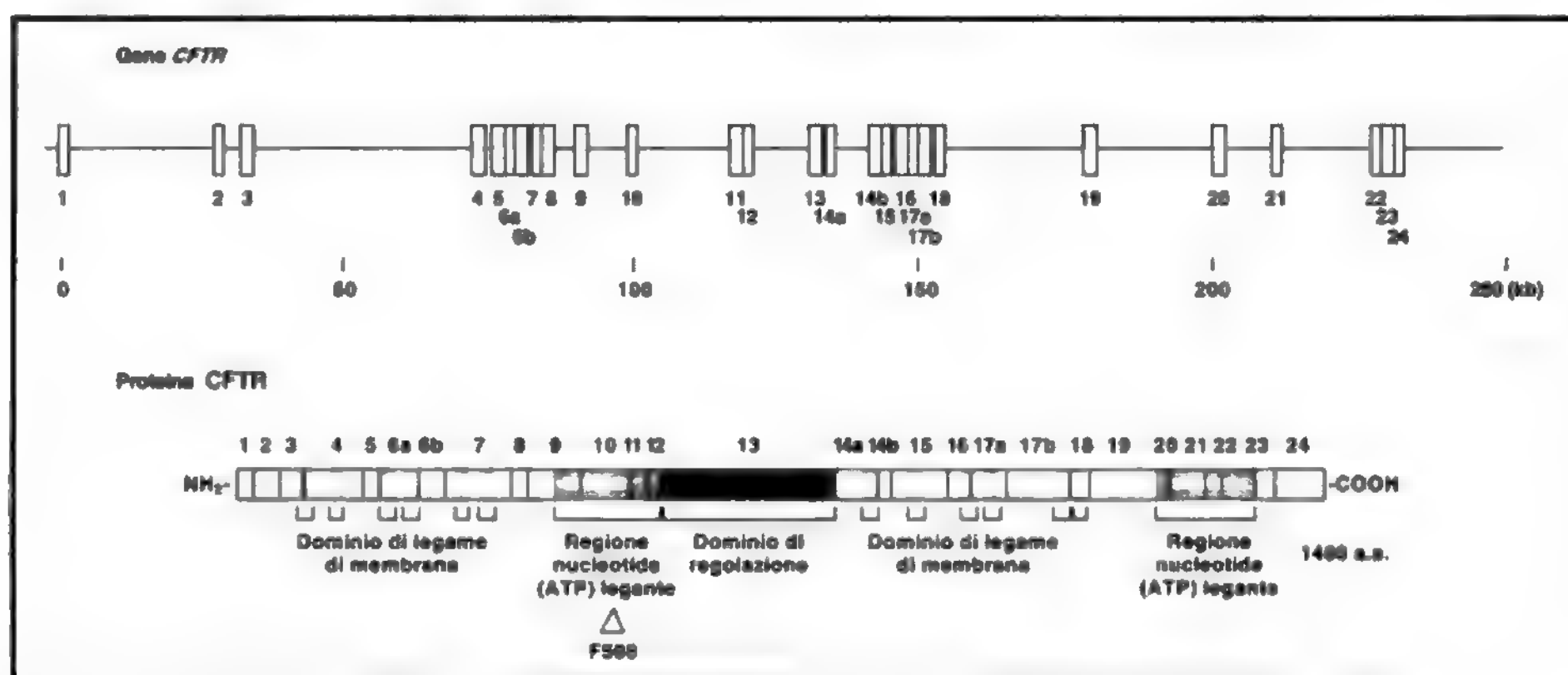


Fig. 1. In alto: struttura del gene CFTR. In basso: corrispondente proteina CFTR.

Le mutazioni del gene *CFTR* sono analizzate mediante la amplificazione PCR (*polymerase chain reaction*) di esoni grandi 100-200 b.p. (paia di basi) di DNA.

Mutazioni del gene *CFTR*

Al 1996 sono state identificate oltre 600 mutazioni del gene *CFTR* (Collins, 1996). La stragrande maggioranza di esse, comunque, è stata descritta in uno o pochi pazienti e possono venir definite mutazioni «private».

Più mutazioni sono state scoperte nello stesso gene: mutazioni *missense*, delezione di una base, mutazioni *non sense*, mutazioni *frameshift*, mutazioni *splice*, piccole inserzioni e infine piccole delezioni.

Molte delle suddette mutazioni sono state determinate solo a livello di DNA. È quindi possibile che alcune di esse possano rappresentare dei polimorfismi piuttosto che mutazioni causanti la malattia.

Nella fig. 2 viene schematizzato come il gene *CFTR* sia costituito da 5 domini: a) due domini di legame di membrana (MSD; contribuiscono alla formazione del canale del cloro; le mutazioni di questi domini alterano la selettività del canale agli anioni); b) due domini di legame con nucleotidi (NBD; regolano le interazioni del canale con i nucleotidi citoplasmatici); c) un dominio unico di regolazione (*R-Domain*) che controlla anch'esso l'attività del canale del cloro; la sua fosforilazione mediata da una proteinkinasi cAMP-dipendente è richiesta per l'apertura del canale. Non sono escluse tuttavia altre funzioni.

Le mutazioni del gene *CFTR* possono trovarsi in uno dei 5 domini.

1. Mutazioni nel primo dominio di legame di membrana (MSD): 621+1G→T è una mutazione *splicing* (v.***) (Welsh *et al.*, 1995).

2. Mutazioni nella prima piega nucleotide-legante (NBD). Qui si trova la mutazione più frequente del *CFTR* nella popolazione affetta da m. del Nord Europa (70%). Riguarda l'esone 10 ed è chiamata *ΔF508*. Funzionalmente determina una alterazione temporale di apertura del canale del cloro (Cl⁻). La proteina CFTR nella maggior parte dei casi rimane intrappolata nel citoplasma a livello dell'apparato del Golgi e del reticolo endoplasmatico.

Altre mutazioni dell'NBD sono *ΔI507*, la *G551D*, mutazioni *stop* 553, *Glycine 542* e mutazioni *splicing* all'inizio dell'esone 11 (1717-1 G→A).

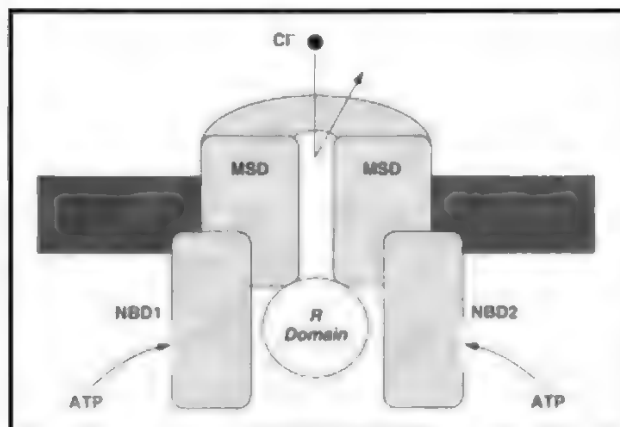


Fig. 2 I 5 domini della struttura del gene *CFTR*. *R-Domain*: dominio di regolazione; *MSD* (Membrane Spanning Domain): dominio di legame di membrana; *NBD* (Nucleotide [ATP] Binding Domain): dominio nucleotide-legante.

3. Mutazioni del dominio di regolazione (*R-Domain*): contiene poche mutazioni nessuna delle quali frequente. Si tratta in particolare di mutazioni *frameshift*.

4. Mutazioni del secondo dominio di legame di membrana (MSD): poche mutazioni sono state definite in questo dominio.

5. Mutazioni dell'altro secondo dominio di legame di membrana (MSD): vi si trovano mutazioni associate alla malattia. Mutazioni multiple sono state localizzate negli esoni 19 e 20. Una di queste è sufficientemente comune, si tratta di una mutazione «stop»: *W1282X* (molto frequente a Gerusalemme). Un'altra abbastanza comune (sostituzione di una asparagina con lisina) è la *N1303K*.

Correlazioni fenotipo-genotipo

È difficile costruire un iter prognostico sulla severità della malattia in base alla particolare mutazione in un paziente affetto da m. Ad es. si può dire che l'insufficienza pancreatica è legata all'omozigosi *ΔF508*, ma non si può dire che negli omozigoti per questa mutazione la malattia sia sicuramente più grave. Gli omozigoti per la *G542X* hanno una malattia più moderata. Esiste una parte della popolazione affetta da m. che presenta mutazioni indefinite. In questi casi la genetica è basata sull'uso di polimorfismi del DNA. Tuttavia alcune famiglie rimangono non-informative rispetto a tutti i siti polimorfici (Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993).

Bibliografia

- Collins F. S., *Fed. Pneumol.*, 1996, **Suppl. 13**, 75.
Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329** (18), 1308-1313.
Kerem B. *et al.*, *Science*, 1989, **245**, 1073-1089.
Riordan J. R. *et al.*, *Science*, 1989, **245**, 1066-1073.
Robert J. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 575-587.
Rommens J. M. *et al.*, *Science*, 1989, **245**, 1059-1065.
Saiki R. K. *et al.*, *Science*, 1988, **239**, 487-491.
Tsui L.-C., Buchwald N., *Adv. Hum. Genet.*, 1991, **20**, 153.
Tsui L.-C., *Trends Genet.*, 1992, **8**, 392-398.
Welsh M. J., Tsui L.-C., Boat F. F., Beaudet A. L., *Cystic Fibrosis*, in Scriver C. R. *et al.*, *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 1995, McGraw-Hill, New York, pp. 3799-3876, *bibl.*

IPOTESI E TENTATIVI DI TERAPIA GENICA

Introduzione

Come precedentemente detto la mutazione più frequente del gene *CFTR* è costituita dalla delezione di 3 paia di basi, cui corrisponde una proteina CFTR che manca di 1 aminoacido (la fenilalanina) in posizione 508; da cui il nome *ΔF508* che ha ricevuto tale mutazione. Interessa circa il 70% di tutte le FC nelle popolazioni anglosassoni e del Nord Europa, mentre nell'area Mediterranea non supera il 50%.

La ricerca in questo campo ha aperto nuove strade per un'eventuale terapia genica. Il gene *CFTR* normale potrebbe essere trasferito all'epitelio bronchiale e ristabilire il fisiologico flusso transmembrana dello ione cloro, correggendo pertanto il difetto di base della malattia.

La terapia genica di malattie recessive come la FC (o m.) trova la sua giustificazione nell'osservazione che gli eterozigoti per la malattia sono fenotipicamente normali. Ciò implica che la corretta espressione del gene normale non è compromessa dalla co-presenza dell'allele mutato e, quindi, che l'eventuale inserimento nella cellula malata della copia genica normale potrebbe complementare il difetto. Questo tipo di terapia genica può essere definito come «aggiunta genica» dato che si aggiunge, senza sostituire, una copia della sequenza normale al corredo genetico cellulare mutato.

Razionale della terapia genica della mucoviscidosi (FC)

Il gene *CFTR* viene espresso nella membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie respiratorie, dei dotti pancreatici, dei canalicoli biliari, delle cripte intestinali e delle ghiandole sudoripare (Robert *et al.*, 1995).

Poiché le manifestazioni respiratorie della malattia dominano il quadro clinico, le vie aeree sono il bersaglio più razionale e accessibile per la terapia genica della FC. Questa osservazione è basata sui seguenti dati:

a) la malattia respiratoria è confinata all'epitelio delle vie aeree;

b) è stato dimostrato *in vitro* che il trasferimento del *CFTR-cDNA* (*copy-DNA*) all'epitelio di linee cellulari derivate dall'epitelio respiratorio corregge il difetto del canale del cloro;

c) le conseguenze letali della mutazione genica avvengono quasi esclusivamente nel polmone.

La strategia per il trattamento delle manifestazioni respiratorie della m. presuppone che il *CFTR* umano normale (*CFTR-cDNA*) sia trasferito all'epitelio delle vie respiratorie dove può esprimere la proteina CFTR corretta e ripristinare la cloro-secrezione AMPc-mediata in queste cellule.

Il *CFTR* può essere efficientemente trasferito all'epitelio respiratorio usando come vettore un adenovirus ricombinante seguendo il seguente procedimento.

1) L'Adenovirus tipo 2 (deficiente in replicazione poiché mancante delle regioni geniche E1 ed E3 [*replicant-deficient*]) contenente il *CFTR-cDNA* viene trasferito all'epitelio delle vie respiratorie.

2) Giunto all'epitelio il vettore virale interagisce con le cellule attraverso uno specifico recettore e viene trasportato all'interno della cellula ospite.

3) Entra in un endosoma (organulo citoplasmatico) che lo veicola verso il nucleo della cellula ospite.

4) Durante il trasporto il vettore perde il suo rivestimento proteico, che esce dall'endosoma.

5) Il DNA virale che contiene il *CFTR-cDNA* entra nel nucleo della cellula e funge come un epi-cromosoma aggiuntivo che è in grado di codificare (esprimere) per la proteina CFTR attraverso una normale sintesi proteica (quindi con produzione di mRNA).

L'avvenuto trasferimento del *CFTR-cDNA* e la sua eventuale espressione proteica viene valutata in un campione di epitelio respiratorio sul quale si verifica la presenza di: a) RNA messaggero derivante dal *CFTR-cDNA*; b) proteina CFTR sulle membrane apicali delle cellule respiratorie.

È inoltre possibile misurare *in vivo* le variazioni di differenza di potenziale elettrico, prima e dopo il trasferimento del *CFTR-cDNA* indotte dal corretto funzionamento del canale del cloro AMPc-dipendente, che induce una diminuzione del potenziale elettrico transmembrana delle cellule epiteliali nasali.

Vettori per il trasferimento del gene *CFTR-cDNA* alle cellule delle vie respiratorie

Retrovirus

Sono i vettori più efficienti impiegati in terapia genica (v.*; v.***) e sono stati i primi ad essere usati per esperimenti riguardanti il trasferimento del *CFTR-cDNA* in colture cellulari di pazienti affetti da m. (Miller *et al.*, 1990). Tuttavia in esperimenti su animali *in vivo* sono risultati inefficaci, dato che la loro alta efficienza di infezione è subordinata al ciclo replicativo cellulare, molto ridotto nelle cellule delle vie respiratorie (Scarpa *et al.*, 1993).

Adenovirus

Sono provvisti di un elevato tropismo per il polmone e sono stati scelti per la costruzione di vettori sicuri ed efficaci per trascrivere ed esprimere il gene codificante per la proteina CFTR. Gli adenovirus ricombinanti usati in terapia genica sono derivati dai virus presenti in natura e differiscono dai virus nativi perché con delezione nelle regioni E1 ed E3,

codificanti per proteine precoci, non necessarie per il ciclo virale (Scarpa *et al.*, 1993).

I vantaggi sono rappresentati da:

a) alto titolo > 10¹⁰ p.f.u. (*plaque forming units*);

b) buon tropismo per l'apparato respiratorio;

c) utilizzabile per l'infezione di vari tessuti;

d) consolidata esperienza positiva nel suo utilizzo come vaccino.

Di contro presentano i seguenti svantaggi:

a) limitata lunghezza della sequenza da trasdurre;

b) presenza di numerose sequenze naturali virali nei vettori ricombinanti;

c) risposta anticorpale dopo somministrazioni ripetute;

d) a dosaggi elevati determina incremento di IL-6.

Al 1994 i numerosi esperimenti condotti su modelli animali (Francia, Olanda, USA) hanno dimostrato che l'Adenovirus ricombinante con *CFTR-cDNA* (-E1) somministrato per aerosol o in corso di broncoscopia, residua nelle vie respiratorie per circa 3 settimane. Tuttavia ripetute somministrazioni evocano nell'ospite una risposta immune suscitata da proteine capsidiche che potrebbe bloccare il processo di trasfezione del vettore.

Vettori molecolari non virali

Si tratta di sostanze chimiche di sintesi in grado di veicolare materiale genetico all'interno della cellula. Le sostanze più usate sono lipidi cationici (lipofectine) che, in presenza di DNA disciolto in soluzione acquosa si assemblano in micelle simil-liposomiali, contenenti all'interno il DNA e all'esterno cariche positive disponibili per l'interazione elettrostatica con la superficie delle membrane cellulari.

La trasfezione di cellule eucariotiche, mediata da liposomi, potrebbe rappresentare una valida alternativa ai vettori virali per l'assenza di risposta anticorpale o di effetti tossici sulla cellula (Scarpa *et al.*, 1993), ma hanno lo svantaggio di scarsa efficienza di trasfezione *in vivo* nei tessuti epatico, muscolare e nervoso.

In U.K. sono state adottate metodiche di trasfezione con i vettori liposomiali in quanto non generano risposta immune. I liposomi (v.*) sono meno efficaci degli Adenovirus ma comunque in grado di correggere temporaneamente il difetto bioelettrico in gatti FC transgenici.

Sperimentazione sull'uomo

Studi *in vitro* hanno mostrato che il trasferimento del *CFTR-cDNA* normale all'epitelio di linee cellulari derivanti da pazienti affetti da FC può correggere l'anomalia di base e permettere a queste cellule di secernere cloro in risposta all'aumento intracellulare di cAMP. Il *CFTR* codifica per un canale di membrana, AMPc-dipendente, che regola il flusso dello ione cloro. Questo canale è situato sulla superficie delle cellule epiteliali.

I vettori adenovirali ricombinanti possono trasferire il normale *CFTR-cDNA* all'epitelio delle vie respiratorie di animali da esperimento *in vivo*, con almeno 6 settimane di espressione genica CFTR corretta.

Il primo esperimento di trasferimento di *CFTR-cDNA* normale su pazienti affetti da FC è stato effettuato negli U.S.A. nel 1993 (Crystal *et al.*, 1993). È stata dimostrata la possibilità del trasferimento genico nel malato, anche se l'espressione di esso è stata di breve durata. Inoltre è stata constatata la capacità del virus di causare alcuni effetti collaterali (cefalea, febbre, dispnea, ipertensione, diminuzione della capacità vitale).

Questa risposta non era stata osservata negli animali da esperimento i quali avevano ricevuto anche dosaggi più elevati. Questo a riprova che gli esperimenti sugli animali non sempre si correlano con l'uomo.

Un altro esperimento di trasferimento del *CFTR-cDNA*

su pazienti affetti da FC ha permesso di correggere il difetto di base per circa 3 settimane (Zabner *et al.*, 1993).

Gli Adenovirus, pur essendosi dimostrati vettori efficaci, determinano problemi da risolvere, quali l'infiammazione da loro indotta, la risposta immune nell'ospite verso la loro somministrazione nonché il rischio di ricombinazione con ceppi di virus selvaggio.

In U.K. è stato usato il liposoma (complessato con un complementare *CFTR-cDNA*), somministrato mediante pompa nasale *spray*, come vettore per il trasferimento del gene *CFTR-cDNA* sull'epitelio nasale, seguito da una modesta restorazione (20% circa) del *CFTR*. Tuttavia la durata di espressione genica è stata breve (circa 4 giorni) (Caplen *et al.*, 1995). Sono in corso altre sperimentazioni controllate (Porteous *et al.*, 1997).

Questi dati preliminari aprono interrogativi sulla efficacia, sui possibili effetti tossici e sui rischi di accumulo legati alla struttura biochimica dei liposomi stessi.

Nel 1996 sono stati sottoposti a terapia genica oltre 100 malati (Crystal, 1996).

Prospettive future

Malgrado che gli studi fin qui condotti abbiano chiaramente dimostrato che sia il vettore Adenovirus che il liposoma sono in grado *in vivo* sull'uomo di trasferire il *CFTR-cDNA* all'epitelio delle vie respiratorie, è emerso che i vettori e le tecniche finora usate sono ancora lontani dall'aver dato risposte soddisfacenti (Dodge *et al.*, 1995).

Un buon vettore infatti deve essere in grado di trasferire il *CFTR-cDNA* almeno al 5-10% delle cellule delle vie respiratorie e deve essere in grado di trasferirlo permanentemente senza indurre effetti tossici, risposte immuni o infiammazione delle vie aeree.

I primi dati disponibili indicano che allo stato attuale l'adenovirus non è in grado di soddisfare queste esigenze.

Per eliminare la risposta immune, finora registrata, sono stati validati vettori adenovirali di III generazione incapaci ad attivare il CD4 linfocitario a formare anticorpi (Wilson).

Il liposoma ci offre un grado di sicurezza ottimo ai bassi dosaggi, tuttavia la sua efficienza nel trasferire il *CFTR-cDNA* alla cellula epiteliale respiratoria è bassa. Questa inefficienza di trasfezione genica richiede numerose dosi di liposomi. È attualmente in sperimentazione una nuova formulazione «# 67; DOPE» che ha mostrato una espressione genica marcatamente più alta (Lee *et al.*, 1996).

Altre possibilità da valutare sono offerte da nuovi lipidi (CD colesterolo) e dalla combinazione di un vettore *promoter* (Cytomegalovirus) con un efficace vettore (*translater*) in presenza di un potenziatore (*enhancer*) in modo da ampliare la regione codificante da trasferire.

Altro modello è offerto dalle caratteristiche mutuamente potenzianti di complessi adenovirus + liposoma + plasmide.

In realtà la sola forma di terapia genica che potrebbe curare la FC in tutte le sue manifestazioni (respiratorie, intestinali, pancreatiche, riproduttive, epatiche etc.) dovrebbe essere l'inserzione del normale gene nelle cellule embrionali durante la vita fetale (Dodge, 1995).

In parallelo ai tentativi di terapia genica, sono state sviluppate nuove strategie di terapia farmacologica tendenti a normalizzare lo squilibrio idroelettrolitico delle secrezioni bronchiali (Boucher, 1996) o a idrolizzare il DNA e a dissaggregare i filamenti di actina (Vasconcellos, 1994) di cui è ricco il secreto catarrale FC.

Bibliografia

Boucher R.C., *Fed. Pneumol.*, 1996, Suppl. 3, 86.
Caplen N. J. *et al.*, *Nature Medicine*, 1995, 1, 39-46.

Crystal R. G. *et al.*, *Nature Genetics*, 1993, 8, 42-51.
Crystal R. G., *Fed. Pneumol.*, 1996, Suppl. 13, 91.
Dodge J. A., *Nature Medicine*, 1995, 1, 182.
Knowles M. R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 823-831.
Miller D. G. *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10, 4239-42.
Lee E. R. *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1996, 7, 1701-1717.
Porteous D. J. *et al.*, *Gene Ther.*, 1997, 4, 210-218.
Robert J. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, 151, 575-587.
Scarpa M. *et al.*, *Prospettive in Pediatria*, 1993, 23, 107-113.
Vasconcellos C. A., *Science*, 1994, 263, 969-971.
Yang Y. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, 7, 362-369.
Zabner J. *et al.*, *Cell*, 1993, 75, 207-216.
Zielenski J. *et al.*, *Cystic Fibrosis. Fifth Symposium*-Tubingen, 1994.

DIAGNOSI PRENATALE

La diagnosi prenatale di m. si avvale attualmente dell'impiego di due metodiche: l'analisi biochimica e l'analisi molecolare. Nei casi in cui la diagnosi di gravidanza venga effettuata dopo la 10ª settimana o nella donna nella quale lo studio del DNA non sia disponibile o risulti non informativo, si ricorre alla diagnosi biochimica.

Diagnosi prenatale biochimica

La diagnosi prenatale biochimica si basa sul dosaggio di alcuni enzimi dei microvilli (gamma-glutamyltransferasi, leucaminopeptidasi, fosfatasi alcalina totale e differenziata) contenuti nel liquido amniotico, prelevato in 18ª settimana di gestazione mediante amniocentesi. Il marker biochimico più significativo per m. è rappresentato dalla fosfatasi alcalina ed in particolare dal suo isoenzima intestinale.

L'attività di tali enzimi raggiunge un picco massimo tra la 17ª e la 18ª settimana di gestazione, per poi decrescere subito dopo. Nei feti affetti da m., l'attività enzimatica risulta depressa in seguito all'ostruzione intestinale che impedisce il passaggio di enzimi nel liquido amniotico. Questo comportamento, tuttavia, è transitorio ed è possibile rilevarlo solo nel periodo di maggiore attività degli enzimi, che risulta essere la 18ª settimana. Pertanto, è opportuno valutare ecograficamente l'esatta epoca gestazionale della paziente ed effettuare il prelievo in tale periodo.

L'affidabilità diagnostica in termini di specificità e di sensibilità è pari al 95-98% nelle gravidanze di genitori eterozigoti obbligati, perciò con rischio 1:4 di m. nel feto.

L'analisi biochimica, eventualmente associata allo studio del DNA fetale, può essere utilizzata per monitorizzare le gravidanze dei consanguinei dei pazienti, degli eterozigoti obbligati o delle coppie senza familiarità per m. con reperto di intestino iperecogeno del feto.

Diagnosi prenatale molecolare

La diagnosi prenatale molecolare viene effettuata mediante lo studio del DNA estratto da un campione di villi coriali prelevato, mediante villocentesi, in epoca precoce (8ª-10ª settimana di gestazione). Tale metodica può essere condotta secondo due modalità: analisi diretta e analisi indiretta.

L'analisi diretta può essere applicata alle famiglie nelle quali la specifica mutazione è stata precedentemente individuata (o nella coppia a rischio o con un figlio vivente affetto) e consiste nella ricerca diretta delle mutazioni del gene. Con l'analisi diretta l'accuratezza diagnostica è del 100%, in quanto l'identificazione della presenza o assenza della mutazione è sicura.

In realtà il grande numero di mutazioni individuate e la loro relativa bassa frequenza rende necessario ricorrere, nella maggior parte dei casi, all'analisi molecolare con metodo indiretto che consiste nello studio dei polimorfismi di restrizione (RFLP), tratti di DNA risultati polimorfici nei diversi soggetti esaminati, utilizzati come marcatori genici (V. POLIMORFISMI GENETICI*; SONDE MOLECOLARI*).

Requisito essenziale per tale studio è la disponibilità dell'analisi dei polimorfismi presenti nei genitori e in un precedente figlio affetto vivente per valutare la fase di *linkage* tra i marcatori molecolari e il gene della m. (famiglie informative).

L'impiego di sonde sempre più vicine al gene e recentemente l'uso di marcatori intragenici che non presentano ricombinazione (*analisi semidiretta*) o di polimorfismi a inserzione/delezione del tipo «microsatelliti», ha consentito di estendere l'informatività alla quasi totalità delle famiglie, riducendo drasticamente la possibilità di errore diagnostico.

Considerata globalmente, l'analisi molecolare ha un'attendibilità più elevata (98-99%) rispetto all'indagine biochimica, sebbene un ridotto rischio di falsi negativi esista e sia legato essenzialmente a contaminazione del campione con DNA materno.

D'altra parte, grazie alla disponibilità di tecniche molecolari rapide e riproducibili come l'amplificazione genica (PCR [v.*; v.**]), lo studio molecolare consente di fornire una risposta precoce alla coppia entro la fine del I trimestre di gravidanza, epoca in cui la scelta di interruzione di gravidanza è meno gravosa per la coppia.

Esistono già in commercio kit basati sulla amplificazione genica specifica (ARMSI Amplification Refractory Mutation System). Per la loro trattazione si rinvia alla voce GENETICA*, *diagnosi molecolare delle malattie genetiche*.

Recentemente, lo sviluppo della tecnica di fecondazione *in vitro* e la disponibilità della PCR hanno permesso di dare inizio a un nuovo modello di diagnosi prenatale: la diagnosi pre-impianto (v. PRENATALE DIAGNOSI*, coll. *6057-6058) dell'embrione, il cui principio si basa sull'analisi del genotipo di un oocita prima della fecondazione *in vitro*, o di 1 o 2 blastomeri da un embrione di 8 cellule, e quindi prima dell'impianto, con l'ovvio vantaggio di evitare l'interruzione di gravidanza (Lin *et al.*, 1994). Nel caso studiato da Handside *et al.* (1992), è stato possibile impiantare in utero l'embrione sano, con la nascita di una bambina normale.

I recenti orientamenti mirano ad offrire il test genetico ai parenti dei pazienti affetti e ai loro partners secondo il cosiddetto *screening a cascata* (Super *et al.*, 1994). Tale modello prevede che, a partire dai genitori di un malato, il test di *screening* si estenda fino alla parentela più lontana per coinvolgere progressivamente un numero sempre maggiore di coppie che sarebbero così maggiormente sensibilizzate e motivate a partecipare al programma.

Infine sono in corso studi pilota finalizzati a definire le strategie ottimali per indirizzare lo *screening* e la consulenza genetica alle donne in gravidanza e ai loro partners in assenza di familiarità per m. (Livingstone *et al.*, 1994; Miedzybrodzka *et al.*, 1995).

L'offerta di uno *screening* per la m. in epoca precoce di gravidanza (in tempo utile a fornire alla eventuale coppia di portatori i test prenatali molecolari per l'interruzione di gravidanza selettiva) è sicuramente accolta con maggiore favore.

In particolare sono stati analizzati due modelli di *screening*: il modello sequenziale (Mennie *et al.*, 1992) e il modello di coppia (Wald, 1991). Quello che sembra godere di maggiore favore è il modello sequenziale (Miedzybrodzka *et al.*, 1995) che non considera la coppia come una unità da informare dei risultati solo nell'eventualità della positività al test di entrambi i membri (modello di coppia), ma sottopone a *screening* individualizzato dapprima la donna informandola della propria condizione e successivamente, solo se risultata positiva al test, anche il partner.

Sebbene più lungo e articolato, tale programma ha il vantaggio di informare dello stato di portatore il singolo individuo che pertanto è conscio del rischio personale a pro-

creare e può inoltre estendere l'informazione in seno alla famiglia.

Per la diagnosi di m. dei pazienti, soprattutto per quelli con quadri clinici atipici, si faccia riferimento all'articolo di R. C. Stern (1997).

Bibliografia

- Handside A. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 588.
 Kant J. A. *et al.*, *Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis*, in McPherson R. A. ed., *Chimes in Laboratory Medicine*, 1995, **15** (4), Saunders, Philadelphia, pp. 877-898, *biol*.
 Korf B., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332** (18), 1218, 1220.
 Korf B., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332** (22), 1499-1502.
 Liu J., Lissens W., Silber S. J. *et al.*, *JAMA*, 1994, **272**, (23), 1858-1860.
 Livingstone J., Axton R. A., Mennie M. *et al.*, *BMJ*, 1994, **308**, 1459-1560.
 Marigo C. *et al.*, *Mol. Cell Probes*, 1995, **9**, 139.
 Mennie M. E., Gillilan A., Compton M. *et al.*, *Lancet*, 1992, **340**, 214-216.
 Miedzybrodzka Z. H., Hall M. H., Mollison J. *et al.*, *BMJ*, 1995, **310**, 353-357.
 Stern R. C., *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336** (7), 487-491.
 Super M., Schwarz M. J., Malone G. *et al.*, *BMJ*, 1994, **308**, 1462-1468.
 Wald N. J., *Lancet*, 1991, **338**, 1318-1319.

TERAPIA

Terapia antibiotica domiciliare e.v.

La terapia antibiotica endovenosa (e.v.) costituisce nella m. un elemento indispensabile per il controllo dell'infezione batterica responsabile della evoluzione della broncopneumopatia cronica.

Per molti anni la maggior parte dei cicli di terapia antibiotica è stata effettuata in regime di ricovero ordinario per la difficoltà di organizzare servizi territoriali di supporto che ne garantissero la corretta esecuzione domiciliare.

L'ospedalizzazione però, pur permettendo adeguate soluzioni tecniche, incide sulla qualità di vita dei pazienti affetti da malattie croniche, è costosa e favorisce il rischio di infezioni crociate da ceppi di *Pseudomonas* multiresistenti e di nuovi patogeni emergenti come la *Burkholderia cepacia*, l'*Alcaligenes xylosoxidans*, lo *Pseudomonas maltophilia* (Geddes, 1992).

Recentemente si sono resi disponibili contenitori elastomerici costituiti da un palloncino composto da vari strati di lattice di gomma sovrapposti e tenuti insieme da particolari ponti di legame. Questo tipo di contenitore consente di infondere soluzioni ad una velocità determinata dalla pressione costante che le pareti esercitano sul liquido da infondere. Il sistema infusionale è indipendente dalla gravità e consente libertà di movimento al paziente durante l'intera durata della terapia (Pound *et al.*, 1994; Quattrucci *et al.*, 1995).

Il «reservoir» elastomerico protetto da un contenitore esterno, è collegato mediante una microcannula dotata di filtro integrale di 1.2 µ ad un tubicino provvisto di terminale «luerlock» capace di adattarsi a qualsiasi sistema di infusione (ago, agocannula, catetere) (fig. 3).

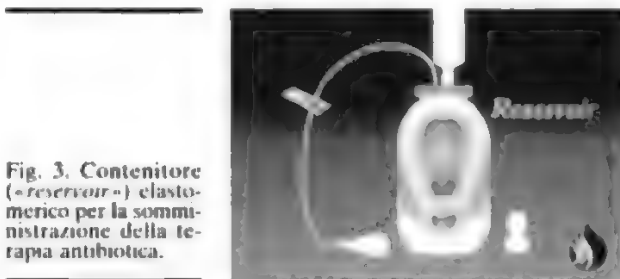


Fig. 3. Contenitore («reservoir») elastomerico per la somministrazione della terapia antibiotica.

Gli infusori vengono preparati in ambiente ospedaliero per un fabbisogno medio personalizzato di circa 8 giorni, consegnati al malato che li conserva refrigerati a domicilio, secondo una tabella di stabilità specifica per ogni antibiotico (Antonelli *et al.*, 1996).

La terapia antibiotica in questo modo può essere eseguita a domicilio favorendo una maggiore compliance terapeutica e una migliore qualità di vita del paziente. Inoltre essa garantisce la asepsi nella preparazione del farmaco, la sicurezza della posologia e diluizione dell'antibiotico, la standardizzazione della velocità di flusso.

Bibliografia

- Antonelli M. *et al.*, *II Intern. Congr. Ped. Pneumol.*, 1996, **1**, 170-173.
 Geddes D., *Atti del Seminario su terapia domiciliare nella Fibrosi Cistica*, Verona, 16 maggio 1992, *CF Notizie*, 1992, **1**,
 Hammond I. J. *et al.*, *Pediatr. Health Care*, 1991, **5**, 24-30.
 Pound M. N. *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 1994, **7** (9), 1640-1644.
 Quattrucci S., Pigna M., Antonelli M., *III Congresso Nazionale Gruppo di Lavoro per la Fibrosi Cistica*, Firenze 17-18 febbraio 1995, pp. 22-25.

Terapia dell'emottisi

La m. è una delle cause principali di emottisi negli adolescenti e negli adulti (Stern *et al.*, 1978).

I fattori coinvolti nel determinare emottisi nei pazienti con m. sono: la distruzione del parenchima polmonare e l'erosione dei vasi sanguigni in conseguenza di infezioni broncopneumoniche e lo sviluppo di anastomosi delle arterie bronchiali con vasi polmonari arteriosi sottoposti all'ipertensione polmonare e all'aumento del flusso sanguigno.



Fig. 4. Embolizzazione delle arterie bronchiali.

Il trattamento chirurgico è stato finora limitato ai casi di emottisi massive e di emottisi recidivanti.

L'embolizzazione delle arterie bronchiali (fig. 4) è ritenuta oggi l'intervento più efficace (Brinson *et al.*, 1998; Cipolli *et al.*, 1995).

L'indicazione per effettuare l'angiografia ed eventualmente l'embolizzazione di vasi sanguigni sono:

- a) emottisi massiva (> 300 ml) seguita da episodi di emottisi di piccola entità ravvicinati nel tempo;
- b) tre o più episodi di emottisi intermedia (fino a 300 ml) in una settimana;
- c) episodi di piccole emottisi ricorrenti tale da interferire con la qualità di vita del paziente;
- d) episodi di emottisi di piccola o media entità che impediscono le quotidiane sedute di fisioterapia.

L'arteriografia evidenzia in tutti i pazienti con emottisi anastomosi tra il circolo sistemico e quello bronchiale, vasi tortuosi e dilatati sicuramente correlati con la riaccutizzazione della pneumopatia cronica: l'embolizzazione deve essere integrata da terapia antibiotica dell'infezione polmonare da *Staphylococcus aureus* e/o da *Pseudomonas aeruginosa* (Cipolli *et al.*, 1995; Antonelli *et al.*, 1996).

L'esperienza personale ha evidenziato che la maggior parte dei pazienti che presentano episodi di emottosi sviluppano entro pochi mesi emottisi: quindi l'emoftoe, oltre che le condizioni cliniche globali del paziente, costituisce un segno precoce che suggerisce di valutare mediante arteriografia la situazione del letto vascolare polmonare e procedere all'embolizzazione precoce. I pazienti sottoposti precocemente ad arteriografia e quindi ad embolizzazione delle arterie bronchiali presentano un follow-up clinico migliore rispetto al periodo precedente il trattamento chirurgico.

Bibliografia

- Antonelli M. *et al.*, *II Intern. Congr. Ped. Pneumol.*, 1996, **1**, 168-169.
 Brinson G. M. *et al.*, *Am. J. Crit. Care Med.*, 1998, **157**, 1951-1958.
 Cipolli M., Perini S., Valletta E. A., Mastella G., *Pediatric Pulmonology*, 1995, **19**, 344-347.
 Stern R. C., Robert E., Wood R. E., Thomas F., Boat T. F. *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1978, **117**, 825-828.

Principi di ossigenoterapia domiciliare

Introduzione

Il carattere letale della m. è ben impresso nella coscienza della quasi totalità dei malati (95%) a causa dal progressivo peggioramento della pneumopatia evolutiva che sfocia nell'insufficienza respiratoria. Questa è una condizione che esprime l'incapacità del sistema respiratorio di scambiare adeguatamente O_2 e CO_2 con l'ambiente esterno.

Pur se sospettabile con criteri clinici, la insufficienza respiratoria è definita in modo corretto solo dai valori delle pressioni dei gas nel sangue arterioso (emogasanalisi) (tab. I).

L'insufficienza respiratoria determina ipossiemia.

Sintomi e segni dell'ipossiemia sono i seguenti.

TAB. I. ANALISI DEI GAS EMATICI

Valori normali	Insufficienza respiratoria cronica
$PaCO_2$ = 35-45 mmHg	$PaCO_2$ > 45 mmHg
PaO_2 = 85-95 mmHg	PaO_2 < 60 mmHg
pH = 7,35-7,45	pH: variabile
HCO_3^- = 22-28 mmol/l	HCO_3^- > 28 mmol/l

a) Disturbi psichici (disorientamento, confusione mentale, scadimento della funzione cognitiva).

b) Tachicardia.

c) Cianosi: colorito blastro del prolabio, delle estremità che compare quando la percentuale di ossiemoglobina è < del 5% (paziente con Hb normale: ≥ 12 g%).

Il trattamento deve essere il più conservativo possibile. Il cardine della terapia è l'ossigenoterapia (v.; v.*) attenendosi, nello stabilire la dose, ai seguenti criteri:

1. O_2 in quantità sufficiente a raggiungere nel sangue un contenuto vicino a 16-18 volumi percentuali e ottenere una saturazione della pulsossimetria cutanea ($Sp O_2$) superiore a 90%.

2. È bene evitare eccesso di O_2 ($Sp O_2 > 96\%$), che comporterebbe depressione del centro respiratorio e conseguente difetto di ventilazione con ipercapnia ($PaCO_2 > 45$ mmHg).

La emogasanalisi e la più semplice $Sp O_2$ sono indispensabili per il monitoraggio del trattamento.

Numerose esperienze cliniche (Barker *et al.*, 1994; Lock *et al.*, 1992) hanno rilevato che la terapia continua con O_2 in pazienti ipossiemicici determina diminuzione della mortalità, migliore tolleranza all'esercizio fisico, diminuzione della ipertensione polmonare e miglioramento delle funzioni neuropsichiche.

Fino a tempi recenti l'ossigenoterapia richiedeva necessariamente il ricovero con rischi di infezioni, inconvenienti per il malato e oneri gravosi per le strutture sanitarie. È ora in progressiva espansione l'ossigenoterapia domiciliare favorita dalla disponibilità di O_2 liquido (v. OSSIGENO*, ossigeno liquido; OSSIGENOTERAPIA*). La ossigenoterapia domiciliare comporta comunque delle difficoltà quali il frequente controllo della $Sp O_2$ e l'impossibilità di rilevare la saturazione notturna.

Il paziente in ossigenoterapia domiciliare, perciò, è costretto a tornare presso il Servizio per un monitoraggio di $Sp O_2$ anche 4 volte al mese. Inoltre resta impossibile la monitorizzazione notturna che peraltro è il momento più critico per i pazienti in ossigenoterapia.

Recentemente, anche per esperienza personale (Canuzzi e Antonelli, 1996), è stato introdotto un sistema di monitoraggio a distanza della pulsossimetria cutanea ($Sp O_2$) mediante sistema di telerilevamento a domicilio del paziente, attivato con specifica procedura (tab. II). Il sistema è in grado di acquisire, memorizzare e trasmettere (utilizzando una normale linea telefonica) dati di saturimetria, frequenza cardiaca e di livello di O_2 nella unità base ed è costituito da più unità periferiche che vengono installate presso le abitazioni dei pazienti e da una unità Centrale che riceve ed elabora le informazioni inviate dalle postazioni periferiche.

L'unità periferica (UP) è in grado di acquisire e memorizzare in automatico i seguenti dati: valori di saturimetria, di frequenza cardiaca e di livello di O_2 nell'unità base.

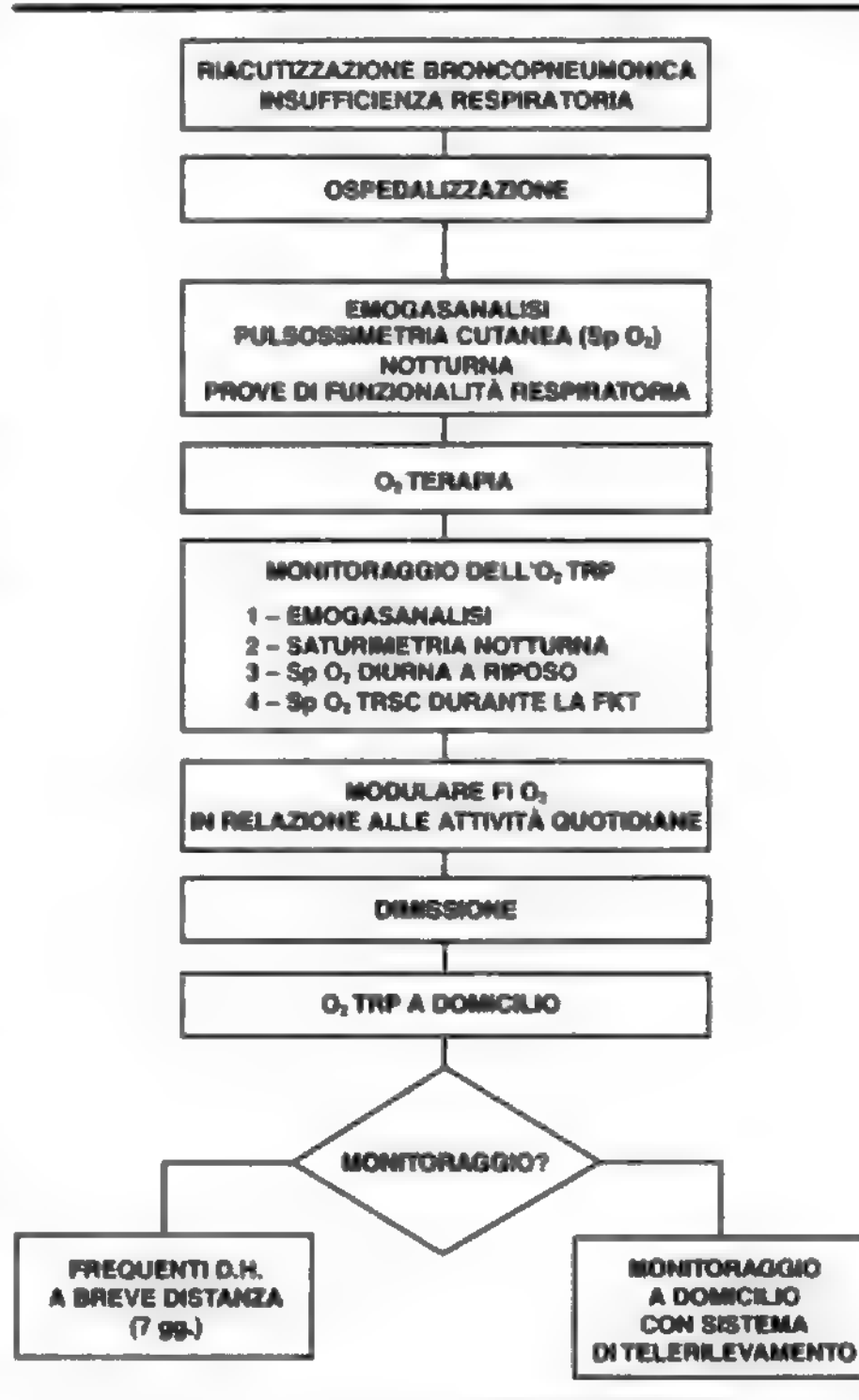
Modalità tecniche

La forma di ossigenoterapia, oggi più avanzata, sia in regime di ricovero che a domicilio è quella con l' O_2 liquido (temperatura $-183^\circ C$ (v. OSSIGENO*, ossigeno liquido)).

Il sistema consiste in un deposito di O_2 liquido (unità base) ricaricabile che viene installato a domicilio del paziente e può sviluppare fino a 25.000 litri di O_2 gassoso. Per dare al paziente libertà di movimento, sia in casa che al di fuori di essa, si usano contenitori portatili di O_2 liquido di diverse capacità (500-1200 litri). Il primo ha una autonomia di 4 ore con flusso di 2 litri/minuto, il secondo di 8 ore sempre con flusso di 2 litri/minuto.

L' O_2 liquido viene erogato sotto forma di O_2 gassoso tramite un ugello regolato da un flussometro.

TAB. II. PROCEDURA PER LA OSSIGENOTERAPIA
(Centro Fibrosi cistica della Regione Lazio)



Vantaggi dell' O_2 liquido

Consente il massimo di indipendenza da apparecchiature fisse e permette al paziente di muoversi liberamente e di svolgere le normali attività quotidiane sia in casa che fuori di essa. Offre una maggior sicurezza in termini di regolazione autonoma dei flussi. La ricarica è molto più semplice per l' O_2 liquido rispetto a quello gassoso.

Il volume di O_2 liquido è minore dell'1% del volume di un pari quantitativo di O_2 atmosferico (Tarphy *et al.*, 1993).

Bibliografia

- Barker A. F. *et al.*, *Chest*, 1994, 105, 48-52.
 Canuzzi P., Antonelli M., *Israel J. Med. Sci.*, 1996, 32, 5241.
 Lock S. H. *et al.*, *Thorax*, 1992, 47, 98-100.
 Messina B. *et al.*, *Prontuario terapeutico*, 1995, Universo, Roma, p. 530.
 Tarphy S. P. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993, 333 (11), 710-714.

Intervento nutrizionale nella mucoviscidosi

Mantenere un adeguato stato nutrizionale è stato da sempre un traguardo nell'ambito del complesso scenario terapeutico della m. Ancor più lo è divenuto negli ultimi anni durante i quali sempre più chiara si è rivelata la correlazione tra stato nutrizionale, evoluzione della broncopneumopatia e prognosi della malattia (Durie, 1989).

Per questo motivo dietoterapia e opoterapia, sussidi fondamentali nella terapia del paziente con m., hanno subito negli ultimi anni cambiamenti radicali.

Opoterapia

La recente disponibilità di preparati enzimatici gastroprotetti ad alto contenuto specie di lipasi (Antonelli *et al.*, 1994) ha offerto la possibilità di: a) liberalizzare la dieta; b) ottenere una migliore tolleranza dei grassi; c) migliorare lo stato nutrizionale.

Dietoterapia

Una dieta ipercalorica, iperproteica, ipolipidica, consigliata un tempo al paziente con m., è stata negli ultimi anni ampiamente superata grazie anche all'aiuto di nuove metodiche di valutazione del consumo energetico, la calorimetria indiretta, che analizza il metabolismo basale misurando il consumo di O_2 e la produzione di CO_2 in condizioni di riposo (Ferranini, 1988). Tale metodica consente una più accurata valutazione del consumo energetico di base e permette di conoscere l'esatta utilizzazione quantitativa e qualitativa dei substrati energetici (proteine, lipidi, glicidi) (Zullo *et al.*, 1998).

È stato così possibile affinare e approfondire, anche con contributi personali (Antonelli *et al.*, 1996), le conoscenze rispetto ai dati riferiti in precedenza (Bowler *et al.*, 1993).

Si è evidenziato come le condizioni respiratorie medio-gravi influenzino direttamente il metabolismo basale. Questa correlazione tra funzione polmonare, metabolismo basale e stato nutrizionale riflette come il peggioramento della broncopneumopatia determini un aumento del metabolismo basale imputabile all'aumentato costo energetico della respirazione.

Al fine di poter effettuare un efficace intervento dietetico è fondamentale valutare: a) lo stato nutrizionale mediante parametri antropometrici (peso, altezza, BMI [Body Mass Index] o IMC [Indice di Massa Corporea], v. COMPOSIZIONE CORPOREA**, col. **1366), biochimici (albumina) e bioumori (linfociti); b) l'effettivo bisogno energetico: mediante calorimetria indiretta.

Nel paziente acuto l'apporto calorico deve essere contenuto per evitare che l'ingombro meccanico del cibo ostacoli le normali escursioni diaframmatiche con conseguente aumento della dispnea. L'intervento nutrizionale va finalizzato al mantenimento del peso corporeo più che al recupero. Si devono incoraggiare i pazienti a frazionare la dieta in 5-6 pasti scegliendo gli alimenti e le confezioni più digeribili. La quota glicidica deve essere contenuta al 35-40%, in quanto quote elevate di glicidi possono accentuare le difficoltà respiratorie.

In condizioni respiratorie stabili e con paziente in grado di assumere gli alimenti in modo adeguato, è sufficiente il controllo dell'aspetto qualitativo e quantitativo dei nutrienti con una distribuzione equilibrata dei principi nutritivi (proteine 15-20%; lipidi 35-40%; glicidi 40-50%).

Le proteine devono essere ad elevato valore biologico, vanno privilegiati i lipidi ai glicidi (potenzialmente diabetogeni) in quanto migliorano la palatabilità degli alimenti, forniscono a parità di peso il doppio delle calorie, sono fonte di vitamine liposolubili e di acidi grassi essenziali: linoleico e linolenico.

La comparsa di malnutrizione (calo ponderale > 10% negli ultimi 6 mesi), diminuita assunzione energetica e alterazione dei parametri antropometrici deve far modificare l'approccio dietetico: incrementando l'apporto calorico al 130-150% dei LARN (Livelli di Assunzione Raccomandati di Nutrienti; v. NARRINO*, col. **998), con riduzione della quota dei carboidrati al 40-45% e aumento della quota lipidica sia con alimenti naturali o con l'integrazione orale (Pulmocare®).

In tutti i casi l'apporto lipidico deve essere mantenuto in conformità della tolleranza individuale (maldigestione), limitando i saturi aterogeni (acidi palmitico, laurico e miristico) e privilegiando i monoinsaturi: l'ac. linolenico (olio d'oliva) e i suoi derivati (EPA [ac. eicosapentanoico] e DHA [ac. docosaesanoico]).

È risultato particolarmente utile il consumo di pesce soprattutto salmone, trota, pesce azzurro in quanto ricchi di acidi grassi della serie 3: EPA e DHA ai quali spettano funzioni strutturali e il ruolo di precursori di componenti ad alta attività biologica (prostaglandine) (Koletzko *et al.*, 1998).

I grassi inoltre durante la loro combustione producono un minor numero di molecole di CO_2 rispetto ai carboidrati e sono particolarmente raccomandati nell'alimentazione del paziente affetto da m. con media o grave compromissione polmonare, per cui una dieta ricca di carboidrati determinerebbe un aumento della VCO_2 , con conseguente aumento dell'RQ (VCO_2/VO_2) aggravando il disturbo ventilatorio e l'ipercapnia.

La quota di carboidrati deve essere piuttosto elevata in quanto fonte di energia di immediata disponibilità per l'attività fisica ed intellettuale, con limitazione però della quota di glicidi semplici (zucchero, miele, marmellata, cioccolata, biscotti, merendine, caramelle, bevande gassate, etc.) che non devono superare il 20-30% delle calorie totali, con un'ulteriore restrizione al 10-20% in presenza di intolleranza glicidica o diabete. Infatti, mediante calorimetria indiretta, è stata osservata una netta ossidazione della quota di carboidrati come risultato di un trasporto facilitato di questi attraverso la mucosa intestinale, per diminuita competizione tra molecole organiche derivate dalla digestione, rispettivamente dei grassi e dei carboidrati, determinando quindi un maggiore assorbimento della quota glicidica (Antonelli *et al.*, 1996).

La grande disponibilità a livello intestinale di questi nutrienti facilita ed incrementa la glicogenosintesi con conseguente riduzione dell'ossidazione dei grassi durante lo stato di post-assorbimento.

Il passaggio così facilitato della quota glicidica nella circolazione sanguigna favorisce nel tempo l'insorgenza di intolleranza glicidica o diabete mellito, complicanza questa non rara nella m.

Utili anche le fibre fornite da frutta, verdura, legumi, cereali integrali.

Bibliografia

- Antonelli M. *et al.*, *Gastroenterology*, 1996, **4**, 35-40.
- Antonelli M. *et al.*, *Consensus Conference on the management of Cystic Fibrosis*, Paris, June, 1994, pp. 19-28.
- Bowler I. M., Green J. H., Wolfe S. P., Littlewood J. M., *Arch. Dis. Child.*, 1993, **68**, 754-759.
- Cimino G. *et al.*, *Riv. Ital. Ped.*, 1998, **24**, 131.
- Durie P. R., *J. R. Soc. Med.*, 1989, **82**, Suppl. 16, 11-20.
- Ferranini F., *Metabolism*, 1988, **37** (3), 287-301.
- Koletzko B. *et al.*, *XXII European CF Conference*, 1998, Berlin, p. 62.
- Zullo S. *et al.*, *Riv. Ital. Ped.*, 1998, **24**, 125.

MARIANO ANTONELLI

MUSCOLARE TESSUTO [v. vol. IX, 2125-2152; v. anche **MUSCOLO**, IX, 2152-2290; Agg. I, coll. *5240-5273]

BASI MOLECOLARI DEL MECCANISMO CONTRATTILE

SOMMARIO

Processi contrattili e motilità cellulare (col. 3857). - **Muscolo liscio** (col. 3858). - **Muscolo striato** (col. 3861).

Lo studio delle basi molecolari del meccanismo contrattile è uno dei settori della biologia muscolare in cui il progresso delle conoscenze è stato particolarmente rapido negli ultimi anni. Le acquisizioni più importanti riguardano la struttura delle proteine miofibrillari, l'accoppiamento elettromeccanico, cioè il meccanismo di attivazione della contrazione, e il meccanismo della contrazione vera e propria. Le ricerche si sono estese anche al muscolo liscio, sino a pochi anni fa trascurato dagli studiosi della contrazione muscolare, e ai

tessuti non muscolari. Nozioni e paradigmi derivati dagli studi sul muscolo striato, ad es. il concetto di «motore molecolare», hanno oggi un posto centrale negli studi sulla motilità cellulare.

Processi contrattili e motilità cellulare

Gli studi sulla motilità cellulare nei suoi diversi aspetti, dai sistemi di trasporto degli organelli alla divisione cellulare e al movimento delle cellule, hanno portato alla individuazione di tre tipi di *motori molecolari*, cioè di proteine in grado di trasformare energia chimica in energia meccanica: la miosina, la kinesina e la dineina. La miosina è un motore basato sull'interazione con l'actina, mentre kinesina e dineina sono motori basati sull'interazione con la tubulina, la proteina costituente i microtubuli.

Il motore molecolare più conosciuto è sicuramente la *miosina*. Esso consente la progressione di filamenti, membrane o organelli citoplasmatici rispetto a filamenti di actina. La miosina è costituita da una o più catene pesanti che comprendono una testa globulare sede della idrolisi dell'ATP, della interazione con l'actina e della generazione di forza, e da quattro o più catene leggere collocate sulla parte filamentosa delle catene pesanti (v. sotto). Le miosine attualmente note sono state raggruppate in 12 diverse classi (Sellers *et al.*, 1996) e studi recentissimi individuano fino a 15 classi di miosine (Probst *et al.*, 1998). Elementi unificanti le diverse miosine sono la capacità di interagire con i filamenti di actina, la presenza di alcune importanti omologie nelle regioni implicate nell'idrolisi dell'ATP e nella trasduzione (dominio motore) e nella regione di aggancio con le catene leggere. Elementi distintivi sono ampie diversità in forma di inserzioni localizzate presso l'estremo amino terminale, nella testa e nella coda: ad es. mentre le miosine «convenzionali» dei tessuti muscolari sono dotate di una lunga coda grazie alla quale si possono aggregare in filamenti, molte miosine «non convenzionali» hanno una coda molto corta e non formano filamenti.

La miosina è il motore della contrazione muscolare (miosine della II classe, che comprende peraltro anche due miosine non muscolari indicate come IIA, presente nelle piastrine e nell'epitelio intestinale, e IIB presente nei neuroni), è responsabile della motilità dei microvilli nelle cellule epiteliali intestinali (miosine della I classe) e delle stereociglia nelle cellule di Corti dell'orecchio interno (miosine delle classi VII e XV), dei trasporti nell'epitelio retinico (miosina della III classe), partecipa ai trasporti di vescicole e di granuli di pigmento (miosine della V classe).

Recenti scoperte di malattie genetiche secondarie ad alterazioni della miosina hanno portato questo motore molecolare al centro dell'interesse clinico. Mutazioni di forme non convenzionali di miosine delle classi VII e XV sono responsabili di forme di *sordità ereditaria* (Gibson *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998), mentre la *cardiomiopatia ipertrofica familiare* è causata in molti casi da mutazioni del gene dell'isoforma β della catena pesante della miosina, una miosina convenzionale di classe II (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990). Mutazioni di altre proteine miofibrillari, come la tropomiosina e la troponina T cardiaca, producono un fenotipo clinico simile, perciò la cardiomiopatia ipertrofica familiare è stata considerata come una «malattia del sarcomero» (Thierfelder *et al.*, 1994; Vikstrom e Leinwand, 1996).

La famiglia della *dineina* può essere suddivisa in due gruppi: le dineine citoplasmatiche e le dineine dell'assonema (Holzbaur e Vallee, 1994). Le une come le altre sono formate da 2-3 catene pesanti (che comprendono la testa che rappresenta il sito della interazione con i microtubuli, dell'attività ATPasica e dello sviluppo di forza), da catene

leggere e catene intermedie. Queste ultime servirebbero per il legame con il carico da trasportare lungo i microtubuli. Le dineine citoplasmatiche sono codificate da un unico gene in ciascuna specie e sono coinvolte in una varietà di funzioni: la più conosciuta è il trasporto retrogrado (cioè dalla sinapsi verso il soma) nei neuroni, ma è probabile anche una partecipazione al movimento dei poli del fuso mitotico (con la kinesina) e al trasporto di lisosomi e endosomi. Le dineine assonemiche sono codificate da diversi geni e svolgono la funzione di motori del movimento delle ciglia, dei flagelli e delle code degli spermatozoi.

La famiglia della *kinesina* (Goldstein, 1993; Goodson *et al.*, 1994) comprende le molecole motore responsabili del trasporto assonale anterograde (dal soma verso la periferia) nei neuroni, quelle responsabili di trasporti vescicolari, quelle responsabili del movimento dei poli del fuso durante la mitosi. Non è esclusa neppure una partecipazione ai movimenti dei flagelli. Le kinesine sono dei tetrameri composti da due catene pesanti e due catene leggere (Howard, 1996). Le catene pesanti, che hanno dimensioni assai più ridotte (circa 120 kD) di quelle della miosina e della dineina, comprendono la testa globulare che è sede dell'idrolisi dell'ATP e del legame con la tubulina. A differenza della miosina e della dineina, in cui il movimento di filamenti o di organelli viene generato dall'azione simultanea di una moltitudine di molecole, la kinesina viene considerata capace di generare un movimento continuo con una singola molecola: una singola molecola di kinesina risulta quindi capace di «camminare» o «scivolare» lungo il microtubulo.

Muscolo liscio

Le conoscenze riguardanti l'ultrastruttura della cellula muscolare liscia non sono sostanzialmente cambiate dopo i risultati ottenuti negli anni '70 e che hanno consentito la visualizzazione del citoscheletro e del sistema dei miofilamenti spessi e sottili. Gli ultimi dieci anni, invece, hanno visto significative acquisizioni sia per quanto riguarda il meccanismo della contrazione sia per quanto attiene all'accoppiamento eccitazione-contrazione (e-c).

Tutte le indagini recenti hanno confermato il ruolo centrale dello ione calcio nell'innescare della risposta contrattile della cellula muscolare liscia così come di quella muscolare striata. Due elementi sono però strettamente specifici della cellula muscolare liscia: 1) l'aumento della concentrazione intracellulare del calcio può essere ottenuto come risultato di una varietà di meccanismi basati sul flusso trans-sarcolemmale e sulla liberazione dai siti di deposito; 2) tra le proteine calcio fissatrici (tamponi del calcio) presenti entro la cellula, è la calmodulina (v. *) che è in grado di avviare la risposta contrattile.

L'aumento della concentrazione intracellulare del calcio può essere determinata da una corrente entrante attraverso il sarcolemma (fig. 1). Diversi tipi di canali per il calcio possono essere individuati nel sarcolemma della cellula muscolare liscia: canali voltaggio-dipendenti, canali a controllo di recettore, canali a controllo meccanico. L'ingresso attraverso canali voltaggio-dipendenti presuppone lo svilupparsi di un potenziale d'azione sulla membrana. L'ingresso attraverso altri tipi di canali si associa invece a depolarizzazioni graduate, ad esempio proporzionali alla intensità della stimolazione chimica sui recettori. Non tutte le cellule muscolari lisce possiedono tutti i tipi di canali. Le cellule cosiddette «fasiche» presentano i canali voltaggio-dipendenti, eventualmente associati agli altri tipi di canali: il potenziale d'azione basato su correnti entranti di calcio precede la risposta contrattile e può sovrapporsi su oscillazioni lente del potenziale di membrana. Le cellule cosiddette «toniche» non hanno canali voltaggio-dipendenti: la contrazione è di

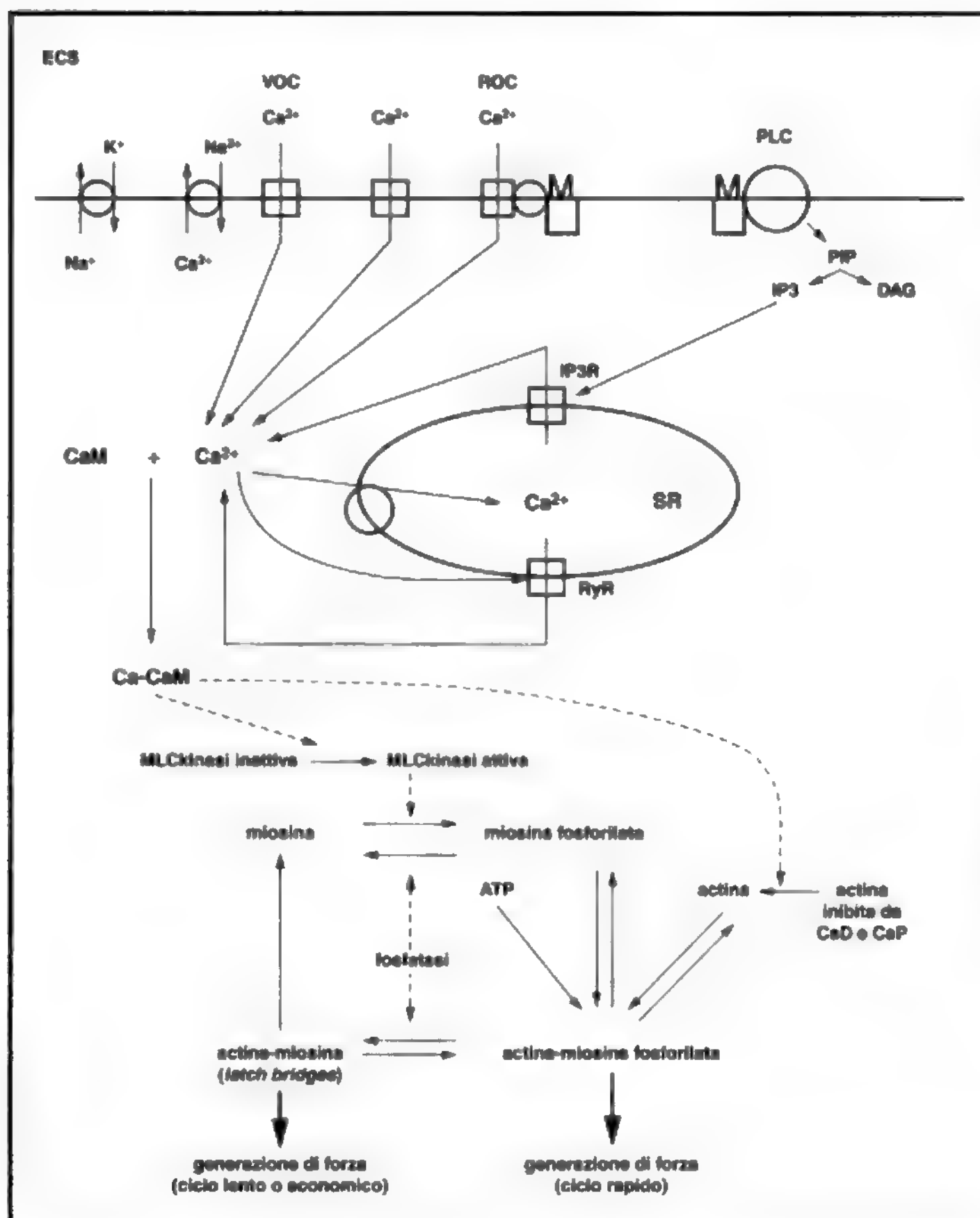


Fig. 1. Lo schema indica i flussi di calcio dall'ambiente extracellulare (ECS) attraverso la membrana e dai depositi intracellulari (SR, reticolo sarcoplasmatico). VOC, canale del calcio controllato dal voltaggio; ROC, canale del calcio controllato da un recettore di membrana; PLC, fosfolipasi C; PIP, fosfatidilinositolfosfato; CaM, calmodulina; CaD, caldesmone; CaP, calponina; IP3, inositolo 3 fosfato; DAG, diacilglicerolo; IP3R, canale del calcio-recettore per l'IP3; RyR, canale del calcio-recettore per la rianodina.

lunga durata e si associa a variazioni lente e graduabili del potenziale di membrana. Esiste anche la possibilità di risposte contrattili a stimolazioni chimiche (neuroendocrine) senza variazioni del potenziale di membrana. In questo caso l'unica sorgente di calcio è rappresentata dalle strutture di deposito intracellulare (reticolo sarcoplasmatico), che nei casi precedentemente elencati hanno solo il compito di amplificare i segnali rappresentati dall'ingresso del calcio attraverso il sarcolemma. Dunque nel muscolo liscio coesistono una via elettromeccanica e una via farmacomeccanica che portano entrambe all'avvio della risposta contrattile (Somlyo e Somlyo, 1994).

Il rilascio del calcio da parte del rudimentale reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari lisce utilizza due tipi di canali, i canali recettori della rianodina e i canali recettori dell'inositolo 3 fosfato (fig. 1). I primi sono responsabili dell'amplificazione essendo dotati del meccanismo di apertura del canale per il calcio innescato dall'aumento della concentrazione di calcio (rilascio di calcio indotto da calcio). I se-

condi mediano rilascio di calcio che segue all'attivazione di recettori di membrana collegati con il sistema enzimatico della fosfolipasi C. Fosfoinositidi delle membrane cellulari vengono idrolizzati e fra i prodotti il fosfoinositolo produce il rilascio di calcio. È proprio questa via che consente il rilascio di calcio senza ingresso trans-sarcolemmale e quindi senza variazioni del potenziale di membrana.

Per quanto attiene alla ricezione del segnale trasmesso dall'aumento del calcio intracellulare, il ruolo principale è svolto dalla calmodulina. Questa proteina legando il calcio opera un innescamento della contrazione agendo sia sul filamento sottile sia su quello spesso (doppio controllo, contrapposto al controllo sul filamento sottile, tipico dei muscoli striati). Il controllo essenziale è tuttavia quello basato sulla fosforilazione della miosina (Hartshorne e Kawamura, 1992). L'attività ATPasica della miosina del muscolo liscio può essere aumentata di parecchie volte mediante fosforilazione delle catene leggere regolatorie (peso molecolare 20 kD) ad opera di una specifica chinasi (MLCK) attivata

dalla calmodulina legata al calcio. L'interpretazione più diffusa è che la fosforilazione modifichi le caratteristiche meccaniche della regione della catena pesante che si estende dalla testa globulare verso la parte filamentosa, rendendo così possibile il legame con l'actina. La fosforilazione viene seguita dall'avvio della interazione ciclica fra actina e miosina con idrolisi dell'ATP e generazione di forza e di accorciamento. Anche se le caratteristiche di questo processo sono in generale paragonabili a quelle osservate nel muscolo scheletrico, esistono significative differenze. Tra queste importanti è l'ampio movimento osservabile in relazione al *power stroke* (v. sotto) e con ampiezza superiore a 20° (Whittaker *et al.*, 1995). Una seconda differenza importante riguarda la possibile dissociazione fra fosforilazione e sviluppo di forza. La defosforilazione della miosina attaccata all'actina (e probabilmente contenente ADP) provoca una riduzione della velocità di distacco di circa 5 volte e quindi la comparsa di complessi actina-miosina che generano, o meglio mantengono, forza senza consumare ATP. Questi complessi vengono indicati come «latch-bridges». La defosforilazione è affidata a fosfatasi che sembrano essere specifiche e regolate tramite un meccanismo che richiede il GTP e l'intervento di proteine G (Somlyo e Somlyo, 1994).

La conoscenza più approfondita del meccanismo di contrazione del muscolo liscio ha consentito anche di classificare con maggior precisione i *tipi di cellule muscolari lisce*. La loro diversità principale risiede, infatti, proprio nelle modalità di innesco e controllo della risposta contrattile. Nel muscolo scheletrico esiste un'unica modalità di attivazione mediante rilascio di acetilcolina nella giunzione neuromuscolare e un'unica interazione fra uno specifico motoneurone e ciascuna delle fibre della sua unità motoria. Nel muscolo liscio, invece, le cellule sono attivate tramite una complessa integrazione di segnali eccitatori e inibitori di origine sia nervosa sia umorale. Con l'eccezione di alcuni muscoli lisci cosiddetti multiunitari, le cellule muscolari lisce sono collegate da «gap junctions» (muscoli lisci sinciziali) e questo introduce un ulteriore potente meccanismo fisico (correnti elettrotoniche via connessioni) di attivazione delle risposte cellulari. La classificazione fondamentale distingue: 1) cellule muscolari lisce fasiche che generano potenziali d'azione, hanno quindi canali voltaggio-dipendenti per il calcio, seguono principalmente la via elettromeccanica dell'accoppiamento e-c e la loro contrazione è di solito di durata breve e la velocità di accorciamento relativamente elevata; 2) cellule muscolari lisce toniche che non hanno potenziali d'azione ma oscillazioni lente del potenziale o persino potenziale di membrana assolutamente stabile, e quindi utilizzano in gran parte le vie farmacomecaniche di attivazione della contrazione; la contrazione è di lunga durata e la velocità di accorciamento generalmente bassa.

V. anche: MUSCOLO*, fisiologia (coll. *5242-5246).

Muscolo striato

La descrizione dell'architettura molecolare del sarcomero è stata recentemente arricchita dalla identificazione, sia a livello di proteine che di geni, di due nuove importanti componenti: la *titina* (inizialmente chiamata connettina) e la *nebulina*. Si tratta di due proteine filamentose di grandi dimensioni: oltre 3000 kD la titina e 800-900 kD la nebulina. L'estremità C terminale della nebulina si inserisce nelle strie Z dove interagisce con l'actina. La nebulina si dispone quindi lungo tutta la lunghezza del filamento sottile dove prende rapporto con le molecole di actina. Si ritiene che la presenza del filamento di nebulina svolga una funzione importante per l'organizzazione strutturale del filamento sottile del sarcomero e ne stabilizzi la lunghezza (Wang e Wright, 1988; Labeit e Kolmerer, 1995a).

La struttura e la funzione della titina sono molto più complesse (Labeit e Kolmerer, 1995b). La titina infatti si dispone fra la stria Z, dove si inserisce la parte N terminale della titina, e la regione M al centro del sarcomero, dove la porzione C terminale si lega alla miosina e alla proteina M (fig. 2). Una singola molecola di titina copre quindi l'intero mezzo sarcomero. Nel tratto compreso entro la banda I è presente una parte più vicina alla stria Z in cui la titina si lega con l'actina e una parte libera; nel tratto compreso nella banda A la titina si lega con la miosina e con la proteina C. Di grande interesse è la parte libera all'interno della banda I dove si succedono un segmento formato da ripetizione di sequenze simili a sequenze ripetute presenti nelle immunoglobuline («Ig repeats») e un segmento indicato come elemento PEVK in base agli aminoacidi più rappresentati: questo segmento PEVK è dotato di grande elasticità. La funzione della titina sarebbe, quindi, duplice: 1) da un lato stabilizzare la posizione dei filamenti spessi, poiché ogni filamento spesso si trova agganciato da due titine ciascuna delle quali si estende verso le opposte strie Z; 2) dall'altro lato, grazie alla elasticità della regione PEVK determinare la risposta passiva del sarcomero alle variazioni di lunghezza.

Grazie ad un processo di *splicing* differenziale il gene della titina genera diversi trascritti e quindi diverse proteine, variamente distribuite nei diversi tipi di fibre muscolari (fig. 2). Le cellule muscolari del miocardio contengono una forma di titina molto più corta e meno elastica delle forme di titina espresse nel muscolo scheletrico e questo rende conto del fatto che i sarcomeri cardiaci sono molto meno estensibili. Ulteriori varianti di titina sono presenti nelle fibre rapide e lente del muscolo scheletrico. Mentre le proprietà passive dei sarcomeri, ad es. la variabile distensibilità e resistenza allo stiramento, riflettono l'esistenza di isoforme di titina e di proteine dei dischi Z, le proprietà attive dei sarcomeri associate alla generazione di forza e all'accorciamento, ad es. la variabile velocità di contrazione, riflettono l'esistenza di numerose isoforme di miosina e di altre proteine dei filamenti spessi e sottili (Schiaffino e Reggiani, 1996).

La conoscenza della fisiologia della *contrazione del muscolo scheletrico* ha registrato negli ultimi anni significativi progressi in almeno due ambiti: 1) l'accoppiamento eccitazione-contrazione è stato compreso più a fondo come conseguenza della dettagliata analisi strutturale delle triadi e della identificazione delle proteine di membrana (canali recettori per la rianodina e canali recettori per le diidropiridine) coinvolte; 2) la conoscenza del meccanismo di trasduzione chimico-meccanica nella miosina è stata accresciuta dalle nuove acquisizioni sulla struttura atomica della molecola della miosina e dallo sviluppo delle indagini funzionali sulla meccanica fine della contrazione.

Le conoscenze attuali sulla catena di eventi che dal potenziale d'azione che si sviluppa sulla membrana porta all'avvio del processo contrattile nelle miofibrille (*accoppiamento eccitazione-contrazione*) possono essere così riassunte. La membrana cellulare della fibra muscolare (sarcolemma) penetra anche nell'interno della fibra muscolare lungo quelle invaginazioni note come tubuli T. I tubuli T vengono ripetutamente a contatto ravvicinato con le cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico formando strutture simmetriche chiamate *triadi* (due cisterne terminali che circondano un tubulo T). Sulla membrana del tubulo T in corrispondenza della triade sono presenti proteine sensibili al voltaggio, e quindi alla variazione del campo elettrico della membrana associata con il potenziale d'azione. Queste proteine sensori di voltaggio sono state identificate con canali del calcio di tipo L, simili quindi a quelli cardiaci e come tali capaci di legare le diidropiridine

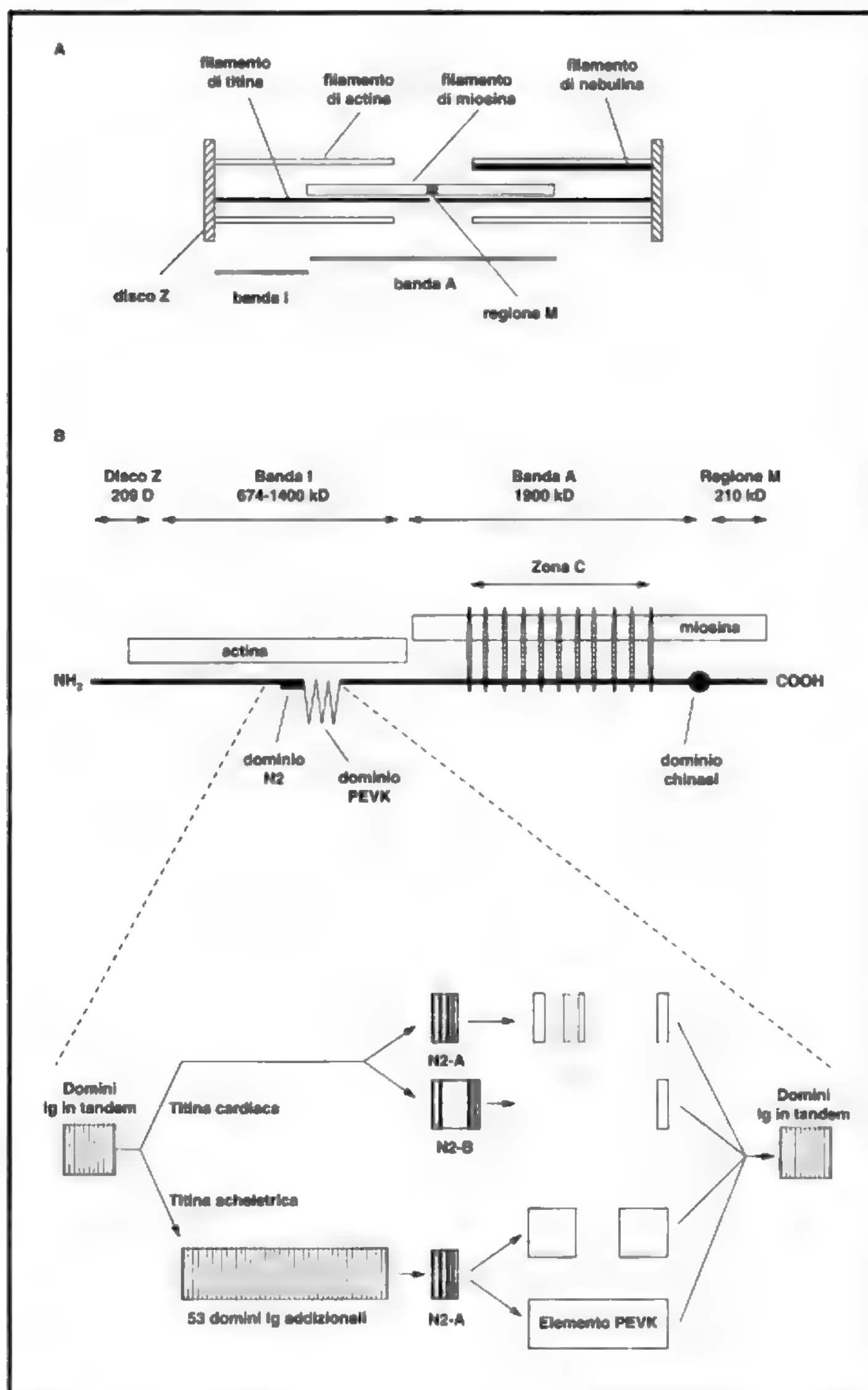


Fig. 2. A) Schema della struttura del sarcomero. Nota come il filamento di titina, che corrisponde ad una singola molecola, si estende dal disco Z fino alla regione M al centro del sarcomero. B) Schema della struttura della titina. In alto sono indicate le dimensioni relative delle porzioni della molecola nelle diverse regioni dal disco Z lungo le bande I ed A fino alla regione M. Le undici barre verticali nella zona C corrispondono alle proteine C che legano sia la titina che la miosina. Sono indicate anche le posizioni del dominio della titina dotato di attività kinasica e il dominio PEVK, ricco in prolina (P), glutamato (E), lisina (K) e valina (V), in cui la molecola è particolarmente estensibile. In basso sono indicate alcune delle isoforme della titina prodotte mediante processi di *splicing* differenziale. Si noti come la forma cardiaca ha un dominio PEVK molto ridotto e manca di 53 domini Ig presenti nelle isoforme scheletriche. Ulteriori prodotti di *splicing*, non indicati in questo schema, diversificano le isoforme di titina nella regione del disco Z e della regione M. (Modificata da Schiaffino e Reggiani, 1996).

(DHP). In precisa corrispondenza spaziale con i canali del calcio recettori per DHP (in breve DHPR) sono presenti sulla membrana della cisterna terminale aggregati di quattro proteine con funzione di canale del calcio del reticolo sarcoplasmatico. Questi canali del calcio del reticolo vengono indicati come recettori per la rianodina (RyR) data la

loro affinità per la rianodina, un alcaloide capace di indurre rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico. Durante il potenziale d'azione i DHPR produrrebbero una minima corrente entrante di calcio ma, e questo sarebbe il loro compito più importante, provocherebbero direttamente l'apertura dei canali RyR del reticolo sarcoplasmatico e in

questo modo il rilascio massivo di calcio (Rios e Pizzaro, 1991). La risposta essenziale per l'inizio dell'accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico sarebbe dunque un cambiamento conformazionale del DHPR scheletrico collegato con il movimento delle cariche elettriche nella membrana, e non l'apertura del canale al flusso ionico come avviene nel DHPR cardiaco. La stretta vicinanza fra DHPR e RyR può suggerire un'azione meccanica del DHPR sul RyR durante il potenziale d'azione. Studi su mutanti naturali, come i topi geneticamente privi di DHPR, o artificiali, come i topi con inattivazione (*knockout*) del gene codificante RyR, dimostrano come entrambe queste proteine siano essenziali per l'accoppiamento e-c e la mancanza di una delle due porti alla scomparsa dell'accoppiamento e-c. Entrambe le mutazioni sono letali alla nascita non consentendo l'attività dei muscoli respiratori (Sutko e Airey, 1996). Mutazioni puntiformi del RyR sono invece responsabili della ipertermia maligna, malattia ereditaria relativamente frequente, in cui i tempi di apertura del RyR risultano essere prolungati (Mickelson e Louis, 1996).

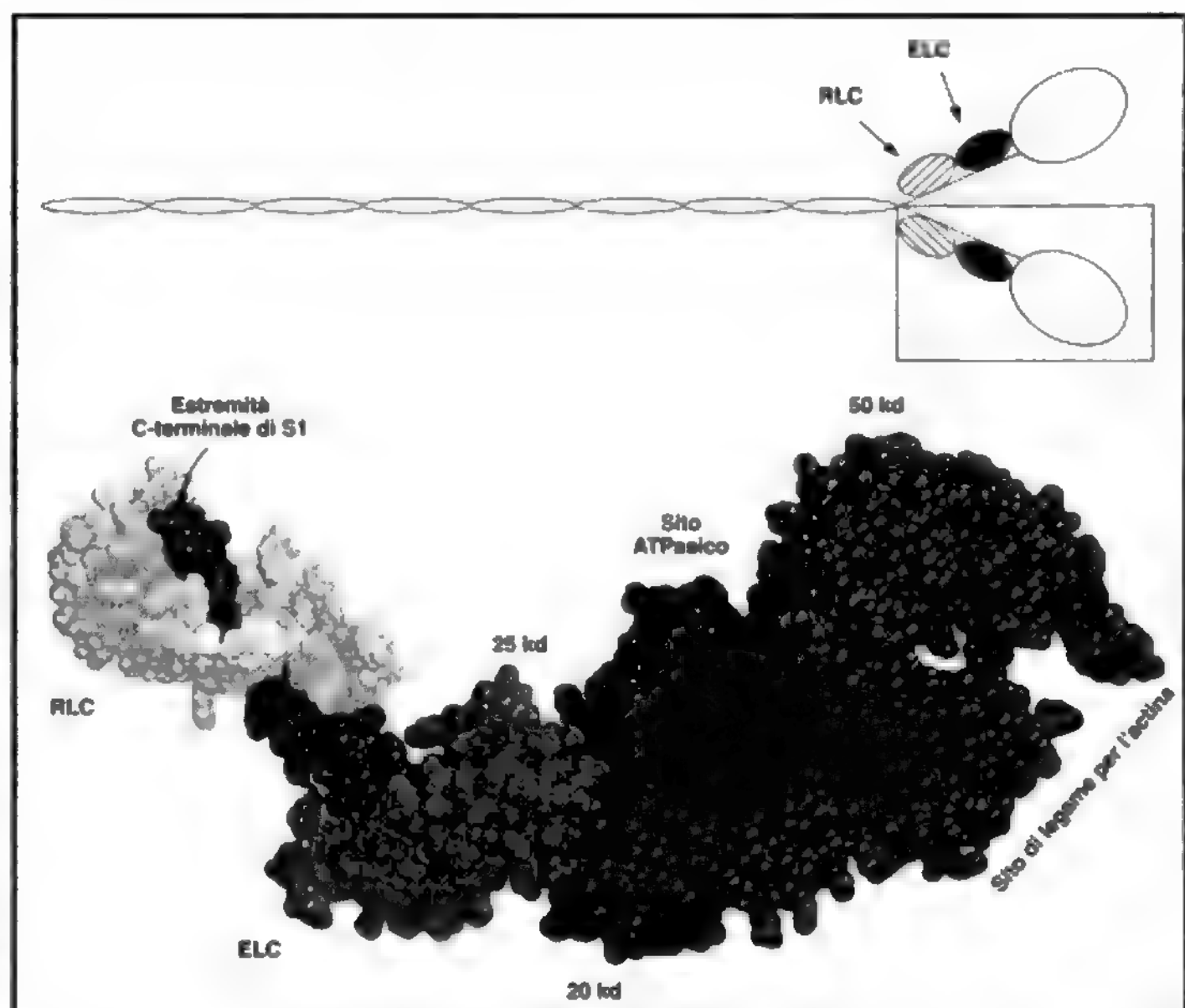
Il canale RyR è influenzato da una molteplicità di altri fattori regolatori fra cui il pH, le concentrazioni intracellulari di Mg^{2+} e di ATP, e molecole farmacologicamente attive quali la caffeina e le metilxantine. Tre differenti isoforme del RyR codificate da tre differenti geni sono presenti nell'uomo come in tutti i vertebrati (Sorrentino e Volpe, 1993). RyR1 è predominante nei muscoli scheletrici dei mammiferi, ma presente anche nel muscolo liscio e nel sistema nervoso; RyR2 è tipica del miocardio, ma espressa anche nei neuroni e nel muscolo liscio; RyR3 è espressa principalmente nel tessuto nervoso e secondariamente nei muscoli scheletrici. Il calcio rilasciato dalle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico viene poi riportato entro il

lume del reticolo da trasportatori specifici, indicati come pompe del calcio reticolari (SERCA), distribuiti lungo tutta la membrana reticolare (Dux, 1993).

Le conoscenze sulla *interazione fra actina e miosina* e sul meccanismo di trasduzione chimico-meccanica hanno avuto un impulso decisivo: 1) dallo sviluppo delle tecniche di motilità *in vitro*, e 2) dalla cristallizzazione del frammento S1 della miosina e dalla successiva ricostruzione della sua struttura atomica basata sulla diffrazione ai raggi X. I saggi di motilità *in vitro* permettono di studiare il processo contrattile in un sistema semplificato di proteine purificate: filamenti di actina resi fluorescenti scivolano in presenza di ATP su un tappeto di molecole di miosina depositato su di un vetrino. Questa tecnica ha consentito la misura diretta delle forze e dello spostamento (nell'ordine dei piconewton e, rispettivamente, dei nanometri) generate in una singola interazione fra actina e miosina. Per dare un'idea dell'importanza rivoluzionaria di queste nuove tecniche si può dire che la possibilità di studiare le proprietà di una singola molecola motore è paragonabile alla possibilità di studiare un singolo canale ionico grazie alle tecniche di *patch-clamp* (v.**).

La determinazione della struttura atomica della miosina (Rayment *et al.*, 1993) ha seguito di pochi anni un analogo risultato ottenuto per l'actina (Kabsch *et al.*, 1990). L'actina appare organizzata in quattro domini con un nucleotide inserito profondamente in un solco. I domini 3 e 4 sono rivolti verso l'interno del filamento sottile, mentre i domini 1 e 2 sono più esposti all'esterno del filamento e presentano i siti di interazione con la testa della miosina. La testa della miosina, che corrisponde all'incirca al frammento S1 ottenibile per digestione enzimatica, è formata da una parte globosa dotata di attività enzimatica e capace di interagire con l'actina e da una porzione allungata (fig. 3). La parte

Fig. 3. *In alto*, schema della struttura della miosina. La miosina è costituita da 2 catene pesanti, 2 catene leggere essenziali (ELC) e 2 catene leggere regolatorie (RLC). Ogni catena pesante è composta da una testa o dominio motore, che contiene i siti di legame per l'actina e per l'ATP, connessa alla lunga coda mediante un sottile collo a cui sono associate le catene leggere. L'area inquadrata dal rettangolo corrisponde al frammento S1. (Modificata da Schiaffino e Reggiani, 1996). *In basso*, struttura atomica del frammento S1. Sono indicate le tre regioni, rispettivamente di 25 kd, 50 kd e 20 kd, in cui può essere suddivisa la catena pesante, e le due catene leggere, RLC ed ELC, associate alla lunga α elica C-terminale della catena pesante. Sono anche indicati i siti di legame per il nucleotide (sito ATPasico) e per l'actina, localizzati su lati opposti del dominio di 50 kd (da Strver L., *Biochimica*, 1996, Zanichelli, Bologna, p. 466).



globosa enzimatica appartiene interamente alla catena pesante della miosina. Da questa si inizia un peptide ad α elica lungo circa 8,5 nm intorno a cui si dispongono le catene leggere. Questo peptide costituisce la porzione allungata della testa o collo e si continua con la coda della miosina che va a formare lo scheletro del filamento spesso. La parte globosa è divisa in due da un solco in cui si colloca il nucleotide e viene quindi chiamato solco catalitico o tasca del nucleotide. L'apertura più ampia di questo solco viene a situarsi sulla faccia della miosina rivolta verso l'actina. Tale faccia porta siti di legame con l'actina sia di tipo elettrostatico, e quindi debole, sia di tipo idrofobico, e quindi forte. L'ATP si colloca entro il solco con il fosfato rivolto verso l'apertura più stretta. Con meccanismo tuttora incerto l'idrolisi dell'ATP sarebbe seguita da un cambiamento di configurazione che coinvolge la porzione della molecola fra il solco catalitico e la lunga α elica. Quest'ultima avrebbe il compito di amplificare con un meccanismo a leva un iniziale modesto cambiamento di configurazione all'interno della testa in corrispondenza di un ipotetico fulcro. Lo spostamento che ne consegue viene descritto come colpo di forza o *power stroke*.

La comunicazione fra siti leganti per l'actina e sito catalitico dove l'ATP si posiziona e viene idrolizzato è indispensabile per il funzionamento del motore miosinico sul filamento di actina. Così, come già delineato da Lynn e Taylor (1971), l'ingresso dell'ATP nel solco catalitico provoca un'immediata perdita di affinità della miosina per l'actina ed è seguito da una rapida idrolisi. Il complesso miosina-prodotto di idrolisi riacquista affinità per l'actina e la formazione del nuovo legame con l'actina facilita l'allontanamento dei prodotti dell'idrolisi (ADP e Pi). Il cambiamento conformazionale più significativo, quello che provoca il *power stroke* sarebbe strettamente associato all'allontanamento del Pi. Le misure dell'entità del *power stroke* sia come spostamento sia come possibile sviluppo di forza erano fino a pochi anni fa unicamente indirette, basate su calcoli che richiedevano l'applicazione di modelli della contrazione ai risultati ottenuti su fibre muscolari. Solo recentemente (Finer *et al.*, 1994) il controllo mediante sottili fasci di luce laser sul movimento di piccolissime sfere legate a filamenti di actina e disposte su un tappeto di molecole di miosina ha consentito la misura diretta della forza generata in singoli *power strokes*. I risultati ottenuti da questi studi di motilità *in vitro* suggeriscono valori di 2-4 pN per la forza e di 10-20 nm per lo spostamento.

V. anche: RECEPTORI [v.; v.*; v.**]; SEGNALI CELLULARI**.

Bibliografia

- Dux L., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1993, **122**, 69.
 Finer J. T. *et al.*, *Nature*, 1994, **368**, 113.
 Geisterfer-Lowrance A. A. I. *et al.*, *Cell*, 1990, **62**, 989.
 Gibson F. *et al.*, *Nature*, 1995, **374**, 62.
 Goldstein L. S., *Ann. Rev. Genet.*, 1993, **27**, 319.
 Goodson H. V., Kang S. J., Endow S. A., *J. Cell Sci.*, 1994, **107**, 1875.
 Hartshorne D. J., Kawamura T., *NIPS*, 1992, **7**, 59.
 Holzbaur E. L. F., Vallee R. B., *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1994, **10**, 339.
 Howard J., *Annu. Rev. Physiol.*, 1996, **58**, 703.
 Kabsch W. *et al.*, *Nature*, 1990, **347**, 37.
 Labett S., Kolmerer B., *J. Mol. Biol.*, 1995a, **248**, 308.
 Labett S., Kolmerer B., *Science*, 1995b, **270**, 293.
 Lynn R. W., Taylor E. W., *Biochemistry*, 1971, **10**, 4617.
 Mickelson J. R., Louis C. F., *Physiol. Rev.*, 1996, **76**, 537.
 Probst F. J. *et al.*, *Science*, 1998, **280**, 1444.
 Rayment I. *et al.*, *Science*, 1993, **261**, 40 e 58.
 Rios C., Pizzaro G., *Physiol. Rev.*, 1991, **71**, 849.
 Schiaffino S., Reggiani C., *Physiol. Rev.*, 1996, **76**, 371.
 Sellers J. R., Goodson H. V., Wang F., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1996, **17**, 1-17.
 Smith A. P., Smith A. V., *Nature*, 1993, **372**, 381.
 Sorrentino V., Volpé P., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, **14**, 98-103.
 Sulko J. L., Atrey J. A., *Physiol. Rev.*, 1996, **76**, 1027.
 Thierfelder L. *et al.*, *Cell*, 1994, **77**, 701.

- Vikstrom K. L., Lemwand L. A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1996, **8**, 97.
 Wang A. *et al.*, *Science*, 1998, **280**, 1447.
 Wang K., Wright J., *J. Cell Biol.*, 1988, **107**, 2199.
 Weil D. *et al.*, *Nature*, 1995, **374**, 60.
 Whittaker M. *et al.*, *Nature*, 1995, **378**, 748.

CARLO REGGIANI E STEFANO SCHIAFFINO

MUTAZIONI DINAMICHE: V. TRINUCLEOTIDI INSTABILI, MALATTIE DA**.

MYCOBACTERIUM GENERE [v. vol. IX, coll. 2313-2323]

SOMMARIO

Introduzione (col. 3868) - Specie micobatteriche reperibili in materiali biologici provenienti da malati di AIDS (col. 3869). - Recente inquadramento tassonomico del gruppo MAC (col. 3870). - Micobatteri a rapida crescita responsabili di infezioni iatrogeniche (col. 3871). - Linfadenopatie latero-cervicali (col. 3873). - Infezioni da *M. marinum* e occasioni di rischio (col. 3874). - Prospettive degli studi in corso in tema di genere *Mycobacterium* (col. 3875).

Introduzione

Fare oggi, alla vigilia del 2000, una rassegna di aggiornamento sulle principali novità riguardanti il genere *Mycobacterium* [g. *M.*] significa aprire una finestra su uno scenario dominato dall'emergenza sotto varie angolature: epidemiologica, tassonomica, diagnostico-laboratoristica, genetico-molecolare.

In proposito si deve precisare che è in corso di svolgimento un tumultuoso processo di revisione di molti criteri usati in passato per esplorare la distribuzione in natura, comprendere il significato biologico e valutare le potenzialità patogene di tanti membri del g. *M.* diversi dal bacillo di Koch. Stranamente, proprio questo microrganismo (*M. tuberculosis*), che sembrava avviato finalmente a mettersi in disparte, ha colto l'occasione per riaccendere situazioni di allarme, parallelamente al crescente successo epidemiologico di altre specie micobatteriche, sia di quelle vecchie, sia di quelle recentemente scoperte.

Al momento infatti, uno dei problemi più scottanti a livello mondiale si identifica con la riemergenza della tubercolosi (v.*; v.***) e col rischio della diffusione di *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente ([MDR] a rifampicina, isoniazide, etc.). Tre sono i fattori maggiormente responsabili dell'aumentata incidenza tubercolare: 1) immigrazione da paesi poveri e disumano inserimento nella nuova area; 2) coinfezione con HIV; 3) episodi epidemici conseguenti a carenze di un precoce *case-finding* in collettività chiuse (ospedali, case di cura, caserme, ricoveri per senzatetto, residenze per pazienti AIDS, carceri e reclusori). Si è invero di fronte ad una situazione che impone con urgenza una speciale organizzazione dei servizi laboratoristici (tab. I) in grado di assicurare, con le attuali tecniche diagnostico-identificative rapide (sistemi culturali radiometrici, sonde genetiche, PCR, etc.) e con test abbreviati di sensibilità ai farmaci, risposte valide per interventi tempestivi di interruzione della catena di contagio. V. anche TUBERCOLOSI**.

Con tale riferimento alle strutture laboratoristiche si vuole esaltare il loro fondamentale ruolo di «punti di forza» per il progresso delle conoscenze e la promozione della strategia preventiva. Dalla coraggiosa e pionieristica attività di molti laboratori ospedalieri, presidi multizonali di sanità pubblica, e ancor più dei centri di ricerca universitari e industriali, nazionali ed internazionali, sono partiti infatti i contributi per l'accumulo del bagaglio conoscitivo di questi ultimi anni sui micobatteri.

TAB. I. IPOTESI DI ORGANIZZAZIONE DI UNA RETE DI SERVIZI LABORATORISTICI PER LA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI MICOBATTERICHE

(Da Carreri V., Servizio di Igiene Pubblica, Regione Lombardia, 1995)

Attività	Bacino di utenza
Laboratori di base (1° livello)	
Esame microscopico Eventuale esame colturale (solo identificazione <i>M. tuberculosis</i> umano) Invio al laboratorio regionale per gli ulteriori esami	Massima periferizzazione
Laboratori regionali (2° livello)	
Esame microscopico Esame colturale Identificazione <i>M. tuberculosis</i> umano e caratterizzazione dei principali altri micobatteri Antibiogramma Raccolta informazioni e smistamento al 1° e al 3° livello	Regione o Regioni contigue (oltre un milione di abitanti)
Laboratori di riferimento (3° livello)	
Esame microscopico Esame colturale Antibiogramma Tipizzazione <i>M. tuberculosis</i> umano e MOIT Uso di alta tecnologia Valutazione di nuove tecnologie Coordinamento con gli altri laboratori per: — controlli di qualità (1°, 2° e 3° livello) — corsi di aggiornamento del personale (1°, 2° e 3° livello) — controllo incrociato con le denunce di fbc contagiosa — conservazione di ceppi in collezione	Nord; centro-sud e isole (oltre 10 milioni di abitanti)

Specie micobatteriche reperibili in materiali biologici provenienti da malati di AIDS

È noto da diversi anni che in conseguenza dello sfacelo immunitario che colpisce i pazienti HIV+, questi diventano maggiormente recettivi a forme invasive da *M. tuberculosis* per contagio primario o per riattivazione di vecchi focolai; in qualche soggetto può risvegliarsi, anche dopo parecchio tempo, il micobatterio vaccinale BCG con propensione alla disseminazione in tutti i distretti corporei.

Risulta poi segnalato da tanti ricercatori che in circa il 50% dei malati AIDS si impiantano infezioni sistemiche da *M. avium*, specie contenente tipi considerati tra i più comuni patogeni opportunisti; in una più ridotta percentuale di malati invece possono trovar vantaggio altri micobatteri (*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. simiae*, *M. xenopi*). Riserve esprime L. G. Wayne (coordinatore dell'*International Working Group for Mycobacterial Taxonomy*) sulle interpretazioni etiologiche del reperto di *M. gordonae* in materiali clinici di pazienti AIDS, specie da lui giudicata essenzialmente contaminante occasionale, ubiquitaria e saprofita.

Nel 1991 il CDC di Atlanta richiamò l'attenzione sull'iso-

lamento di *Mycobacterium haemophilum* da siti corporei multipli (ulcere cutanee, midollo osseo, articolazioni, sangue, etc.) di diversi pazienti AIDS e di trapiantati. Nell'ottobre 1993 venne omologata una nuova specie micobatterica, a lenta crescita non pigmentata, il *M. genavense*, responsabile di infezioni disseminate in pazienti AIDS; in un malato questo agente microbico fu giudicato responsabile di una grossa raccolta ascessuale nel cervello. Negli oltre 50 casi fino ad oggi osservati è stato in genere riscontrato un livello di immunodepressione estremamente avanzato (CD4 in media 16/μL), insieme a febbre, diarrea e marcato calo di peso.

Nello stesso anno venne ufficialmente descritto il *M. celatum* isolato talvolta da lavaggio bronchiale, sputo e feci di soggetti con AIDS. Sembra che nell'ambito di questa specie micobatterica si possano distinguere tipi differenti per la non identità di alcune sequenze nucleotidiche a livello di 16S rRNA. Ulteriori osservazioni permetteranno di ricavare con l'analisi filogenetica altri elementi per una più precisa collocazione tassonomica dei ceppi di tale specie.

La straordinaria recettività dei soggetti HIV+ ai microrganismi acido-resistenti nelle fasi di spiccata deplezione dei CD4 lascia prevedere che tali ospiti potranno consentire un insediamento aggressivo a nuove specie micobatteriche rimaste finora senza idoneo bersaglio umano e nascoste in nicchie ecologiche inesplorate. Da fonti autorevoli si hanno notizie di casi con reperto microscopico indicativo di infezione da acido-resistenti, ma con insuccesso colturale che fa sospettare la presenza di micobatteri caratterizzati da insolite esigenze nutritive, da identificare eventualmente con ricerca diretta nei materiali patologici a mezzo della PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

In riferimento alla più comune sovrainfezione micobatterica, un grosso problema, che ha delicate implicazioni etiche per il possibile impatto sulla qualità di vita dei pazienti, si pone al momento di decidere sui farmaci anti-*M. avium* nelle fasi iniziali di batteriemia, in tempo utile per arrestare la progressiva disseminazione micobatterica e lo slittamento verso la *wasting syndrome*. Un elenco di farmaci sperimentati da autorevoli ricercatori è riportato nella tab. II.

Va intanto riscuotendo sempre maggiore interesse, rispetto alla terapia, la prevenzione della malattia da *M. avium* mediante l'impiego della rifabutina (v*; v.**; 300 mg/die per vari mesi) in pazienti AIDS la cui immunodepressione non è ancora troppo severa (ad es. tasso di linfociti CD4 a livello di 100/μL), secondo le proposte del CDC e dell'analoga istituzione canadese.

Recente inquadramento tassonomico del gruppo MAC

In merito a tali micobatteri, pervenuti alla ribalta per il loro ruolo di «sciacallaggio» nell'AIDS, è opportuno precisare che non si dovrebbe continuare ad usare espressioni ambigue come MAC (*M. avium complex*) o MAI (*M. avium-intracellulare*) essendoci ormai proposte convincenti per distinzioni nette sul piano classificativo.

Nel 1990 Thorel, Krichevsky e Vincent sono giunti ad una descrizione emendata della specie *M. avium* (Chester, 1901) e, fra le altre caratteristiche, testualmente hanno riferito che:

«I ceppi possono essere sensibili a p-nitrobenzoato, etambutolo, pirazinamide, rifampicina, streptomina e in genere anche all'ansammina. La validità della specie è stata dimostrata dai risultati di numerosi studi di ibridazione DNA-DNA e dalla stabilità termica degli ibridi. ... La specie include parassiti potenziali e parassiti obbligati e va divisa in sottospecie sulla base della patogenicità e dello spettro d'ospite».

M. avium subsp. *avium* è frequentemente ritrovata nell'ambiente ed è agente di tubercolosi negli uccelli. Essa può essere coinvolta in infezioni di una larga gamma di animali (bovini, ovini, caprini, suini, felini, canguri). Le principali forme cliniche

MYCOBACTERIUM

TAB. II. FARMACI ANTIMICOBATTERICI RACCOMANDATI PER IL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DISSEMINATA DA *M. AVIUM* IN PAZIENTI AIDS

(Da Benson, 1996, modificata)

Farmaci	Dosi	Effetti indesiderati	Interazione con altri farmaci (comunemente usati in pazienti HIV+)
Azitromicina	500-1000 mg/die	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, rash cutaneo, aumento delle transaminasi	Gli antiacidi che contengono idrossido di alluminio, di calcio o di magnesio ne riducono la concentrazione plasmatica
Amikacina	10-15 mg/kg/die	Ototossicità e nefrotossicità	Potenziamento dell'azione nefrotossica se impiegata con anfotericina B
Claritromicina	500 mg ogni 12 h	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, cefalea, rash cutaneo, aumento delle transaminasi	Può provocare un aumento delle concentrazioni plasmatiche di carbamazepina, teofillina, astemizolo e terfenadina. Determina una diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di zidovudina
Ciprofloxacina	500-750 mg ogni 12 h	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, insonnia, tremori	Gli antiacidi che contengono idrossido di alluminio, di calcio o di magnesio ne riducono l'assorbimento
Clofazimina	100-200 mg/die	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, vertigini, cefalea, tachicardia, disturbi articolari	
Etambutolo	15 mg/kg/die	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, cefalea, diminuzione dell'acutezza visiva, dolori articolari, aumento delle transaminasi	
Rifampicina	600 mg/die	Diarrea, nausea, vomito, rash cutaneo, cefalea, neutropenia, trombocitopenia	Riduce l'attività di anticoagulanti, antidiabetici orali, dapsona, contraccettivi orali, itraconazolo e ketoconazolo

nell'uomo sono: infezioni polmonari negli adulti, adenopatie sottomandibolari nei bambini, infezioni disseminate in pazienti AIDS.

M. avium subsp. *paratuberculosis*. Caratteristica di questa sottospecie è l'esigenza di micobattina per la crescita in coltura. Non sono stati isolati ceppi dall'ambiente, essendo patogeni obbligati per i ruminanti nei quali provocano paratuberculosis (un'enterite cronica ipertrofica o morbo di Johne). Microrganismi di questa sottospecie possono essere implicati nella malattia di Crohn.

M. avium subsp. *silvaticum*. Caratteristica distintiva di questa sottospecie è l'incapacità a crescere su terreno all'uovo e la preferenza del pH 5,5 per lo sviluppo colturale. Non sono stati isolati ceppi dall'ambiente, essendo patogeni obbligati per gli animali; essi causano tubercolosi negli uccelli (colombi selvatici) e paratuberculosis in mammiferi.

Contro il rischio di errate interpretazioni epidemiologiche, patogenetiche e di farmacoresistenza, Telenti, in occasione del 13° Forum on Microbiology, 1996, ha raccomandato di tener ben separate le specie *M. avium* (MA) e *M. intracellulare* (MI), «le quali generalmente causano malattia in differenti ospiti umani: infezione disseminata da MA in pazienti HIV+, infezione polmonare da MI in pazienti con patologia respiratoria cronica». Egli fa riferimento ai connotati genetici (per es. la sequenza nucleotidica *hsp 65*, *rpoB* del rRNA e la presenza o assenza del frammento di inserzione IS1245) che marciano la separazione di una specie dall'altra.

Micobatteri a rapida crescita responsabili di infezioni iatrogeniche

Si è notevolmente consolidata fino ad oggi la casistica reperibile in letteratura riguardante le manifestazioni granulomatosi dovute ad impianto diretto di micobatteri a rapida crescita in conseguenza di interventi chirurgici e di disseminazione sistemica, ovvero al mancato trattamento medico. Infatti su pazienti ricattati da micobatteri possono essere imposte terapie particolari o altre condizioni di rischio.

È stata in vari casi messa sotto accusa la contaminazione micobatterica di apparecchiature, strumentario, soluzioni medicamentose, etc.

Entro questo interessante capitolo di processi iatrogenici possono essere raggruppate varie entità nosologiche e cioè:

- ascessi sottocutanei al sito d'iniezione di vitamine, vaccini, insulina e altri farmaci;
- endocarditi, pericarditi, mediastiniti, vasculiti e osteomieliti sternali a seguito di interventi di cardiocirurgia;
- suppurazioni sottocutanee in sede pettorale conseguenti ad interventi di mammoplastica;
- peritoniti a seguito di dialisi peritoneale;
- processi granulomatosi cutanei in trapiantati di rene, fegato, cuore, etc. (per lo più nelle sedi di terapia antirigetto);
- infezioni oculari dopo trapianto di cornea o di altro intervento di chirurgia corneale;
- artropatie a seguito dell'impianto di protesi;
- meningiti conseguenti a dissectomia.

In queste forme di patologia iatrogenica da micobatteri risultano frequentemente implicate specie a rapida crescita e più precisamente *M. fortuitum* e *M. chelonae*.

Negli anni 1992-1995 vennero svolte interessanti ricerche su cospicui gruppi di stipiti afferenti a queste due specie per interpretare alcune ambiguità tassonomiche in rapporto alla eterogeneità genetica emergente dall'analisi delle sequenze del gene *16S rRNA*.

Le conclusioni cui sono pervenuti gli esperti consentono di abbandonare le denominazioni di *M. fortuitum-complex* e di *M. chelonae-group* e di distinguere al momento le seguenti specie:

M. fortuitum, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* III (variante sorbitolo+), *M. fortuitum* III (variante sorbitolo-), *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum*.

Gli stipiti appartenenti alle suddette specie sono caratterizzati dalla resistenza ai farmaci antitubercolari «di prima linea» (isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide), dalla suscettibilità in genere ai macrolidi nuovi (claritromi-

TAB. III. INDICAZIONI PER LA TERAPIA DELLE MANIFESTAZIONI PATOLOGICHE CAUSATE DA MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA

(È consigliabile un preliminare test *in vitro*, dato che non tutti gli «isolati» sono suscettibili)

(Da R. J. Wallace Jr., 1996)

Gruppi tassonomici di micobatteri a rapida crescita e farmaci comunemente usati per la terapia		
<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. fortuitum</i> III variante sorbitolo + <i>M. fortuitum</i> III variante sorbitolo	Claritromicina, sulfonamide, nuove tetraciline (doxiciclina, minociclina), fluorochinoloni (pefloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, sparfloxacina), amikacina, imipenem, cefoxitina e cefmetazolo	
<i>M. abscessus</i>	Claritromicina, amikacina, imipenem, cefoxitina, cefmetazolo e clofazimina	
<i>M. chelonae</i>	Claritromicina, imipenem, tobramicina e clofazimina	
<i>M. mucogenicum</i>	Claritromicina, tetraciline, chinoloni, amikacina, imipenem, cefoxitina, trimetoprim/sulfametossazolo, cefmetazolo, amoxicillina/acido clavulanico, cefotaxim	
<i>M. smegmatis</i>	Sulfonamide, tetraciline, chinoloni, amikacina, imipenem, etambutolo	
Farmaci	Posologia sperimentata	
Claritromicina o	500 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Azitromicina	250 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Doxiciclina o	100 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Minociclina	100 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Trimetoprim/sulfa o	800/160 mg tre volte al dì <i>per os</i>	
Sulfametossazolo	1000 mg tre volte al dì <i>per os</i>	
Ciprofloxacina o	500 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Ofloxacina	500 mg due volte al dì <i>per os</i>	
Imipenem	500-750 mg quattro volte al dì e.v.	
Cefoxitina o cefmetazolo	3 g quattro volte al dì e.v.	
Entità clinica	Durata della terapia	Esito
Malattia polmonare	6-12 mesi	Solo miglioramento clinico
Malattia disseminata, osteomielite	6 mesi	Guarigione
Localizzazione cutanea o dei tessuti molli	3-6 mesi	Guarigione
Infezioni da cateterismo	4-8 settimane	Guarigione

cina, azitromicina), alle tetraciline (doxiciclina, minociclina), agli aminoglicosidi (amikacina, tobramicina), ai fluorochinoloni (pefloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, sparfloxacina), e da un comportamento variabile nei riguardi di alcuni β -lattamici e altri chemioantibiotici.

Nella tab. III vengono elencati i prodotti comunemente usati per la terapia delle infezioni da *m.* a rapida crescita e vengono date indicazioni circa il regime terapeutico (posologia giornaliera e durata).

Linfoadenopatie latero-cervicali

Un altro capitolo della patologia da componenti del g. *M.* di crescente interesse (e che ci pone di fronte al dilemma: *emergenza reale o emergenza apparente?*) è quello delle linfoadenopatie latero-cervicali dell'infanzia. La ricca casistica ricavata da recenti articoli in aggiunta a quella descritta in una rassegna monografica di Wolinsky (1995) ci offre motivo per ritenere trattarsi di patologia in apparente aumento perché più facilmente che in passato sottoposta ad accertamento etiologico e a descrizione in letteratura. Le specie micobatteriche implicate risultano essere: *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. interjectum*, *M. haemophilum*, *M. xenopi* e *M. szulgai*.

Molti esperti suggeriscono l'escissione chirurgica come l'intervento di scelta e con più vantaggio se praticata prima della colliquazione del processo granulomatoso e della fistolizzazione: in alcuni casi tuttavia la sola terapia chemioantibiotica (ad es. claritromicina + etambutolo) può determinare la guarigione.

Infezioni da *M. marinum* e occasioni di rischio

Molti sono i fattori che consentono al *M. marinum* di continuare a figurare come il principale agente di granulomatosi cutanea: 1) tale microorganismo è diffuso nell'ambiente acquatico; 2) è associato ad ospiti animali, specialmente pesci; 3) è relativamente resistente ai comuni agenti naturali di disinfezione; 4) penetrando attraverso soluzioni di continuo cutanee anche minime vi si localizza per la preferenza di una temperatura intorno ai 32 °C (acrofilia).

Molteplici sono anche le occasioni di rischio di infezione cui si espone l'ospite umano: ad es. per abrasioni, escoriazioni in piscina, per accudimento di acquari con pesci tropicali, per attività hobbistiche (canottaggio, pesca, giardinaggio, etc.). Da ciò l'ispirazione per definizioni nosografiche fantasiose quali: granuloma da piscina, granuloma da acquario, granuloma da «tempo libero», etc. Nel proporre il nostro schema di inquadramento clinico-epidemiologico

TAB. IV. CONNOTAZIONI CLINICO-EPIDEMIOLOGICHE DELLE INFEZIONI DA *M. MARINUM*

Granuloma da piscina <i>(Swimming pool granuloma</i> <i>o</i> <i>Mycobacteriosis balnei)</i>	Solitamente ad episodi piccolo-epidemici <i>Forme cliniche:</i> 1) papulo-nodulare-ulcerativa 2) sporotricoide Infezione contrattibile per la balneazione in piscine con acque a ricambio naturale o con insufficiente trattamento di disinfezione
Granuloma da acquario <i>(Fish tank granuloma)</i>	Solitamente in casi isolati <i>Forme cliniche:</i> 1) papulo-nodulare-ulcerativa 2) sporotricoide Infezioni contrattibili per accudimento di acquari con pesci esotici
Granuloma professionale <i>(Occupational granuloma)</i> oppure Granuloma accidentale <i>(during leisure time activity)</i>	Solitamente in casi sporadici <i>Forme cliniche:</i> 1) papulo-nodulare-ulcerativa 2) sporotricoide 3) processi a localizzazione sottocutanea (ascessi) <i>Categorie a rischio:</i> pescatori e pescivendoli, barcaioli, addestratori di animali acquatici, addetti ad industrie conserviere ittiche, minatori, etc <i>Occasionalmente:</i> cultori di <i>hobbies</i> , casalinghe in attività culinarie, lavori in giardino, turisti in paesi tropicali, etc

(tab. IV) segnaliamo che in anni recenti si è arricchita nel nostro paese la casistica di patologia collegata con gli acquari, gratificanti microcosmi di natura viva in casa, da accudire però con particolari precauzioni.

In rari casi il processo granulomatoso cutaneo superficiale si estende ai tessuti profondi a dare fascite, tenosinovite, artrite, borsite od osteomielite. Ciò può essere facilitato da anergia per soppressione di cellule T specifiche.

In genere la chemioterapia con rifampicina + etambutolo, isoniazide + rifampicina, minociclina (4-6 settimane) risulta efficace a patto che non si usino steroidi.

Prospettive degli studi in corso in tema di genere *Mycobacterium*

Due sono essenzialmente i filoni di ricerca seguiti con maggiore impegno:

1) proseguimento del programma che fa affidamento sulla tassonomia polifasica (genetico-molecolare + chemotassonomica) per arrivare alla più soddisfacente definizione sistematica dei membri del g. *M.*

L. G. Wayne ribadisce comunque che l'esame della «se-mantide primaria» (il DNA) è la via da percorrere per giungere a definire più sicuramente i confini di ogni specie ed esorta a mettere a punto una metodica di ibridizzazione DNA-DNA da rendere disponibile anche ai laboratori non ancora preparati all'uso di tale tecnologia.

Si ritiene che si potrà in tal modo allargare l'orizzonte speculativo, accelerare la diagnostica e agevolare le valutazioni epidemiologiche.

2) Potenziamiento dei mezzi per far fronte all'avanzata della *tbc* multiresistente che potrebbe «diventare il più drammatico problema nel prossimo decennio».

Gli esperti sono concordi nel ritenere che la strategia vincente non può fondarsi unicamente sull'affannosa ricerca di nuovi farmaci al fine di proporre uno schema chemioterapico alternativo. Esso sarebbe infatti destinato presto al fallimento, essendo ben noto che la farmacoresistenza nel *M. tuberculosis* non è mediata da plasmidi, ma dalla naturale selezione di mutanti resistenti, agevolata quando persino i chemioterapici migliori vengono usati in modo inappropriato e discontinuo.

Mutivi microrganismi verso sbocchi negativi vengono in

tanto forniti dagli studi che hanno cominciato a squarciare la coltre di mistero sul meccanismo genetico della resistenza: certamente interessante è la dimostrazione che «un singolo gene *kat G* (codice per catalasi e perossidasi) restituisce la sensibilità all'INH in un mutante resistente di *M. smegmatis*, e la delezione del *kat G* dal cromosoma è associata con l'INH-resistenza in alcuni ceppi di *M. tuberculosis*». La individuazione dei siti bersaglio e dei processi genico-enzimatici implicati nella chemioresistenza rappresenta la premessa per stimolare a prendere in considerazione rimodellamenti di molecole farmacologiche abbandonate e sperimentazioni di farmaci di nuova generazione.

Si tenga comunque presente il concetto che la lotta contro la multiresistenza della *tbc* è destinata al successo a patto che la chemioterapia, scrupolosamente applicata (in alcuni casi persino con l'obbligo ad assumere i farmaci davanti ad un controllore), venga affiancata da opportuni provvedimenti di ordine sociale, economico e politico, come è stato anche sottolineato di recente da Grosset (1996).

Bibliografia

- Bates J. H., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 942-943.
 Benson C. A., in «Solving the dilemma of antimycobacterial chemotherapy» - 13th Forum in Microbiology, organized by Rastogi N. and Falkinham J. O. III, *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 16.
 Grosset J., in «Solving the dilemma of antimycobacterial chemotherapy» - 13th Forum in Microbiology, organized by Rastogi N. and Falkinham J. O. III, *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 10.
 Levré E., Macerata U. M., Armani G., Caroli G., *Riv. Ital. d'Igiene*, 1981, **41**, 38-44.
 Stone B. B., Nictupski R. M., et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, **45**, 811-819.
 Telenti A., Persing D. H., in «Solving the dilemma of antimycobacterial chemotherapy» - 13th Forum in Microbiology, organized by Rastogi N. and Falkinham J. O. III, *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 73.
 Tenover F. C., Crawford J. T., et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 767-770.
 Thorel M.-F., Krichevsky M., Vincent Lévy-Frébault V., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, **40**, 254-260.
 Wallace R. J., in «Solving the dilemma of antimycobacterial chemotherapy» - 13th Forum in Microbiology, organized by Rastogi N. and Falkinham J. O. III, *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 30.
 Wayne L. G., Sramek H. A., *Clin. Microbiol. Rev.*, 1992, **5**, 1-25.
 Wayne L. G., Good R. C., Bottger E. C., et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 280-297.
 Walusky T., *Clin. Infect. Dis.*, 1995, **29**, 954-963.

GIUSEPPE CAROLI E EGLE LEVRÉ

NASO E SENI PARANASALI [v. vol. X, coll. 1-67]

CHIRURGIA ENDOSCOPICA DEI SENI PARANASALI

SOMMARIO

Cenni storici (col. 3877). - **Selezione dei pazienti** (col. 3878): *Valutazione della gravità del processo sinusitico*. - **Tecnica endoscopica chirurgica** (col. 3880). - **Trattamento postoperatorio** (col. 3885). - **Complicanze della FESS** (col. 3885).

Cenni storici

I primi passi per valutare endoscopicamente l'anatomia delle fosse nasali e del rinofaringe si ebbero nella prima metà del secolo XIX (Bozzini; Baumes; Czermak). Un progresso si ebbe con l'uso del cistoscopio di Nitze-Leiter nel 1879 utilizzato, in modo modificato, circa un anno più tardi, da Zaufal per valutare la tuba di Eustachio. Fino alla fine della prima metà del '900 l'utilità della rinoendoscopia, pur avendo convinti assertori, in generale era molto discussa data la scarsa qualità degli endoscopi e delle fonti luminose.

Nel 1957 un avanzamento significativo nella documentazione endoscopica fu portato da Hopkins che propose di sostituire le ottiche concavo-convexe degli endoscopi con lenti cilindriche. Ciò permise di ottenere immagini più definite ed ampie e ridurre nel contempo il calibro dei telescopi.

Da allora l'attenzione degli endoscopisti si spostò sempre più dalle fosse nasali e dai seni paranasali maggiori, alla valutazione del complesso osteomeatale, punto chiave della patologia rino-sinusale.

È del 1978 il primo lavoro sistematico e particolareggiato, in lingua inglese, illustrante i reperti endoscopici nasali, pubblicato dal prof. W. Messerklinger. Usando l'endoscopio messo a punto da Hopkins, lo studioso evidenziò con le sue indagini sulla *clearance* muco-ciliare dei seni paranasali, l'importanza strategica del complesso osteomeatale, ponendo così le basi per lo sviluppo della chirurgia funzionale endoscopica dei seni paranasali.

Selezione dei pazienti

La chirurgia delle sinusiti croniche condotta con l'uso di endoscopi secondo la tecnica di Messerklinger è internazionalmente conosciuta come *functional endoscopic sinus surgery* (FESS). L'applicazione di questa metodica per il trattamento delle flogosi etmoido-sinusali si basa su tre considerazioni fisiopatologiche sostenute da Stammberger (Stammberger, 1985) e Kennedy (Kennedy *et al.*, 1985):

1. Se la flogosi sinusale non si risolve o recidiva è sicuramente presente a livello etmoidale un'area stenotica che favorisce tale processo. L'area stenotica è generalmente presente a livello infundibolare. La fisiopatologia dei seni frontale e mascellare dipende dallo stato dell'etmoide anteriore.

2. Il trasporto mucociliare a livello dei seni paranasali è orientato secondo linee prestabilite sempre verso l'ostio naturale. Nel caso di flogosi della mucosa del complesso osteomeatale con chiusura degli ostii sinusali ed estensione della flogosi ai seni paranasali, il tentativo di drenarli e riventarli creando una apertura più declive, risulta vano, non potendosi modificare la direzione del trasporto mucociliare, geneticamente predeterminata, che continua quindi in direzione dell'ostio naturale.

3. Nei punti di contatto tra superfici mucose si ha un arresto del trasporto mucociliare. Ciò predispone a una ipertrofia della mucosa stessa con possibilità di sovrapposizione infettiva. Il meato medio per i suoi angusti spazi aerei costituisce un'area a rischio per tali evenienze.

Le considerazioni fisiopatologiche esposte basano i principi guida della chirurgia funzionale endoscopica dei distretti etmoido-sinusali che mira a correggere le anomalie anatomiche del meato medio, allargandolo, a rimuovere ogni materiale infetto a livello delle cellule etmoidali ed a permettere il ripristino della funzionalità osteomeatale (Rice, 1994; Maran, 1994).

Valutazione della gravità del processo sinusitico

Valutazione clinica. - Molti clinici considerano significativa la triade sintomatologica costituita da ostruzione nasale, dolore e/o pesantezza periorbitale e rinorrea posteriore.

Talvolta può associarsi ipo- od anosmia che non tutti gli AA., comunque, considerano un sintomo fondamentale per la diagnosi.

Le più frequenti indicazioni cliniche alla FESS riguardano le sinusiti batteriche croniche, le sinusiti acute ricorrenti e la poliposi nasale.

L'esame obiettivo rinoscopico è indispensabile ai fini di una valutazione clinica. Esso inizia con la rinoscopia anteriore e posteriore per l'esame della mucosa settale e turbinale.

Si associa poi di routine un esame rinoendoscopico controllando accuratamente l'area meatale media, lo sfondato sfenoetmoidale rilevando l'eventuale presenza di aree flogistiche o di presenza di essudato mucopurulento o di neoformazioni polipoidi della mucosa.

Valutazione radiologica. - Se la valutazione clinica del paziente suggerisce una sinusopatia cronica o recidivante si procede ad indagine radiologica tomografica computerizzata (TC). La proiezione coronale risulta la migliore per definire un quadro flogistico etmoido-sinusale. Un esame ben condotto riesce a individuare con accuratezza eventuali alterazioni tanto della mucosa che delle ossa (Zinreich *et al.*, 1987).

La risonanza magnetica nucleare (RMN), utile nell'evidenziare alterazioni dei tessuti molli, non risulta altrettanto efficace nell'osso. È indicata quando si sospetti una patologia rino-etmoidale con estensione intracraniale e/o intraorbitale.

Tecnica endoscopica chirurgica

I pazienti candidati alla FESS prima dell'intervento vengono sottoposti a terapia medica, al fine di ridurre al minimo l'infiammazione.

L'intervento di FESS si può condurre in anestesia locale, dopo sedazione intravenosa e con monitoraggio anestesio-logico, o in anestesia generale.

L'infiltrazione di pochi ml di anestetico viene praticata sul processo uncinato, sulla porzione anteriore del turbinato medio e sulla sua faccia inferiore; qualora sia necessario procedere all'apertura del seno sfenoidale, una ulteriore infiltrazione viene condotta a livello del forame sfenopalatino (fig. 1).

Quando vi sono delle deviazioni settali significative tanto da limitare l'introduzione dell'endoscopio, viene condotta preventivamente una settoplastica; mentre speroni ossei settali vengono rimossi, sotto controllo endoscopico.

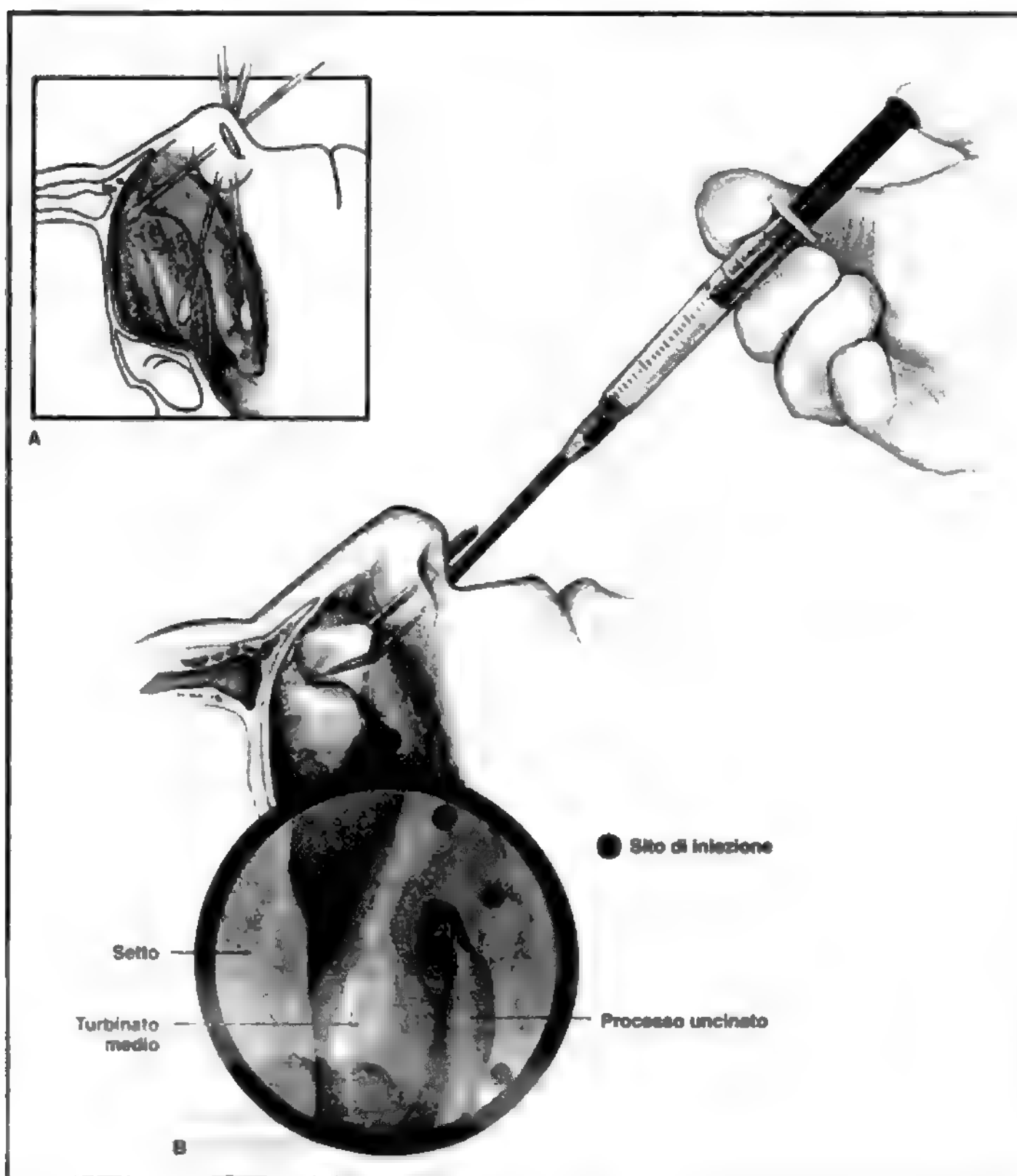


Fig. 1. A) Anestesia locale mediante applicazione di tamponcini imbevuti di anestetici locali. B) Infiltrazione, sotto controllo endoscopico, della parete laterale del naso con una soluzione di lidocaina-adrenalina. (Da Johns M. E., Price J. C., Mattox D. E., *Atlante di Chirurgia Cervico-Facciale*, 1993, Ed., Momento Medico, Salerno, per gentile concessione della Casa Editrice).

Il primo passo nell'etmoidectomia endoscopica è rappresentato dall'incisione con bisturi curvo del processo uncinato. Si procede poi alla sua rimozione facendo attenzione a non ledere, nella porzione craniale, l'attacco del turbinato medio, in quanto ciò potrebbe comportare la formazione di sinechie. Qualora l'identificazione del processo uncinato sia difficoltosa per la presenza di polipi, questi vengono rimossi procedendo poi all'infundibulotomia.

L'etmoidectomia è condotta antero-posteriormente sotto controllo endoscopico (fig. 2). La parete mediale dell'orbita

viene scheletrizzata per evidenziare il limite laterale della dissezione, mentre il limite superiore della dissezione, rappresentato dalla base cranica, viene evidenziato con l'apertura dell'etmoide posteriore.

Dopo aver rimosso la bulla etmoidale, la lamina basale del turbinato medio viene fratturata nella sua porzione infero-mediale. Prima di procedere a quest'ultima manovra, l'endoscopio viene ritirato lentamente al fine di valutare complessivamente il quadro anatomico per assicurarsi che l'apertura sia stata condotta nella giusta posizione.

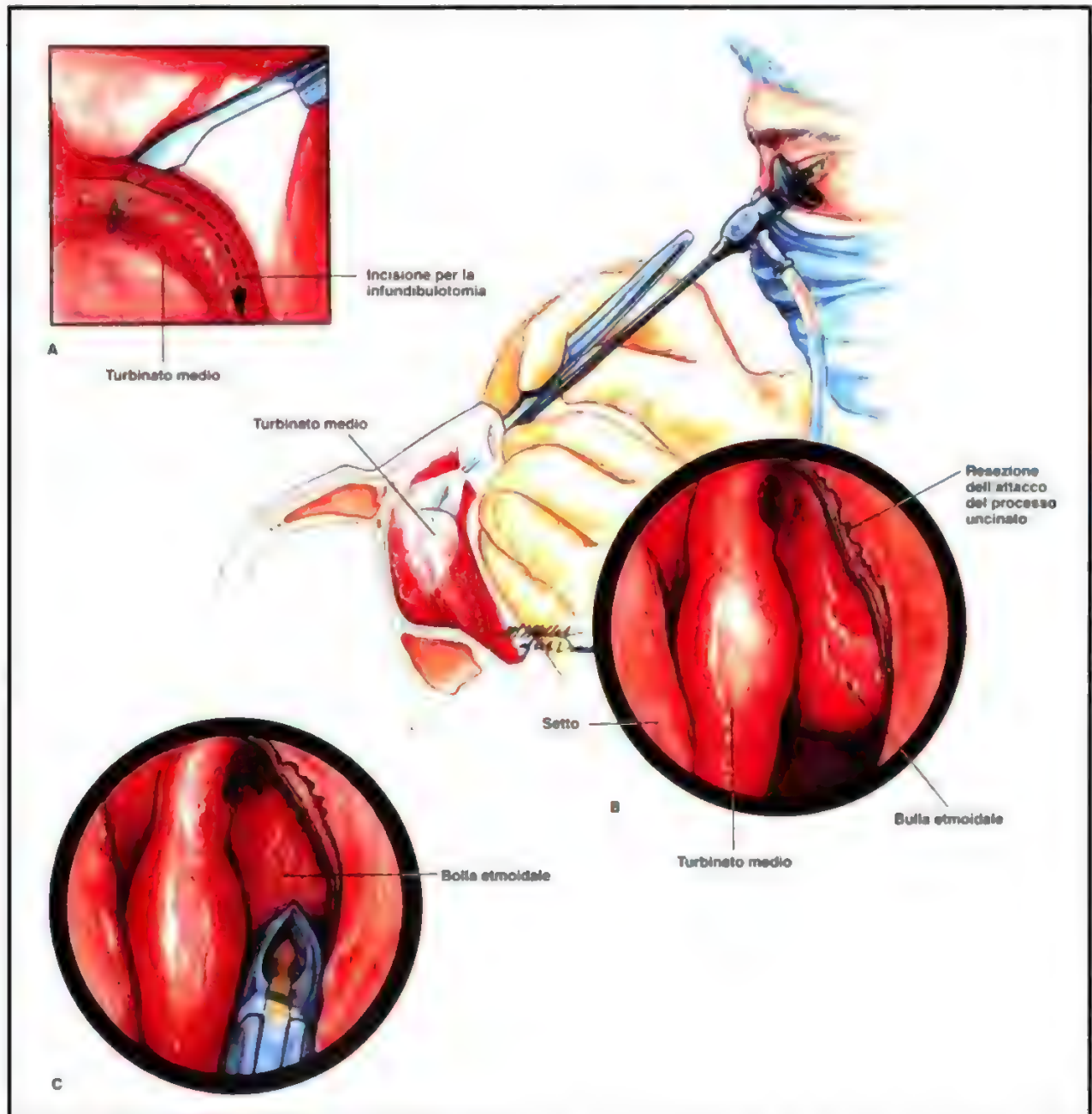


Fig. 2. Intervento di sfenoetmoidectomia endoscopica. A) Incisione per infundibulotomia. B) Rimozione del processo uncinato. C) Asportazione della bolla etmoidale, fratturando la sua superficie mediale e asportandola con le pinze (Da Johns M. E., Price J. C., Mattox D. E., *Atlante di Chirurgia Cervico-Facciale*, 1993, Ed., Momento Medico, Salerno, per gentile concessione della Casa Editrice).

Entrati nell'etmoide posteriore, il tetto della fossa nasale viene scheletrizzato con attenzione rimuovendo i sepimenti ossei intercellulari, procedendo da dietro in avanti e vicino alla parete mediale dell'orbita.

Quando vi è la necessità di aprire il seno sfenoidale, la parete anteriore del seno sfenoidale è aperta nella sua porzione infero-mediale, al fine di evitare un'accidentale apertura di una cellula di Onodi. L'accesso è poi allargato con una pinza di Hajek, facendo attenzione ad allargarlo inferiormente e medialmente in modo tale da includere l'ostio naturale del seno stesso. Generalmente la mucosa all'interno del seno è conservata. Se la presenza di una patologia estesa non permette l'identificazione della base cranica attraverso il seno sfenoidale (fig. 3).

Identificato con accuratezza il tetto etmoidale, si prosegue l'intervento da dietro in avanti, seguendone l'inclinazione fino a giungere al recesso frontale. In questa fase, il telescopio di 4 mm a 0 gradi viene sostituito con uno a 30 gradi. L'arteria etmoidale anteriore si identifica immediatamente al di sotto della base cranica approssimativamente all'altezza della porzione più alta della parete anteriore della bulla etmoidale.

Si deve porre attenzione a che l'ostio naturale del seno frontale venga ben identificato. Se si presenta ostruito o marcatamente stenotico, lo si allarga, operazione che, se

necessaria, è condotta preservando la mucosa quanto più possibile.

L'ostio del seno mascellare viene allargato quando è ristretto e sono presenti segni significativi di patologia sinusale. L'ostio viene generalmente identificato lateralmente alla piccola porzione residua, inferiore, del processo uncinato. L'apertura è identificata spostando il residuo processo uncinato medialmente con un piccolo cucchiaio ovale o con un uncino smusso. L'apertura è quindi allargata posteriormente fino a giungere nelle fontanelle posteriori; si prosegue poi con allargamento infero-anteriormente fino a rimuovere ogni residuo di processo uncinato con una pinza «basket» di Stammberger. Le dimensioni dell'ostioplastica mascellare dipendono dall'estensione della malattia: quando il seno mascellare è gravemente patologico si deve praticare un'apertura maggiore della parete mediale, estendendola anteriormente, facendo attenzione a non ledere il dotto naso-lacrimale (fig. 4).

Nonostante il turbinato medio non sia asportato routinariamente, se particolarmente coinvolto dal processo flogistico o quando subisce una mobilitazione eccessiva conseguente all'intervento di etmoidectomia, si rende necessaria una sua resezione parziale ed occasionalmente totale.

Al termine dell'intervento, se vi è un sanguinamento eccessivo, viene posizionato lateralmente al turbinato medio

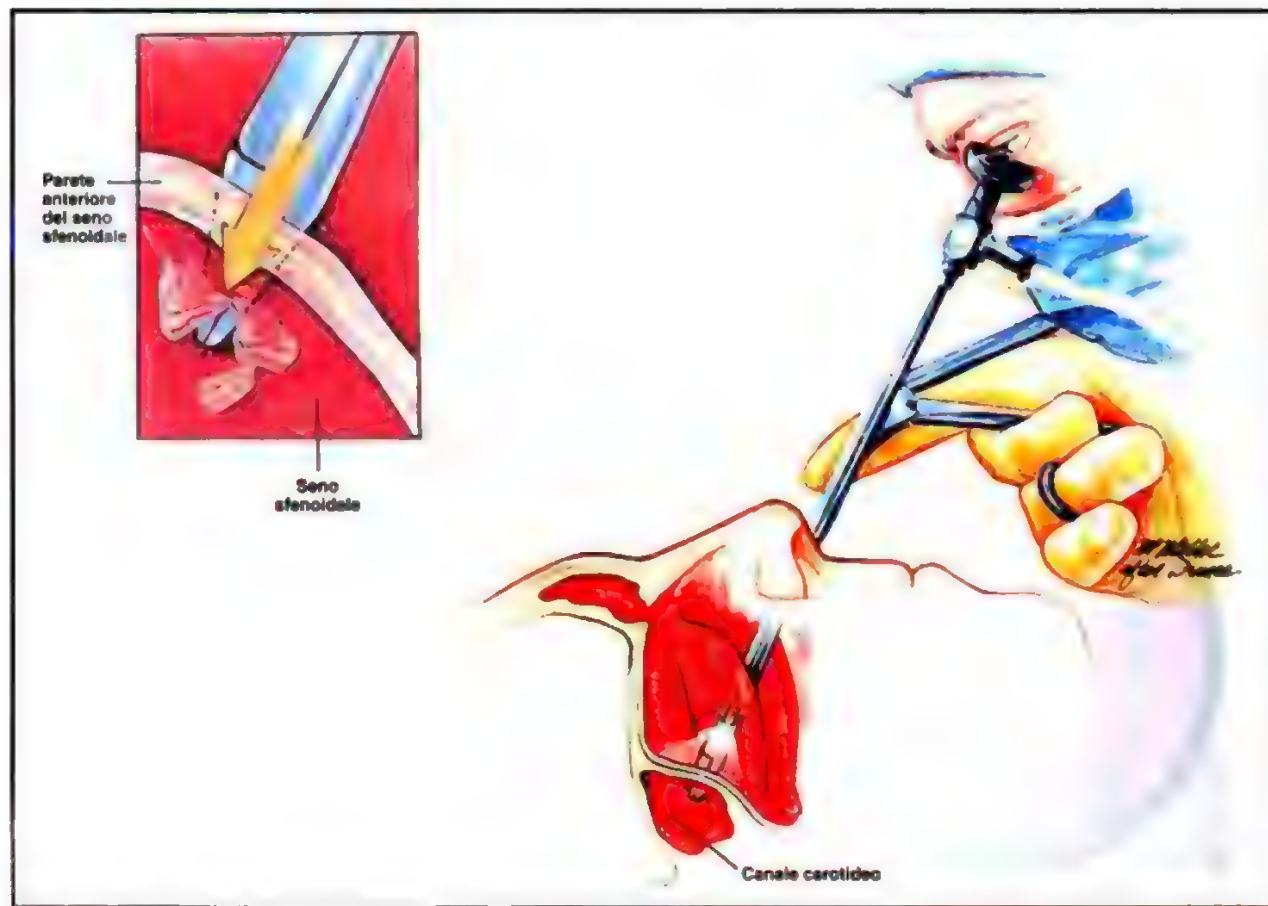


Fig. 3. A sinistra: il seno sfenoidale viene raggiunto penetrando attraverso la parete inferomediale della cellula etmoidale posteriore. A destra: visione d'insieme. (Da John M. E., Price J. C., Munro D. E., *Atlante di Chirurgia Cervico-Facciale*, 1993, Ed., Momento Medico, Salerno, per gentile concessione della Casa Editrice).

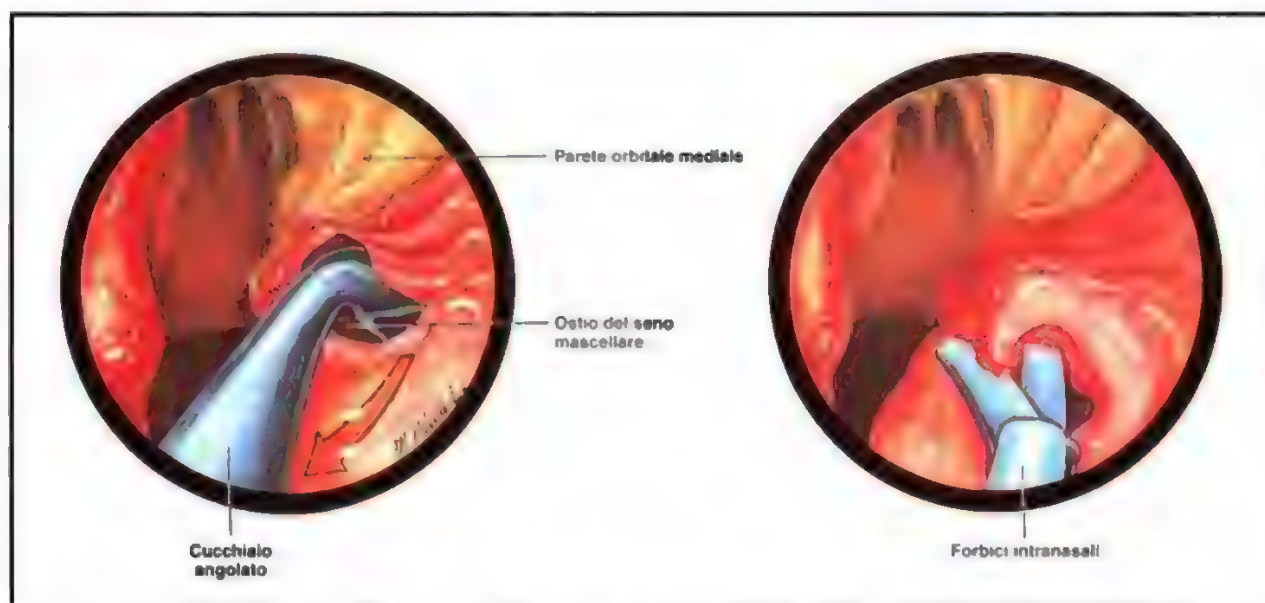


Fig. 4. A sinistra: allargamento dell'ostio del seno mascellare con un cucchiolo angolato. A destra: qualora la mucosa della fontanella posteriore fosse ancora intatta, si utilizzano delle forbici (o bisturi a mezzaluna) per dividerla in senso orizzontale. (Da Johny M. E., Price J. C., Mattox D. E., *Atlante di Chirurgia Cervico-Facciale*, 1993, Ed. Momento Medico, Salerno, per gentile concessione della Casa Editrice)

un tampone nasale Merocel, che viene in genere rimosso dopo 24 ore (Kennedy *et al.*, 1985; Stammberger 1991; Wigand 1990).

Trattamento postoperatorio

Il controllo dell'etmoide operato e la sua toilette sono condotti generalmente nel primo e nel terzo o quarto giorno post intervento. In seguito la detersione viene condotta settimanalmente fino alla normale riepitelizzazione della cavità. I controlli sono eseguiti in endoscopia (telescopio 4 mm a 30°), dopo aver anestetizzato con Pantocaina® le cavità nasali. Con l'uso di pinze sono rimosse le croste ematiche, adesioni fibrinose e frammenti residui osteonecrotici.

Tutti i pazienti vengono trattati con terapia antibiotica per un minimo di dieci giorni nel post-operatorio. Nella maggioranza dei pazienti viene prescritto l'uso di corticosteroidi per via topica (Stammberger, 1991; Kennedy, 1992).

Complicanze della FESS

Le complicanze della chirurgia sinusale endoscopica fortunatamente sono rare ma talvolta possono essere drammatiche.

Possono essere suddivise in due categorie, quelle che coinvolgono il sistema nervoso centrale (S.N.C.) e quelle che coinvolgono il contenuto orbitario.

Le complicanze del S.N.C. comprendono fistola liquorale, danni al parenchima cerebrale ed emorragie intracraniche. La penetrazione della lamina cribrosa può essere evitata rimanendo sempre laterali rispetto all'attacco superiore del turbinato medio. È importante controllare nella TC, prima dell'intervento chirurgico, lo spessore del tetto etmoidale ed è più prudente, quando si lavora in tale sede, mantenere una posizione più vicina alla lamina papiracea. Inoltre, l'inclinazione del tetto cambia considerevolmente antero-posteriormente: nella sua porzione anteriore si trova generalmente al di sopra del piano della lamina cribrosa e

scende appiattendosi posteriormente portandosi allo stesso livello.

I danni orbitali possono variare da una semplice esposizione della periorbita, generalmente senza significato funzionale, o del grasso orbitario fino a lesioni dei muscoli estrinseci dell'occhio o del nervo ottico. Si possono avere inoltre emorragia retrobulbare, caratterizzata da edema palpebrale, ecchimosi, emorragia congiuntivale, dolore, e anche oftalmoplegia. Durante l'intervento di apertura del seno mascellare è bene ricordare che la lamina papiracea è situata sul medesimo piano parasagittale dell'ostio del seno stesso.

Quando si lavora nel seno sfenoidale deve essere posta particolare attenzione alla sua parete laterale dove fanno prominenza il nervo ottico e l'arteria carotide interna.

In rare occasioni, quando si procede troppo anteriormente nell'apertura del seno mascellare, si può ledere il canale naso-lacrimale, incorrendo occasionalmente nella creazione di stenosi che necessitano di essere in seguito riparate.

Complicanze minori sono rappresentate da rinorragia, normalmente controllabile con tamponamento, sinechie nell'area chirurgica, edema, ecchimosi ed enfisema palpebrale (Neumann *et al.*, 1994).

Alcune rare complicanze sistemiche sono infezione dell'area chirurgica e sepsi.

Da ricordare quale complicanza peculiare dell'area nasale, la sindrome da shock tossico (TSS; v. SHOCK TOSSICO, SINDROME DA) caratterizzata da febbre elevata, manifestazioni cutanee con desquamazione e soprattutto da ipotensione ortostatica. Lo shock è dovuto alla tossina-1 (TSST-1) prodotta da alcuni ceppi di stafilococco aureo. È opportuna una adeguata copertura contro tali batteri (Younis, 1991).

Possiamo concludere che la chirurgia endoscopica dell'etmoide, pur rappresentando una metodica affascinante ed efficace, necessita di una rigorosa preparazione e di una adeguata esperienza da parte del chirurgo.

Bibliografia

- Johns M. E., Price J. C., Mattox D. E., *Atlante di Chirurgia Cervico-Facciale*, 1993, Momento Medico, Salerno.
- Kennedy D. W., *Laryngoscope*, 1992, **102**, 1.
- Kennedy D. W., Zinreich S. J., Rosenbaum A. E., Johns M. E., *Arch. Otolaryngol.*, 1985, **111**, 576.
- Maran A. G. D., *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 1994, **251**, 309.
- Messerlinger W., *Endoscopy of the nose*, 1978, Urban and Schwarzenberg, Baltimore.
- Neumann T. R., Turner W. J., Davidson T. M., *ENT Journal*, 1994, **73**, 585.
- Rice D. H., *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1994, **111**, 100.
- Stammberger H., *Functional endoscopic sinus surgery*, 1991, Mosby-Year Book, St. Louis.
- Stammberger H., *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1985, **94**, 143.
- Wigand M. E., *Endoscopic surgery of the paranasal sinuses and anterior skull base*, 1990, Thieme, Stuttgart.
- Younis R. T., Gross C. W., Lazzar R. H., *Head Neck*, 1991, 247.
- Zinreich S. J., Kennedy D. W., Rosenbaum A. E., et al., *Radiology*, 1987, **163**, 760.

RAFAELE BOTTIN

NEFROBLASTOMA (Tumore di Wilms) [v. Agg. I, coll. *5283-5299]

Biologia e genetica

Il trattamento del tumore di Wilms [TW] è uno dei più grandi successi nella storia della oncologia pediatrica. Negli ultimi tre decenni infatti le nuove strategie terapeutiche sviluppatesi hanno portato a dei risultati di sopravvivenza, nei TW ad istologia sfavorevole, che difficilmente si riscontrano nei tumori in età pediatrica; v. NEFROBLASTOMA*, *terapia*. La neoplasia colpisce un bambino ogni 10.000 e studi effettuati su popolazioni di emigranti indicano che le enormi variazioni nella sua incidenza sono da mettere più in relazione alla derivazione etnica piuttosto che a quella geografica, il che suggerisce il coinvolgimento di fattori genetici.

Nonostante le nuove conoscenze nella comprensione di questa neoplasia alcuni aspetti delle sue basi genetiche, soprattutto per quanto attiene alla forma sporadica, rimangono largamente sconosciute. L'1-2% circa dei TW hanno una incidenza familiare e un ulteriore 2% risulta come parte di alcune sindromi ben conosciute che predispongono alla neoplasia stessa (TW più aniridia [v. WAGR, SINDROME DI**], la sindrome di Beckwith-Wiedemann [v. BECKWITH-WIEDEMANN, SINDROME DI**], la sindrome di Denys-Drash, caratterizzata da TW, malformazioni urogenitali con insufficienza renale e pseudoermafroditismo).

La maggior parte dei casi (95%), che fanno parte della forma cosiddetta *sporadica*, viene ritenuta causata dalla mutazione di un gene che predispone al TW e il cui ruolo ancora non è completamente chiarito, benché circa il 10% sia associato con le forme isolate di emipertrofia o di malformazioni delle vie urinarie. Il modello genetico per lo sviluppo del TW è stato proposto per la prima volta e in maniera originale da Knudson e Strong nel 1972.

Basando le proprie analisi sulla età alla diagnosi e assumendo una velocità di mutazione costante, i due AA. suggerirono che lo sviluppo di un TW richiedesse un evento genetico in due stadi. I bambini con una suscettibilità di tipo genetico manifesteranno una lesione iniziale nella loro linea germinale, sia essa trasmessa dai genitori sia dovuta ad una nuova mutazione. La possibilità quindi di un secondo *apporto* genetico alla formazione di una neoplasia viene in questo modo grandemente facilitata, se comparata con i casi sporadici ai cui sono necessarie due mutazioni somatiche indipendenti.

Gli studi genetici effettuati hanno confermato il modello di Knudson e Strong, dimostrando che i due stadi presupposti sono costituiti dall'inattivazione di entrambi gli alleli di un gene soppressore. In molti casi il primo allele viene

inattivato da una mutazione intrinseca al gene stesso, mentre il secondo allele viene inattivato da una grossolana perdita di materiale cromosomico, rilevata attraverso la cosiddetta perdita di eterozigosi (LOH: *Loss of Heterozygosity*). L'ipotesi in due tempi sottolinea quindi come gli individui suscettibili, come ad es. i casi familiari oppure quelli con malattia multifocale ovvero quelli con anomalie congenite predisponenti, hanno una età media inferiore, alla diagnosi, di coloro senza queste caratteristiche.

Ad oggi risulta chiaro che sono molti i *loci* cromosomici coinvolti nell'etiologia di questa neoplasia maligna dell'età pediatrica. Questi includono i cromosomi 11p13 (WT1), e 11p15 (WT2), e molto probabilmente uno a livello del Xq26-27. Oltre a questi, molti *loci* genetici sono coinvolti nella progressione del TW tra i quali ricordiamo il cromosoma 16q, l'1p, e l'antioncogene p53 a livello del cromosoma 17p13.

Le sindromi di WAGR e di Denys-Drash sono associate ad alterazioni genetiche (mutazioni) della banda 13 del braccio corto del cromosoma 11 su cui è situato l'antioncogene del tumore WT1, implicato nella genesi e nello sviluppo del 10-15% di tutti i nefroblastomi.

L'RNA messaggero (mRNA) del gene WT1 non mutato, mediante la tecnica del *Northern blot* (v. BLOTTING*), viene riscontrato in alcuni tessuti embrionali e specificamente nel rene dove è direttamente implicato nel suo sviluppo e differenziazione, e in diversi organi dell'adulto. Mutazioni del gene WT1 possono condurre o alla mancata costituzione del prodotto proteico come nella delezione di numerosi nucleotidi o più frequentemente all'espressione di una proteina dall'alterato assetto conformazionale cui consegue una alterata funzionalità (v. ANTIONCOGENI**, col. **471).

Queste alterazioni genetiche possono essere mutazioni «missense» (sostituzione di un aminoacido con un altro), «nonsense» (sostituzione di un codone codificante con un codone stop) o delezioni puntiformi.

Le più frequenti modificazioni strutturali del gene sono le mutazioni *missense* a carico di sequenze nucleotidiche altamente conservate nelle diverse specie, e quindi fondamentali nella costituzione di una proteina funzionante. Il gene WT1 sopprime la trascrizione di diversi geni tra cui quella del PAX2 (v. PAX GENE**) la cui soppressione è richiesta normalmente per la differenziazione delle cellule epiteliali renali tubulari e glomerulari. L'azione del gene PAX2 si esplica in condizioni fisiologiche solo nelle fasi precoci della differenziazione del tessuto epiteliale renale: infatti il gene viene attivato subito dopo l'induzione del blastema metanefrico. La mancata soppressione del gene PAX2 durante le fasi terminali del processo maturativo, conseguentemente la mutazione del gene WT1, comporta una incontrollata espressione della proteina con alterazioni dello sviluppo dell'organo e costituzione di un rene ipoplasico e/o displasico.

L'antioncogene WT1 interagisce inoltre con la fetoproteina nucleare p53 così denominata per il suo peso molecolare di 53 kdalton (a tal riguardo, v. P53 GENE E PROTEINA**).

Inoltre l'antioncogene p53 è un induttore della apoptosi ([v.**], morte cellulare programmata) che consegue all'azione citotossica dei farmaci chemioterapici e delle radiazioni ionizzanti. In questo modo l'inattivazione del gene p53 potrebbe sia aumentare il pool di cellule proliferanti, sia la probabilità della loro trasformazione neoplastica mediante l'inibizione della apoptosi.

Le cellule neoplastiche che contengono alterazioni della funzionalità del gene p53 presentano una aumentata resistenza alla morte indotta dalle radiazioni ionizzanti e dagli agenti chemioterapici e una frequenza aumentata di mutazioni, includendo quelle dei geni coinvolti nelle metastasi.

Mentre l'antioncogene *p53* non è osservato frequentemente nei TW con fenotipo istologico favorevole, un suo elevato riscontro si osserva invece nei sottotipi anaplastici.

L'alterazione genetica della sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS), differentemente dalla sindrome WAGR e dalla sindrome di Denys-Drash, è stata assegnata al cromosoma 11p15 vicino ai geni che codificano l'insulina e il fattore di crescita similinsulinico. È stato ipotizzato che nella predisposizione al TW osservata nella BWS, sia implicato un nuovo meccanismo «mutazionale» chiamato *imprinting* che consiste in una diversa espressione dei geni a seconda della loro origine materna o paterna. Differentemente dalle mutazioni, nel processo di *imprinting* non sono presenti alterazioni delle sequenze nucleotidiche dei geni ma esclusivamente una loro alta metilazione che li distinguerebbe dai geni non *imprinted*. Oltre BWS, il TW presenta una incidenza superiore alla norma in una altra sindrome, quella di Simpson-Golabi-Behmel (SGB), che viene trasmessa come legata al sesso (Xq25-27). Il locus responsabile della sindrome SGB ancora non è stato clonato e quindi non è stata ancora valutata la sua evenienza nelle forme sporadiche. Speculativamente si pensa che se il locus per la BWS rappresenta il locus cosiddetto *imprinted*, così il locus per l'SGB rappresenta l'*imprintor*.

La forma familiare di TW, benché rara, sembra essere legata ad una trasmissione di tipo autosomico dominante accompagnata da una bassa e variabile penetranza. La bassa incidenza ha complicato ulteriormente la ricerca del gene coinvolto in questo tipo di trasmissione. Comunque sono state escluse sia la trasmissione attraverso l'11p13 e l'11p15; l'esclusione inoltre del 16q rende ancora sconosciuta la modalità di trasmissione di questa forma. Recentemente, in una genealogia comprendente 7 casi di TW familiare, è stata dimostrata una localizzazione a livello del cromosoma 17q.

Di certo si può solo sostenere che la forma familiare è particolarmente eterogenea, ma ulteriori studi sono necessari per una definizione più completa.

Istologicamente il TW mostra una particolare somiglianza con la nefrogenesi e si pensa che sia il risultato di una mutazione avvenuta nei geni coinvolti in questo processo. La nefrogenesi normalmente cessa alla 36ª settimana di età gestazionale e di conseguenza il TW si pensa che inizi da questo momento. Ciò spiega anche la persistenza di regioni di tessuto nefrogenico primitivo, note come resti nefrogenici, nel rene controlaterale in circa il 40% dei casi della forma sporadica di TW. Studi approfonditi sui fattori ambientali cui il feto viene esposto durante le fasi della gravidanza non hanno rilevato alcun agente associato in maniera consistente ad un incremento di rischio per questo tipo di patologia. Molti TW probabilmente sono dovuti a mutazioni somatiche in uno o più dei cosiddetti geni *WT* e la progressione alla franca neoplasia altrettanto probabilmente richiede un evento ulteriore la cui natura ancora non è chiarita.

Bibliografia

- Beckwith J. B., *Birth Defect*, 1969, **5**, 188-197.
 Breslow N., Beckwith J. B., Ciol M., Sharples K., *Cancer Res.*, 1988, **48**, 1653-1657.
 Breslow N. E., Olsan J., Moksness J., Beckwith J. B., Grundy P., *Med. Pediatr. Oncol.*, 1996, **27**, 398-403.
 Knudson A. G., Strong L. C., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1972, **48**, 313-324.
 McKusick V. A., ed., *Mendelian Inheritance in Man*, 1998, Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.
 Rahman N., Arbour L., Tonin P. et al., *Nature Genetics*, 1996, **13**, 461-463.
 Wiedemann H. R., *J. Genet. Hum.*, 1964, **13**, 223-232.

ALESSANDRO INSERRA,
GUIDO CIPRANDI E CAMILLO BUGGINO

NEFROPATIE CISTICHE: V. NEFROPATIE MEDICHE (X, 264-282); NEFROPATIE MEDICHE**, *nefropatie cistiche* (col. **3908).

NEFROPATIE MEDICHE [v. vol. X, coll. 97-316; Agg. I, coll. *5300-5331]

SOMMARIO GENERALE

NEFROPATIE GLOMERULARI	col. 3890
NEFROPATIE CISTICHE	col. 3908

NEFROPATIE GLOMERULARI [v. vol. X, 105-249; Agg. I, coll. *5300-5325]

SOMMARIO

Glomerulonefriti associate al virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV-1) (col. 3890): *Glomerulosclerosi focale e segmentaria (GSFS)*. - *Glomerulopatia da depositi di IgA e glomerulopatia mesangiale*. - *Uremia terminale*. - **Glomerulopatie associate al virus dell'epatite C (HCV)** (col. 3891): *Crioglobulinemia mista essenziale (di tipo II)*. - *Glomerulonefrite membranoproliferativa*. - *Glomerulopatia membranosa*. - **Sindrome di Alport** (col. 3893): *Genetica*. - **Glomerulopatie di recente identificazione** (col. 3894): *Glomerulopatia da deposizione di fibrille non amiloidee*. - *Glomerulopatia da deposizione di fibronectina*. - *Glomerulopatia da deposizione di collagene di tipo III*. - *Glomerulopatia da lipoproteine*. - **Trattamento delle glomerulopatie con ciclosporina** (col. 3903): *Introduzione*. - *Nefropatia a lesioni minime (NLM)*. - *Glomerulosclerosi focale e segmentaria (GSFS)*. - *Nefropatia membranosa (NM)*.

Glomerulonefriti associate al virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV-1)

Diverse complicazioni renali sono possibili in corso di infezione provocate dal virus HIV-1. Tra queste vi sono anche diversi tipi di glomerulopatia. Alcune sono provocate da infezioni sovrapposte, quali l'epatite B o la sifilide, altre invece sono forme dovute al virus HIV-1 stesso.

Glomerulosclerosi focale e segmentaria (GSFS)

Colpisce soprattutto i pazienti di razza negra e di sesso maschile in alcune aree degli Stati Uniti d'America (Miami e New York). È associata a proteinuria di entità nefrosica, talora molto severa, e a rapido deterioramento della funzione renale, che può condurre ad uremia terminale in pochi mesi. Altre caratteristiche cliniche tipiche sono l'assenza di ipertensione arteriosa e la normale dimensione dei reni.

Inizialmente è stato difficile distinguere la GSFS da HIV-1 dalla GSFS associata all'abuso di eroina. Tuttavia, una maggiore esperienza ha dimostrato che meno della metà dei pazienti affetti da GSFS da HIV erano eroinomani, mentre i restanti pazienti o erano figli di madri HIV-positive, o erano stati trasfusi con sangue infetto, o avevano contratto l'infezione attraverso rapporti eterosessuali. Inoltre, nella GSFS da eroina vi è frequentemente ipertensione arteriosa ed i reni sono di dimensioni ridotte.

I principali fattori di rischio per la GSFS da HIV-1 sono la razza negra ed il sesso maschile. Pertanto, essa è rara nella popolazione europea di razza caucasica, e anche in Europa il più delle volte è osservata in individui di origine Africana o Caraibica.

Il quadro istologico è quello di una GSFS con alcune peculiarità: i podociti sono rigonfi, non vi è ipercellularità, e parte del glomerulo è collassata (fig. 1). I lumi tubulari sono dilatati e contengono voluminosi cilindri. La fibrosi interstiziale è severa, spesso sproporzionata rispetto al danno glomerulare, ed è precoce. Alla microscopia elettronica si

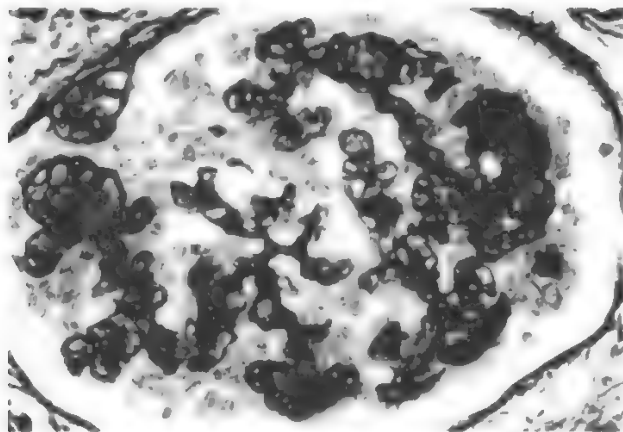


Fig. 1. Glomerulosclerosi focale e segmentaria in corso di infezione HIV-1 con il tipico e diffuso rigonfiamento dei podociti (colorazione argentea di Jones; 500 $\times$). (Per gentile concessione della Professoressa V. D'Agati, New York).

osservano strutture tubuloreticolari all'interno delle cellule tubulari e nei leucociti infiltranti l'interstizio. Probabilmente tali strutture sono il risultato di una risposta cellulare ad uno stimolo virale. Benché queste lesioni siano state osservate anche in pazienti di razza negra con GSFS in assenza di infezione da HIV-1, l'opinione prevalente è che la GSFS da HIV-1 rappresenti un'entità clinicopatologica autonoma.

La patogenesi non è chiara: proteine di origine virale e genoma virale sono stati dimostrati nel rene, e ratti transgenici per HIV-1 sviluppano infezione renale e glomerulosclerosi. È stato anche suggerito il coinvolgimento del TGF- β sia nella fibrosi interstiziale che nella replicazione del virus.

Nessun tipo di trattamento si è dimostrato in grado di bloccare la progressione della nefropatia. Una segnalazione ha suggerito la possibile utilità dei corticosteroidi (parallelamente a quanto avviene in circa il 20% dei pazienti con GSFS idiopatica) in alcuni pazienti che probabilmente avevano una glomerulopatia a lesioni minime sovrapposta.

Glomerulopatia da depositi di IgA e glomerulopatia mesangiale

In diversi pazienti, invece che GSFS è stata riscontrata una glomerulopatia da IgA, di tipo proliferativo mesangiale o extracapillare. In altri casi, infine, è stata osservata una glomerulonefrite di tipo proliferativo mesangiale senza immunoglobuline, o con sola IgG all'immunofluorescenza.

Uremia terminale

La prognosi dei pazienti con infezione da HIV e nefrite attiva è determinata soprattutto dall'evoluzione della malattia in organi diversi dal rene. Contrariamente a quanto sostenuto inizialmente, la dialisi può fornire una sopravvivenza fino a due anni con discreta qualità della vita. Per la scarsa disponibilità di organi e la conoscenza che la sopravvivenza di questi pazienti è limitata, il trapianto di rene è effettuato raramente in questi casi.

Glomerulopatie associate al virus dell'epatite C (HCV)

Alla fine degli anni '80 si è scoperto che la maggior parte delle epatiti virali classificate fino ad allora come «forme non-A non-B» erano dovute ad un virus RNA il cui genoma contiene circa 9400 nucleotidi, e che è stato de-

nominato «virus dell'epatite C» o HCV (v. EPATITI DA VIRUS**).

In questi ultimi anni la presenza dell'infezione da virus C è stata osservata in numerosi pazienti portatori di diversi tipi di glomerulopatia. Pertanto, similmente a quanto avvenuto in precedenza per il virus dell'epatite B, si è giunti a ritenere che tra l'infezione da HCV ed alcune forme di glomerulonefrite possa esistere una relazione di causa-effetto. Attualmente tale ipotesi è sufficientemente documentata per la crioglobulinemia mista essenziale (v. CRIOGLOBULINEMIE**, coll. **1442-1443), mentre è più incerta per altre forme, quali la glomerulonefrite membranoproliferativa e la glomerulopatia membranosa.

Crioglobulinemia mista essenziale (di tipo II)

È una forma caratterizzata dalla presenza, nel siero, di crioglobuline contenenti IgG policlonali legate ad un'antiglobulina, che agisce come un fattore reumatoide anti IgG, di tipo monoclonale (quasi sempre IgMk). Clinicamente essa si associa a epatopatia, porpora e ad una particolare forma di glomerulonefrite membranoproliferativa, con trombi intracapillari e infiltrazione di monociti nelle fasi acute, e depositi di tipo microtubulare alla microscopia elettronica (v. CRIOGLOBULINEMIE**).

Un ruolo patogenetico del virus C in questa forma è suggerito da due tipi di dati, ambedue molto importanti: a) anticorpi anti-HCV e RNA virale sono stati dimostrati in percentuali variabili, ma sovente molto elevate (fino al 100% dei casi) in numerosi studi italiani, francesi e statunitensi; b) il trattamento con interferone alfa (che legandosi a specifici recettori di membrana stimola l'azione di enzimi che inibiscono la replicazione virale all'interno delle cellule infettate) riduce la viremia e migliora diversi parametri biochimici e clinici. In particolare, uno studio controllato condotto da Misiani *et al.* (1994) ha dimostrato che l'interferone alfa somministrato per 24 settimane (1,5 milioni di U.I. 3 volte/settimana per la prima settimana, seguito da 3 milioni di U.I. per 3 volte/settimana per il restante periodo) induce nel 60% dei pazienti la negativizzazione dell'RNA virale, una significativa riduzione dei livelli ematici di: crioglobuline, fattore reumatoide e IgM, e un miglioramento della funzione renale e della porpora. Ad ulteriore conferma del ruolo dell'HCV in questa forma, l'RNA virale si è ripositivizzato dopo la sospensione del trattamento e il quadro biochimico e clinico è ripeggiorato. Dati simili sono stati dimostrati in altri studi, quasi tutti non controllati. Inoltre, in uno studio di Johnson *et al.* (1993) è stato osservato che il trattamento con interferone alfa può causare anche una notevole riduzione della proteinuria, mentre in un paziente descritto da Yamabe *et al.* (1995) si è visto che la negativizzazione della viremia ed il miglioramento del quadro biochimico e clinico possono essere duraturi somministrando interferone alfa per un breve periodo ma ad elevati dosaggi (ad es. 10 milioni di U.I./die per 2 settimane, seguito da 10 milioni di U.I. tre volte/settimana per altre 6 settimane). Effetti collaterali minori, quali sindrome simil-influenzale, lieve leucopenia o inappetenza sono frequenti, mentre altri, quali alopecia, insonnia, cefalea, irritabilità, sono occasionali. Non va dimenticato, tuttavia, che in alcuni pazienti il farmaco è stato sospeso per effetti collaterali severi quali fibrillazione atriale, depressione, neuropatia ed eritema multiforme.

Glomerulonefrite membranoproliferativa

Alcuni AA. hanno descritto pazienti HCV-positivi con glomerulonefrite membranoproliferativa in assenza di crioglobuline circolanti. Tuttavia, alcuni di questi pazienti hanno

sviluppato crioglobuline in un secondo tempo, mentre altri presentavano anomalie biochimiche tipiche della crioglobulinemia, quali ad es. la positività per il fattore reumatoide o bassi livelli sierici di C4. Pertanto, l'associazione tra infezione da HCV e glomerulonefrite membranoproliferativa al di fuori di un quadro di crioglobulinemia è attualmente incerta.

Glomerulopatia membranosa

Sei pazienti HCV-positivi con nefropatia membranosa sono stati descritti finora in aree geografiche diverse (Italia, Stati Uniti, Giappone, Australia). Tutti tranne uno avevano una sindrome nefrosica. Un paziente è stato trattato con interferone alfa per sei mesi, senza tuttavia nessun miglioramento della proteinuria.

Un ulteriore elemento a favore del ruolo dell'infezione da HCV nel favorire le nefropatie glomerulari potrebbe derivare dalla dimostrazione del genoma virale in sede glomerulare. Tuttavia, i risultati attualmente disponibili sono pochi e contrastanti. Mentre alcuni AA. hanno osservato particelle similvirali mediante microscopio elettronico in sede glomerulare o hanno identificato il genoma virale in biopsie renali mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*), altri hanno ottenuto risultati negativi. Se ciò dipenda solo da una bassa carica del virus in sede renale o da altri fattori non è attualmente noto.

Sindrome di Alport

Genetica

1. *Ereditarietà legata al sesso.* – Negli ultimi cinque anni si sono accumulati molti dati rilevanti circa la natura della sindrome di Alport (v. anche ALPORT, SINDROME DI [v.*; v.**]). La forma classica, che costituisce più del 90% dei casi, è una malattia legata al cromosoma X, e clinicamente è caratterizzata da alterazioni della membrana basale glomerulare, sordità, lenticono ed alterazioni retiniche. Il gene che codifica questa malattia è stato localizzato, alla fine degli anni '80, nel braccio lungo del cromosoma X in sede Xq22. Nel 1990 è stata descritta per la prima volta una mutazione del gene codificante la catena $\alpha 5$ del collagene IV (*COL4A5*), e da allora sono state riportate più di 200 diverse mutazioni di questo gene, che vanno dalla delezione completa a mutazioni puntiformi o a cambiamenti di struttura. Ciò è importante in quanto il collagene IV è un componente maggiore della membrana basale glomerulare. La catena $\alpha 5$, inoltre, forma una tripla elica con un'altra catena recentemente descritta, la catena $\alpha 6$. Questa è codificata in un punto molto vicino al gene per il collagene IV α , e mutazioni che colpiscono sia la estremità 5' del complesso *COL4A5* che parte del complesso *COL4A6* sono state descritte in famiglie con malattia di Alport e tumori diffusi della muscolatura liscia dell'intestino (*leiomiomatosi*). Tuttavia, in circa il 40% dei pazienti non è possibile identificare mutazioni nelle porzioni di *COL4A5* già mappate, ciò che può essere dovuto ad una conoscenza solo parziale del gene o a mutazioni più vicine alla terminazione 3'. Alcune implicazioni cliniche molto importanti di questi fatti sono che: a) in alcuni pazienti la malattia potrebbe manifestarsi come il risultato di una mutazione *de novo*, in assenza di familiarità; b) in famiglie con la stessa mutazione vi possono essere considerevoli variazioni fenotipiche nella severità e tempo di comparsa della malattia.

2. *Ereditarietà di tipo autosomico recessivo.* – In circa il 5% delle famiglie colpite entrambi i sessi sono ugualmente affetti, con esordio precoce anche nelle persone di sesso femminile. La sordità è di grado variabile e non vi sono lesioni oculari. Inoltre vi può essere consanguineità. Non

c'è mutazione nel complesso *COL4A5*. Alcune di queste famiglie hanno alterazioni del cromosoma 2, e probabilmente mutazioni nelle catene 3α o 4α del collagene IV. È ancora controverso se questi casi siano da considerare come una «vera sindrome di Alport» oppure no. Il problema tuttavia è puramente semantico in quanto essi sono difficilmente distinguibili dal punto di vista clinico dai pazienti con sindrome di Alport classica. Infine, sono state descritte alcune rare famiglie con ereditarietà di tipo dominante.

3. *Nefrite da anticorpi anti-membrana basale.* – Nella sindrome di Goodpasture (v. GOODPASTURE, SINDROME DI) vi sono anticorpi anti-membrana basale diretti contro un componente del collagene contenuto nella membrana basale. Tale componente è stato identificato come una parte di natura diversa dal collagene (NC-1) della catena $\alpha 3$ del collagene IV, che forma una triplice elica con la catena $\alpha 4$, allo stesso modo che con le catene $\alpha 5$ e $\alpha 6$, ed è codificato dal cromosoma 2. È pertanto interessante che nel 2-5% dei pazienti con sindrome di Alport si formino anticorpi anti-membrana basale dopo trapianto di reni la cui membrana basale è normale. In qualche modo la mutazione che si verifica nella sindrome di Alport altera l'integrità strutturale della catena $\alpha 3$, così che essa è riconosciuta come un nuovo antigene. In alcuni pazienti con sindrome di Alport sottoposti a trapianto di rene questi anticorpi anti-membrana basale non sono associati a malattia, ma in altri si verifica una glomerulonefrite extracapillare severa e quasi sempre irreversibile, che porta alla perdita del rene trapiantato.

Fenotipicamente, quasi tutti i 27 pazienti descritti avevano una sindrome di Alport associata al cromosoma X e avevano sviluppato insufficienza renale nell'infanzia o nell'adolescenza, e tutti, con l'eccezione di tre, erano maschi. La ricerca di possibili mutazioni in questi casi ha dimostrato che questi pazienti hanno in genere grosse delezioni nel complesso *COL4A5*. In questo sottogruppo di pazienti il rischio di una glomerulonefrite *de novo* può anche essere del 40%. Tuttavia, mutazioni puntiformi sono state associate con la nefrite in due pazienti. Di tre pazienti di sesso femminile con nefrite *de novo*, due avevano mutazioni nel complesso *COL4A3* del cromosoma 2.

Glomerulopatie di recente identificazione

Glomerulopatia da deposizione di fibrille non amiloidee

Di questa forma, descritta per la prima volta nel 1977 da Rosenmann e Eliakim, sono stati finora riportati 170 casi. Essa è osservata in circa l'1% delle biopsie effettuate su reni non trapiantati negli Stati Uniti, mentre sembra essere molto più rara in Europa.

La caratteristica di questa nefropatia è la presenza in sede glomerulare di fibrille che si differenziano da quelle dell'amiloide in quanto hanno un diametro superiore e non si colorano con il Rosso Congo, la tioflavina T, o il cristal-violetto.

La maggior parte dei pazienti giunge all'osservazione per il riscontro di proteinuria, che sovente è di entità nefrosica. Insufficienza renale cronica ed ipertensione sono presenti in circa la metà dei pazienti, e microematuria in circa il 60% dei casi. Insufficienza renale rapidamente progressiva e macroematuria sono rare. Abituamente non vi sono manifestazioni cliniche extrarenali. Tuttavia in due pazienti è stata osservata, contemporaneamente alla nefropatia, anche una severa alveolite emorragica polmonare, che in un caso era associata a fibrille, nel polmone, simili a quelle presenti nel rene. La maggior parte dei pazienti non presenta anomalie sierologiche, ma in circa il 13% dei casi sono stati osservati anticorpi antinucleo in titoli talvolta molto elevati. Occa-

sionalmente vi è abbassamento della complementemia, raramente una componente monoclonale.

Finora pochi pazienti sono stati sottoposti a trattamento con steroidi e/o citostatici, e solo in alcuni di essi si è osservato un miglioramento della proteinuria o dell'insufficienza renale. L'evoluzione nel tempo è spesso sfavorevole, dato che circa il 40% dei casi sviluppa uremia terminale, talvolta in pochi mesi, ed un addizionale 25% insufficienza renale cronica.

Espansione e proliferazione mesangiale ed ispessimento delle pareti capillari sono le lesioni istologiche tipiche. Tuttavia, in alcune casistiche sono state descritte anche forme di tipo membranoso, membranoproliferativo ed extracapillare. Trombi intracapillari ed essudazione di polimorfonucleati sono possibili, ma rari. L'esame immunohistologico dimostra abbondanti depositi granulari o nastriformi sia in sede mesangiale che parietale, anche se sono stati descritti alcuni casi con immunofluorescenza negativa o minima. IgG, soprattutto IgG4, e C3 sono gli antigeni principali. Ambedue le catene leggere sono presenti, ma la catena κ è sovente predominante. La microscopia elettronica, che è indispensabile per la diagnosi di questa nefropatia, dimostra che i depositi osservati all'esame immunohistologico, sono costituiti da fibrille. Queste possono essere di due tipi: a) fibrille a disposizione irregolare con diametro compreso tra i 12 ed i 20 nm (fig. 2); b) microtubuli con disposizione in fasci paralleli e con diametro che può giungere sino ai 90 nm, ma mediamente attorno ai 40 nm (fig. 3). I microtubuli possono presentare un doppio contorno ed un centro chiaro.

Attualmente è molto dibattuto se esista una sola forma di glomerulonefrite fibrillare o più di una. In particolare non è ancora chiaro se la forma con fibrille debba essere separata dalla forma con microtubuli, che è nota anche con il nome di *glomerulopatia immunotattoide*. In un recente studio americano si sostiene che le due forme sono da considerare separatamente sulla base di numerosi parametri clinici e morfologici (tab. I). Tuttavia, ulteriori studi comprendenti un maggior numero di pazienti e adeguati periodi di osservazione sono necessari per confermare questa ipotesi.

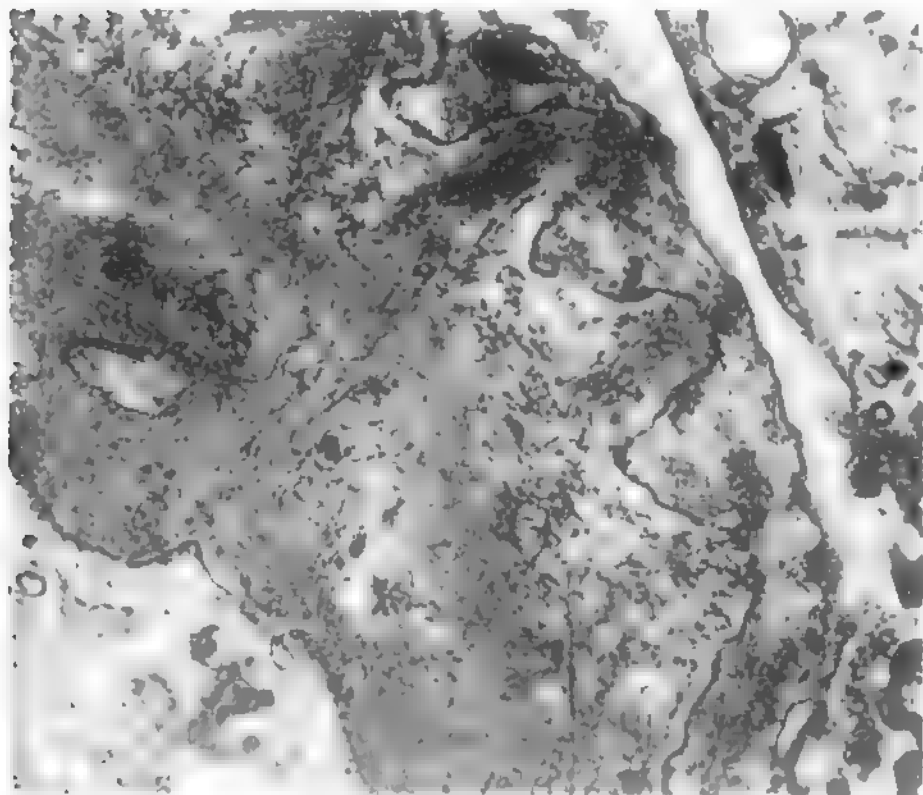


Fig. 2. Glomerulopatia da deposizione di fibrille non amiloidiche: forma fibrillare. Fibrille a disposizione irregolare (microscopia elettronica, 22.000 $\times$). (Per gentile concessione della Professoressa V. D'Aguti, New York).

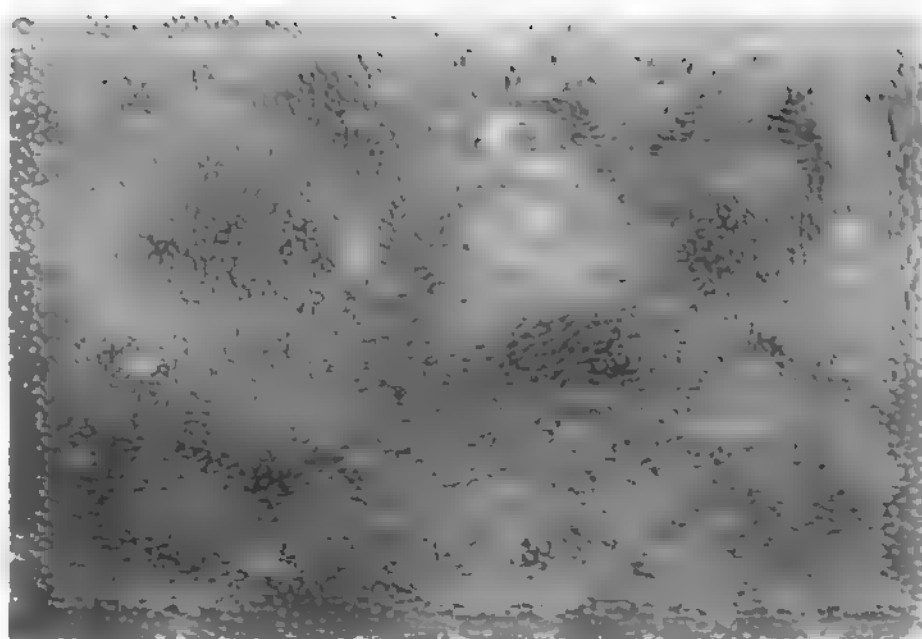


Fig. 3. Glomerulopatia da deposizione di fibrille non amiloidiche: forma microtubulare (o immunotattoide). Microtubuli, sia in sezione trasversa che longitudinale, disposti in fasci paralleli (microscopia elettronica, 22.000 $\times$). (Per gentile concessione della Professoressa V. D'Aguti, New York).

TAB. I. SINTESI DEI PRINCIPALI PARAMETRI DISTINTIVI TRA LA GLOMERULOPATIA FIBRILLARE E LA GLOMERULOPATIA IMMUNOTATTOIDE SECONDO FOGO ET AL. (1993)

Parametro	Glomerulopatia fibrillare	Glomerulopatia immunotattoide
Diametro delle fibrille	14 $\pm$ 0,5 nm (disposizione irregolare)	43,2 $\pm$ 10,3 nm (disposizione regolare)
Quadro istologico	Mesangiocapillare	Eterogeneo
Sede dei depositi	Mesangiale (prevalente)	Parietale (prevalente)
Associazione con altre malattie	Rara	Frequente (malattie linfoproliferative)
Uremia terminale	Frequente	Rara

Glomerulopatia da deposizione di fibronectina

Questa forma è stata descritta per la prima volta da Mazzucco *et al.* nel 1992. Finora sono stati descritti circa 20 casi, includendo anche alcuni pazienti segnalati in precedenza da altri autori, e riclassificati recentemente mediante l'applicazione alle loro biopsie renali di antisieri antifibronectina.

I pazienti giungono all'osservazione soprattutto per proteinuria, che sovente è di grado nefrosico, con o senza microematuria. La funzione renale è abitualmente nella norma o è solo lievemente alterata, e non vi sono anomalie sierologiche. La caratteristica clinica principale di questa forma è la familiarità, e finora tutti i casi descritti appartengono a sette diverse famiglie, di cui due sono italiane. Il decorso nel tempo è favorevole nella maggior parte dei pazienti, tuttavia alcuni hanno sviluppato uremia terminale e sono stati sottoposti a dialisi cronica. Quattro pazienti sono stati sinora sottoposti a trapianto di rene, ed in un paziente la nefropatia è recidivata nel rene trapiantato.

L'esame istologico dimostra espansione mesangiale, notevole ispessimento delle pareti dei capillari glomerulari, e proliferazione mesangiale lieve (fig. 4). L'aspetto globale

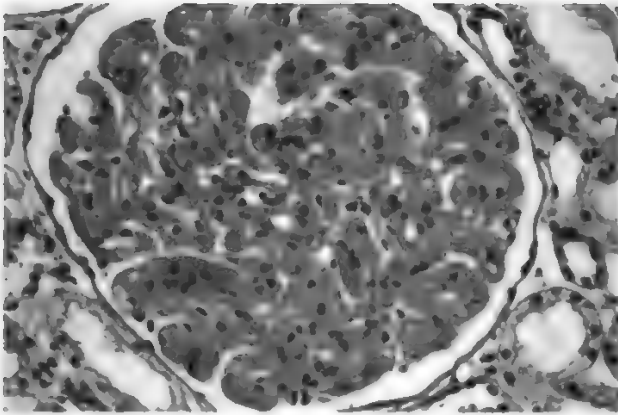


Fig. 4. Glomerulopatia da fibronectina. Espansione segmentaria del mesangio con lieve ipercellularità e severo e diffuso ispessimento delle pareti capillari (PAS, 500 $\times$). (Per gentile concessione del Professor M. J. Mihatsch, Basilea).

ricorda la glomerulonefrite membranoproliferativa, tuttavia con numerose atipie. All'esame immunoistologico, immunoglobuline e complemento sono in scarsa quantità, mentre abbondante è la deposizione di fibronectina sia mesangiale che parietale (fig. 5). Studi con diversi tipi di anticorpi monoclonali hanno dimostrato che la fibronectina depositata è di provenienza dal circolo ematico, e solo in misura minore è di produzione glomerulare. All'esame ultrastrutturale sono evidenti voluminosi depositi elettrondensi, che sono in gran parte costituiti da granuli ed in misura inferiore da fibrille con diametro medio di circa 12 nm. Si ritiene che sia i granuli che le fibrille altro non siano che fibronectina.

La patogenesi di questa nefropatia non è nota. La fibronectina (v.*), una glicoproteina di adesione ad alto peso molecolare, è normalmente presente nella matrice extracellulare e mesangiale. È coinvolta in diversi processi biologici quali la proliferazione cellulare, la fagocitosi e la aggregazione piastrinica. Per quali cause e con quali meccanismi essa si depositi nei glomeruli non è chiaro. Si ipotizza che una volta depositata essa agisca da sostanza intrappolante

in modo aspecifico altre proteine, ciò che spiegherebbe la presenza all'esame immunoistologico di (scarse quantità) di immunoglobuline e complemento.

Glomerulopatia da deposizione di collagene di tipo III

È una forma descritta finora in circa 30 pazienti, la maggior parte dei quali in Giappone. Alcuni casi, tuttavia, sono stati segnalati anche in altre aree geografiche quali l'Italia (un paziente adulto), in Francia (dieci pazienti in età pediatrica) e negli Stati Uniti (un paziente adulto ed uno pediatrico). Negli adulti la malattia si presenta in forma sporadica, mentre nella casistica pediatrica francese era presente familiarità con ereditarietà di tipo autosomico recessivo.

La presentazione clinica più frequente è la proteinuria con o senza sindrome nefrosica, associata a funzione renale nella norma o solo lievemente alterata. Ipertensione e microematuria sono osservati in circa 1/3 dei casi. Nella maggior parte dei pazienti la nefropatia non è progressiva, tuttavia alcuni hanno avuto un peggioramento della proteinuria, ed altri hanno sviluppato insufficienza renale cronica, talvolta di grado anche uremico. Abitualmente non vi sono anomalie sierologiche, tuttavia in due pazienti è stato osservato un aumento dei livelli sierici dei peptidi del procollagene III, ed in un altro paziente abbassamento del C3 e del fattore H, una glicoproteina che controlla la via alternativa della attivazione del complemento. In tre pazienti pediatrici inoltre è stata osservata lieve anemia emolitica. Nessuno dei pazienti descritti finora è stato sottoposto a terapia immunosoppressiva.

Il quadro istologico è caratterizzato da aumento delle dimensioni del flocculo glomerulare, espansione della matrice mesangiale, e notevole ispessimento delle pareti capillari per presenza di doppi contorni dovuti ad allargamento dello spazio sottoendoteliale ed interposizione mesangiale (fig. 6). La cellularità mesangiale, normale nella maggior parte dei casi, può anche essere aumentata. All'esame immunoistologico immunoglobuline e complemento sono o assenti o in scarsa quantità, mentre collagene di tipo III è presente in tutti i glomeruli con distribuzione talora globale talora segmentaria, sia in sede mesangiale che sottoendoteliale. La microscopia elettronica dimostra fibre di collagene in sede mesangiale, sovente a stretto contatto con le cellule mesangiali, e nel contesto della lamina rara interna (fig. 7), ma non nella lamina densa. Le fibre descritte hanno perio-

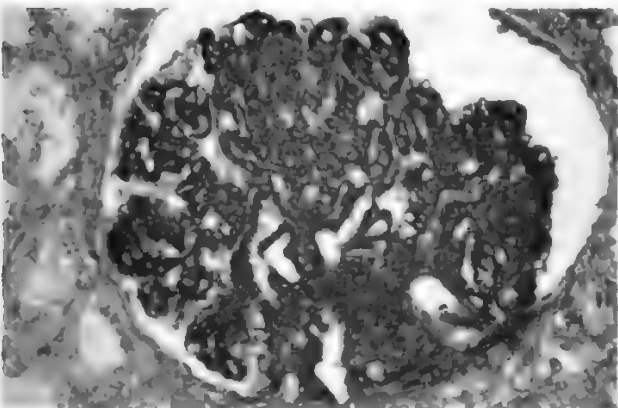


Fig. 5. Glomerulopatia da fibronectina. La colorazione con antisiero specifico dimostra che la fibronectina è diffusamente presente sia nel mesangio che lungo le pareti capillari (500 $\times$). (Per gentile concessione del Professor M. J. Mihatsch, Basilea).

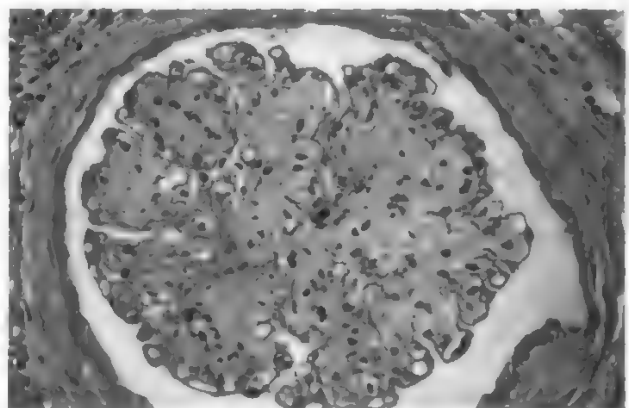


Fig. 6. Glomerulopatia da collagene III. Diffusa espansione del mesangio, per presenza di materiale debolmente PAS positivo, e numerosi doppi contorni (PAS, 500 $\times$). (Per gentile concessione del Professor M. J. Mihatsch, Basilea).

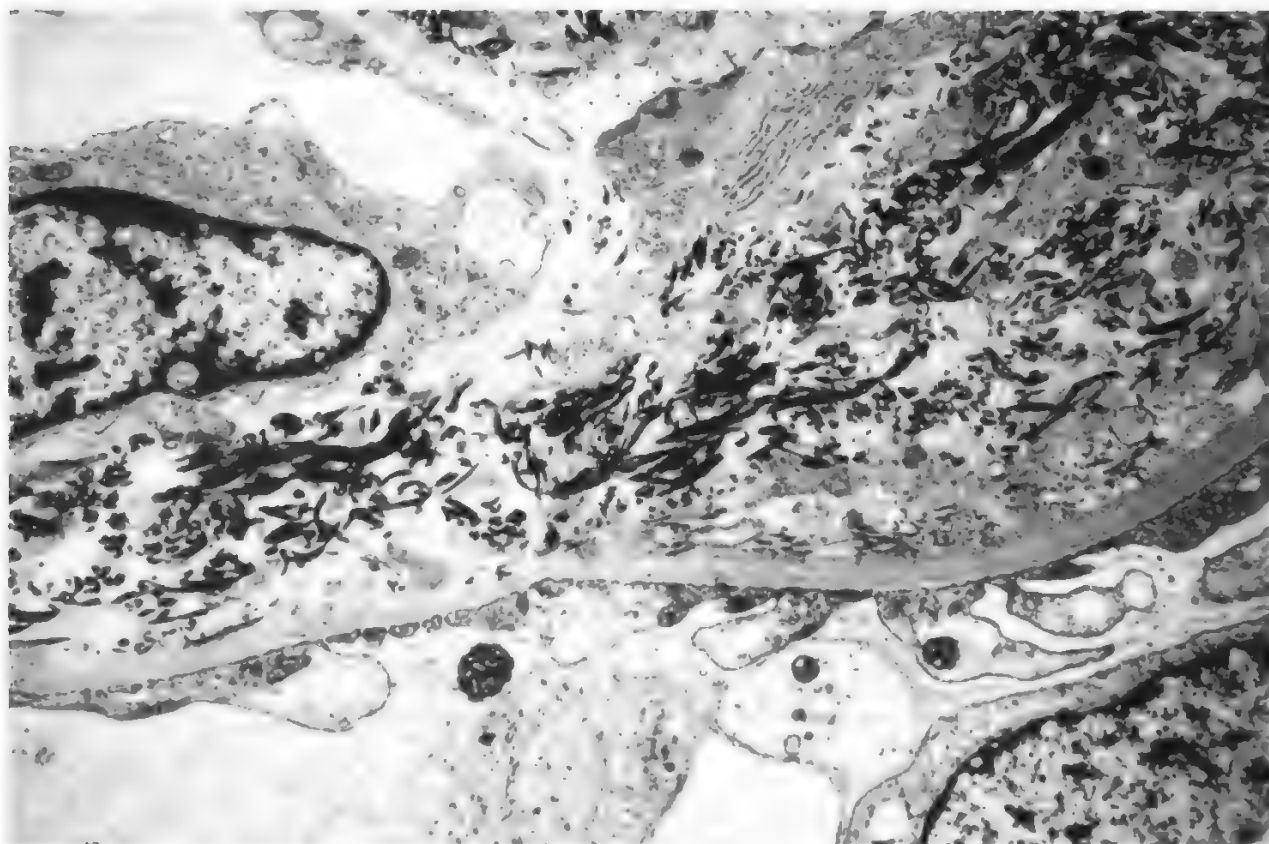


Fig. 7. Glomerulopatia da collagene III. Abbondante deposizione di collagene nello spazio sottoendoteliale della parete capillare glomerulare (microscopia elettronica, 12.000 $\times$). (Per gentile concessione del Professor M. J. Mihatsch, Basilea).

dicità variabile da 430 a 640 nm. La deposizione di collagene è limitata al rene, tuttavia in un paziente giapponese collagene di tipo III è stato riscontrato anche attorno ai capillari sinusoidali epatici.

Collagene in sede mesangiale o parietale può essere osservato in numerose glomerulonefriti a patogenesi immunitaria, ma sempre in quantità modesta e con distribuzione focale e segmentaria. Al contrario, esso è presente in elevata quantità nella *nail-patella syndrome*, una rara malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata da glomerulopatia associata ad alterazioni ungueali e scheletriche (v. XIII, 2014). In questa malattia, tuttavia, il collagene è presente nella lamina densa della membrana basale glomerulare, nel contesto di aree elettronicamente lucenti, e non in sede sottoendoteliale come nella glomerulopatia da collagene di tipo III.

In condizioni normali nel glomerulo il collagene di tipo III è assente, mentre si trova collagene di tipo IV, ed in misura minore anche collagene di tipo VI. Si ritiene che la deposizione di collagene di tipo III sia dovuta ad una aumentata sintesi da parte delle cellule mesangiali. La causa della aumentata sintesi, tuttavia, non è nota.

Glomerulopatia da ipoproteine

Questa nefropatia è stata descritta per la prima volta su tre casi internazionali nel 1950, in due diversi gruppi giapponesi e da allora 23 pazienti sono stati riportati. Tutti, con le sole eccezioni di un paziente cinese descritto da Zhang *et al.* (1994) e di un paziente francese (ma di origine italiana)

descritto da Meyrier *et al.* (1995), sono di origine giapponese. In diverse famiglie giapponesi più di un membro è risultato affetto dalla malattia.

Al momento della biopsia renale la manifestazione clinica più frequente è la proteinuria isolata, che è di natura

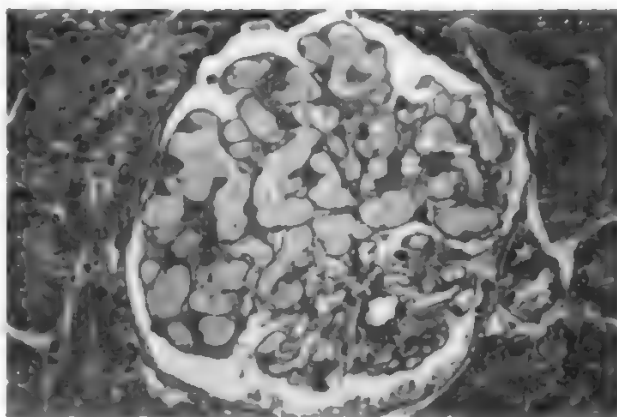


Fig. 8. Glomerulopatia da ipoproteine. Dilatazione aneurismatica della maggior parte delle anse capillari, il cui lume è occupato da casti ialini (colorazione tricromica di Masson, 560 $\times$). (Per gentile concessione del Professor A. Meyrier, Bobigny).

Fig. 9. Glomerulopatia da lipoproteine. La colorazione specifica all'olio rosso O dimostra che il materiale amorfo all'interno dei lumi capillari è costituito da lipidi (560 $\times$). (Riprodotta con permesso da: A. Meyrier et al., *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1993, 10, 546-549).



nefrosica in poco meno della metà dei pazienti. Anomalie del sedimento urinario, insufficienza renale, ed ipertensione arteriosa sono rare. Non vi sono alterazioni sierologiche di tipo immunologico, mentre ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, o iperlipoproteinemia sono frequenti. I livelli di apolipoproteinemia E sono costantemente elevati, con fenotipo variabile, ma di tipo E 2/3 nella maggior parte dei casi. Il decorso clinico della nefropatia non è influenzato dalla terapia immunosoppressiva. La somministrazione di ipolipemizzanti è efficace nel correggere le anomalie lipidiche, ma in un solo caso vi è stata anche una regressione della proteinuria. In alcuni pazienti la nefropatia non ha carattere progressivo, in altri vi è un peggioramento della proteinuria, in alcuni infine si sviluppa insufficienza renale cronica. Ambedue i pazienti non giapponesi hanno sviluppato uremia terminale, rispettivamente 8 e 25 anni dopo la biopsia renale. Due pazienti giapponesi sono stati sottoposti a trapianto di rene ed in ambedue la nefropatia è recidivata.

La lesione tipica all'esame istologico è la presenza di dilatazione aneurismatica delle anse capillari, il cui lume è

occupato da materiale debolmente eosinofilo (fig. 8), che si colora di rosso con colorazioni specifiche per i lipidi, quali il Sudan III (cosiddetti «trombi lipidici») (fig. 9). Mesangiolisi è abitualmente associata, ma talvolta vi sono espansione della matrice mesangiale ed ipercellularità, o doppi contorni. Cellule schiumose, tipiche di alcune nefropatie da deposizioni di lipidi, sono molto rare. Nei pazienti con nefropatia progressiva le dilatazioni aneurismatiche possono aumentare, mentre la parte di glomerulo senza dilatazioni va incontro a sclerosi focale. Nel paziente in cui la proteinuria è regredita in seguito a trattamento ipolipemizzante con probucolo la ripetizione della biopsia ha dimostrato regressione pressoché completa degli aneurismi. All'esame immunoistologico i lipidi intracapillari sono positivi per gli antisieri diretti contro le β -lipoproteine e le apolipoproteine B ed E. Immunoglobuline, complemento e fibrina sono o scarse o assenti.

La microscopia elettronica dimostra la natura lipidica dei depositi intracapillari, che sono costituiti da vescicole di vario diametro a disposizione concentrica. Esse occupano gran parte del lume capillare e sia gli eritrociti che le cellule

TAB. II. SINTESI DELLE PRINCIPALI CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE, IMMUNOISTOLOGICHE ED ULTRAISTRUTURALI DELLE GLOMERULOPATIE DA FIBRONECTINA, COLLAGENE III, E LIPOPROTEINE (Ig = IMMUNOGLOBULINE; C = COMPLEMENTO)

Glomerulopatia	Microscopia ottica	Immuno-fluorescenza	Microscopia elettronica
Da fibronectina	Quadro mesangio-capillare con atipie	Fibronectina +++ Ig e C $\pm$	Depositi granulari e fibrillari (diametro 12 nm)
Da collagene III	Allargamento del mesangio Ispessimento capillare Doppi contorni	Collagene III +++ Ig e C 0/±	Fibre di collagene mesangiali e sottoendoteliali
Da lipoproteine	Aneurismi dei capillari Mesangiolisi Trombi lipidici	Lipoproteine β +++ Apo E +++ Ig e C 0/±	Vescicole lipidiche intracapillari

endoteliali vengono compresse contro la parete. In nessun paziente sono stati osservati depositi di lipoproteine in sede extrarenale.

Il costante aumento dei livelli ematici di apolipoproteina E e la sua particolare espressione fenotipica inducono a ipotizzare che in essa si trovi una chiave per la spiegazione della patogenesi di questa nefropatia. Essa provocherebbe la formazione di lipoproteine patologiche, che a loro volta faciliterebbero la formazione dei trombi intracapillari. Tuttavia, recentemente è stato suggerito che anche fattori intrarenali, indipendenti dalla apolipoproteina E, possano favorire la deposizione lipidica.

Le principali caratteristiche istologiche, immunoistologiche ed ultrastrutturali di queste nuove glomerulopatie sono riportate nella tab. II.

Trattamento delle glomerulopatie con ciclosporina

Introduzione

La ciclosporina (v.*; v.***) è stata introdotta come agente immunosoppressore per i pazienti trapiantati attorno al 1980, e negli anni successivi è stata impiegata anche per trattare le glomerulonefriti. Attualmente essa viene impiegata correntemente nel trattamento di alcune forme di glomerulopatia.

La ciclosporina inibisce l'espansione clonale di linfociti CD4+, attraverso la inibizione della defosforilazione di un fattore essenziale per la trascrizione del gene che codifica l'interleuchina 2 (IL-2), la quale è la citochina essenziale per la maturazione e differenziazione delle cellule T. Il fattore, noto come NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T lymphocytes*) esiste in una forma nucleare (NF-ATn), già presente nel nucleo, ed in una forma citoplasmatica (NF-ATc). Per legarsi alla regione del gene promotore, questi devono dimerizzarsi all'interno del nucleo, e per entrare nel nucleo il NF-ATc deve essere defosforilato. La ciclosporina, come parte di un complesso trimero con la ciclofillina e la calcineurina, blocca questa defosforilazione.

Inoltre, la ciclosporina ha potenti e reversibili effetti sulla emodinamica intrarenale. Infatti, essa induce vasocostrizione della arteriola afferente, ciò che provoca un abbassamento della pressione intraglomerulare, una riduzione del filtrato glomerulare ed una riduzione della permeabilità del glomerulo alle proteine. Pertanto, la ciclosporina può ridurre la proteinuria indipendentemente dalla sua azione immunosoppressiva. Entrambe queste proprietà vengono sfruttate nel trattamento dei pazienti con glomerulopatia e proteinuria.

Nefropatia a lesioni minime (NLM)

Benché la patogenesi di questa nefropatia rimanga oscura, il fatto che una remissione della proteinuria possa essere ottenuta con i corticosteroidi, gli antagonisti purinici o le mostarde azotate indica un coinvolgimento dei linfociti (T con tutta probabilità). Pertanto, è logico aspettarsi che la ciclosporina sia efficace in questa forma.

I corticosteroidi rimangono il trattamento di prima scelta della NLM; tuttavia la ciclosporina può essere impiegata nel trattamento dei pazienti con recidive. Infatti è attualmente noto che sia nei bambini che negli adulti il numero e la frequenza delle recidive possono essere ridotti prolungando la durata del trattamento iniziale con i corticosteroidi. Ma ciò espone i pazienti a maggiore tossicità da corticosteroidi. Attualmente, per gli adulti si riconosce che un trattamento pieno per sei mesi consecutivi possa offrire dei vantaggi, la somministrazione di prednisone non viene prolungata per più di 8-12 settimane nei bambini o per più di 12-24 settimane nell'adulto.

In circa il 5% dei pazienti il trattamento con corticosteroidi è inefficace nel ridurre la proteinuria. Questi pazienti vengono definiti come «cortico-resistenti», anche se attualmente si sa che questa definizione è molto variabile, dato che la cosiddetta cortico-resistenza dipende dalla durata ed intensità del trattamento corticosteroideo. Un ulteriore 30-40% dei pazienti recidiva frequentemente, sia immediatamente o durante la riduzione dei corticosteroidi (pazienti cosiddetti «steroido-dipendenti») o dopo un breve periodo di remissione dopo la fine del trattamento (pazienti cosiddetti «frequentemente recidivanti»). È in questi tre gruppi di pazienti che trova spazio l'impiego della ciclosporina.

Come primo approccio, deve essere adottato un trattamento a lungo termine con prednisolone che sia il meno possibile tossico e individualizzato per ogni paziente. Alcuni pazienti possono rimanere in remissione, crescendo e frequentando la scuola normalmente se si tratta di bambini, con un trattamento a giorni alterni che non provoca effetti collaterali; altri pazienti vanno meglio quando trattati ad ogni singola recidiva, benché questo approccio possa essere difficile da sostenere quando le recidive sono numerose.

Se il trattamento con corticosteroidi provoca effetti collaterali inaccettabili, possono essere impiegati altri agenti. Finora la ciclofosfamide, somministrata per 8-12 settimane alla dose di 3 mg/kg di peso ideale per l'altezza/die è stato il farmaco più utilizzato. Questo approccio offre il vantaggio di indurre una remissione permanente in circa un terzo dei bambini e due terzi degli adulti, e rimane il trattamento di seconda scelta. I pazienti con frequenti recidive vanno incontro ad una remissione prolungata più dei pazienti steroido-dipendenti. Il clorambucil non offre alcun vantaggio rispetto alla ciclofosfamide, e probabilmente è più gonadotossico ed oncogenico.

Data la sua tossicità, la ciclofosfamide dovrebbe essere somministrata solo per un ciclo. Pertanto, esiste il problema di come trattare quei pazienti che hanno una ulteriore recidiva dopo essere stati trattati con ciclofosfamide. Attualmente questi pazienti sono spesso trattati con ciclosporina alla dose di circa 5 mg/kg di peso ideale per l'altezza/die così da raggiungere livelli ematici di ciclosporina di circa 80-100 ng/ml. La ciclosporina similmente al prednisolone (e diversamente dalle mostarde azotate) induce remissione, ma quando il farmaco è sospeso dopo un trattamento di poche settimane la proteinuria recidiva. Pertanto il trattamento deve essere proseguito per 1 o 2 anni, o fino a che è necessario per permettere l'accrescimento staturale o il passaggio attraverso la pubertà nel caso di pazienti pediatrici. Durante il periodo di trattamento i livelli ematici della ciclosporina devono essere controllati una volta ogni uno o due mesi, e devono essere ricordate le numerose interazioni della ciclosporina con altri farmaci. Una risposta alla ciclosporina può essere prevista in modo attendibile in pazienti che in precedenza hanno risposto al prednisolone o alla ciclofosfamide o ad entrambi. Alcuni AA. raccomandano l'associazione con basse dosi di corticosteroidi al fine di ottenere una riduzione del dosaggio della ciclosporina, tuttavia quanto questo approccio sia realmente superiore alla ciclosporina da sola non è mai stato valutato in modo controllato.

Quando si prevede di sospendere la ciclosporina, è bene procedere gradualmente, riducendo la dose di 1 mg/kg/die a distanza di diversi mesi, allo scopo di prevenire recidive improvvise. In alcuni pazienti la sospensione può essere effettuata dopo due anni senza recidive; in altri pazienti invece il trattamento deve essere proseguito. Alcuni pazienti sono stati trattati per 5 o 6 anni continuativamente, e

biopsie renali seriate non hanno dimostrato fibrosi interstiziale, benché questa sia sempre teoricamente possibile. Quando si inizia un trattamento con ciclosporina in tutti i pazienti si osserva una riduzione della filtrato glomerulare, che tuttavia, per almeno uno o due anni, è reversibile. Alcuni sfortunati pazienti recidivano di nuovo, ed in questi casi è preferibile ritornare al trattamento corticosteroidico, per riprendere, magari, la ciclosporina dopo uno o due anni. Di notevole importanza è il fatto che in molti di questi casi la remissione della proteinuria può essere mantenuta con dosi di corticosteroidi inferiori a quelle utilizzate prima del trattamento con ciclosporina. Anche quando la malattia persiste per diversi decenni non si sviluppa insufficienza renale.

Tuttavia, per i pazienti *steroido-resistenti* che non rispondono al prednisolone o alla ciclofosfamide o ad entrambi la prognosi è molto meno favorevole. Alcuni presenteranno glomerulosclerosi focale e segmentaria in biopsie renali successive, e meno della metà risponderanno alla ciclosporina, con successiva evolutività verso l'insufficienza renale cronica. Deve essere ancora sottolineato che la cosiddetta «corticoresistenza» dipende da intensità e durata del trattamento con prednisolone, e che alcuni pazienti definiti come «resistenti» potrebbero invece rispondere a trattamenti più intensi (ma più tossici).

Glomerulosclerosi focale e segmentaria (GSFS)

È opinione comune che questo quadro istologico rappresenti una forma più severa della stessa condizione che causa anche la nefropatia a lesioni minime. In questo paragrafo ci occuperemo della GSFS associata a sindrome nefrosica e non parleremo della forma che si accompagna a proteinuria non nefrosica, che generalmente ha una prognosi favorevole e non richiede alcun trattamento (per la GSFS da abuso di eroina e da infezione da HIV si rimanda all'apposito capitolo; v. sopra coll. **3890-3891).

Le principali differenze cliniche tra la NLM e la GSFS sono che la microematuria persistente è abituale nella GSFS mentre è rara nella NLM, e che nella GSFS una remissione completa della proteinuria dopo trattamento con corticosteroidi si verifica solo in circa un terzo dei casi pediatrici e circa un quinto negli adulti. Tuttavia, parallelamente a quanto osservato per la NLM, percentuali più alte di risposta, fino al 40-50% dei casi, si possono ottenere prolungando (ad es. per 6 mesi) il trattamento con prednisolone.

L'approccio terapeutico per i pazienti con GSFS che rispondono ai corticosteroidi non è diverso da quello descritto per i pazienti con NLM. L'unica differenza è che un ciclo più prolungato, ad es. per 6 mesi, di prednisolone dovrebbe essere impiegato nel caso non vi sia una risposta precoce. Va inoltre ricordato che molti pazienti con GSFS che rispondono ad un primo trattamento possono presentare, parallelamente a quanto avviene nella NLM, recidive, anche se essi presentano una maggior tendenza a sviluppare cortico-resistenza.

Tuttavia, la maggior parte dei pazienti con GSFS, in tutte le fasce di età, non dimostra alcuna risposta al prednisolone, in ciò assomigliando a quella minoranza di pazienti con NLM che sono corticoresistenti. Due terzi dei pazienti corticoresistenti, indipendentemente dal quadro istologico, sviluppano insufficienza renale, generalmente entro 5-15 anni dall'esordio, anche se non va dimenticato che circa un quarto di essi sviluppa una lenta remissione spontanea.

Non è ancora chiaro se la *ciclofosfamide* migliora la prognosi dei pazienti con GSFS corticoresistenti; se vi è un effetto, esso è tale per cui non più di un ulteriore 25% di pazienti ottiene la remissione. Ma di nuovo, differenze e

difficoltà nella definizione di «resistenza» ai corticosteroidi rendono il confronto e la valutazione impossibili.

Questi problemi sono presenti anche nella valutazione dei risultati con *ciclosporina* nei pazienti con GSFS corticoresistenti. Sembra infatti esserci un significativo miglioramento in un gruppo di pazienti la cui prognosi è sfavorevole, ma di quanto l'incidenza di insufficienza renale sia realmente ridotta non è ancora noto. In diverse casistiche, infatti, i pazienti corticoresistenti con ridotta funzione renale sono stati esclusi, ciò che altera i risultati. In questi studi sono stati impiegati trattamenti simili a quelli usati per i pazienti con NLM, e che abbiamo descritto nell'apposito capitolo.

Globalmente circa un quarto dei pazienti corticoresistenti ha una remissione completa quando la ciclosporina è somministrata insieme al prednisolone, mentre i risultati possono essere meno favorevoli quando la ciclosporina è somministrata da sola. Anche questo, tuttavia, non è sicuro. Nei restanti casi, circa la metà hanno una riduzione della proteinuria ed una regressione della sindrome nefrosica che è clinicamente importante. Ciò naturalmente può essere dovuto agli effetti emodinamici del farmaco piuttosto che alla sua azione immunosoppressiva. Per ottenere questi risultati il trattamento deve essere continuato per 1-2 anni, ciò che però solleva il timore che la ciclosporina possa peggiorare la fibrosi interstiziale già presente nei pazienti con GSFS. A questo proposito, risultati diversi sono stati osservati in biopsie eseguite dopo 6-48 mesi di trattamento, alcuni AA. non avendo osservato fibrosi altri invece avendo notato un peggioramento. Occasionalmente, tuttavia, questa circostanza si è associata a remissione della proteinuria.

Che cosa si può fare per i pazienti che hanno GSFS con sindrome nefrosica associata ad ipertensione arteriosa ed insufficienza renale? Può valere la pena di fare un tentativo con il prednisolone, mentre per la ciclosporina bisogna ricordare che essa può causare ulteriori danni attraverso i suoi effetti emodinamici e la fibrosi interstiziale e che le probabilità di un effetto terapeutico sono inferiori. Pertanto, noi non utilizziamo la ciclosporina in queste circostanze, e anche questo deve essere tenuto in considerazione quando si valutano i risultati del trattamento della GSFS con questo farmaco.

Nefropatia membranosa (NM)

Nell'adulto la NM ha una evoluzione variabile, dato che circa un quarto o un terzo dei pazienti va incontro a remissione completa spontaneamente, mentre almeno la metà sviluppa insufficienza renale 5-20 anni dopo l'esordio. I fattori prognosticamente sfavorevoli sono ben noti e sono: proteinuria di entità nefrosica (soprattutto quando è superiore ai 10 g/24 ore), l'età avanzata, il sesso maschile, l'ipertensione arteriosa, e la presenza di fibrosi interstiziale alla biopsia renale.

La ciclosporina è stata recentemente proposta per i pazienti che sono resistenti ai trattamenti immunosoppressivi convenzionali, quale quello descritto da Ponticelli *et al.* (1993) (e riportato nel precedente aggiornamento dell'Enciclopedia; v. NEFROPATIE MEDICHE*, coll. *5314-5315). Ricordando che i pazienti trattati con ciclosporina erano generalmente resistenti alla terapia convenzionale, i risultati sono notevoli, per quanto sovente aneddotici. Similmente a quanto avviene per la NLM e la GSFS è stato somministrato un dosaggio di 4-5 mg/kg/die per periodi anche di diversi anni. L'effetto più rilevante è stata la marcata riduzione della proteinuria, talvolta fino a scomparsa completa, ciò che, almeno in parte, può essere dovuto ad effetti emodinamici. Gli effetti sulla funzione renale per ora sono difficili da dimostrare, anche perché i periodi di osservazione

NEFROPATIE MEDICHE

non sono sufficientemente lunghi. Tuttavia, uno studio controllato canadese ha dimostrato un benefico effetto a breve termine sulla funzione renale valutata mediante il reciproco della creatinina plasmatica.

Per ora sembra utile impiegare la ciclosporina come trattamento nel lungo termine per i pazienti resistenti al prednisolone e/o ai citotossici.

Bibliografia

Davison A. M., Cameron J. S., Grünfeld J. P., Kerr D. N. S. et al., *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 2 ed., 1998, Oxford Univ. Press, New York.

Hricik D. E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339** (13), 888-899.

GLOMERULOPATIE DA HIV

Bourgognie J., *Kidney Int.*, 1990, **37**, 1571.

Bourgognie J., Pardo V., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 729.

D'Agati V. et al., *Kidney Int.*, 1989, **35**, 1358.

Feduska N. J., *Transplantation*, 1993, **4**, 93.

Humphreys M. H., *Kidney Int.*, 1995, **48**, 311.

Kopp J. B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 1577.

Nochy D. et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1993, **8**, 1.

Smith M. C. et al., *Am. J. Med.*, 1994, **97**, 145.

GLOMERULOPATIE ASSOCIATE A VIRUS DELL'EPATITE C

Agnello V., Chung R. T., Kaplan L. M., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **327**, 1490.

D'Amico G., Fornasieri A., *Am. J. Kidney Dis.*, 1995, **25**, 361.

Davda R. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1993, **22**, 452.

Horikoshi S. et al., *Nephron*, 1993, **64**, 462.

Johnson R. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 465.

Johnson R. J. et al., *Kidney Int.*, 1994, **46**, 1700.

Misiani R. et al., *Ann. Intern. Med.*, 1992, **117**, 573.

Misiani R. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330**, 751.

Rollino C. et al., *Nephron*, 1991, **59**, 319.

Romas F. et al., *Pathology*, 1994, **26**, 399.

Roth D., *Am. J. Kidney Dis.*, 1995, **25**, 3.

Takishita Y., Ishikawa S., Okada K., *Nippon Jinzo Gakkai Shi.*, 1994, **36**, 1203.

Yamabe H. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1995, **25**, 67.

SINDROME DI ALPORT

Barker F. D. et al., *Science*, 1990, **248**, 1224.

Ding J. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1995, **5**, 1714.

Flinter F., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1994, **8**, 780.

Kashtan C., *J. Lab. Clin. Med.*, 1990, **116**, 508.

Renieri A. et al., *Nephron*, 1994, **67**, 444.

Sessa A., Renieri A., Battaglia C., *J. Nephrol.*, 1994, **7**, 102.

GLOMERULOPATIA DA DEPOSIZIONE DI FIBRILLE NON AMILOIDEE

Alpers C. E. et al., *Kidney Int.*, 1987, **31**, 781.

Churg J., Venkatesh V. S., *Kidney Int.*, 1993, **44**, 837.

Duffy J. L. et al., *Am. J. Pathol.*, 1983, **113**, 279.

Fogo A. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1993, **22**, 367.

Iskandar S. S. et al., *Kidney Int.*, 1992, **42**, 1401.

Korbet S. M. et al., *Medicine*, 1985, **64**, 228.

Masson R. G. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 36.

Mazzucco G. et al., *Am. J. Nephrol.*, 1990, **10**, 21.

Rosenmann E., Eliakim M., *Nephron*, 1977, **18**, 301.

GLOMERULOPATIA DA DEPOSIZIONE DI FIBRONECTINA

Assman K. J. M. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1995, **25**, 781.

Mazzucco G. et al., *Hum. Pathol.*, 1992, **23**, 63.

Ström E. H. et al., *Kidney Int.*, 1995, **48**, 163.

GLOMERULOPATIA DA DEPOSIZIONE DI COLLAGENE DI TIPO III

Beth A. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1995, **9**, 11.

Dombros N., Katz A., *Am. J. Kidney Dis.*, 1982, **1**, 237.

Gubler M. C. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1993, **7**, 354.

Ikeda K. et al., *Clin. Nephrol.*, 1990, **33**, 163.

Imbasciati E. et al., *Am. J. Nephrol.*, 1991, **11**, 422.

Mizuri S. et al., *Nephron*, 1993, **63**, 183.

GLOMERULOPATIA DA LIPOPROTEINE

Amenomori M. et al., *Nephron*, 1994, **67**, 109.

Koizumi Y. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1990, **4**, 122.

Meyrier A. et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1995, **10**, 546.

Saito T. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1989, **13**, 148.

Saito T. et al., *Nephrology*, 1995, **1**, 17.

Watanabe Y. et al., *Nephron*, 1989, **51**, 265.

Yamamoto T. et al., *J. Nephrol. Med.*, 1994, **24**, 942.

TRATTAMENTO DELLE NEFROPATIE MEDICHE CON CICLOSPORINA

Nefropatia a lesioni minime (NL.M)

Corbelli J., *Clin. Nephrol.*, 1991, **35**, 155.

Imamoto S. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 1991, **17**, 687.

Meyrier A. et al., *Kidney Int.*, 1994, **45**, 1446.

Niaudet P. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1992, **6**, 3.

Ponticelli C. et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1993, **8**, 1326.

Simon P., Meyrier A., *Kidney Int.*, 1989, **35**, 201 (abstract).

Tanaka R. et al., *Pediatr. Nephrol.*, 1993, **7**, 249.

Glomerulosclerosi focale e segmentaria (GSFS)

Banfi G. et al., *Clin. Nephrol.*, 1991, **36**, 53.

D'Agati V., *Kidney Int.*, 1994, **46**, 1223.

Glasscock R. J., *Am. J. Nephrol.*, 1993, **13**, 422.

Habib R., Niaudet P., *Clin. Nephrol.*, 1994, **42**, 141.

Ingulli E. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1995, **5**, 1820.

Korbet S. M., Schwartz M. M., Lewis E. J., *Am. J. Kidney Dis.*, 1994, **23**, 773.

Meyrier A. et al., *Clin. Nephrol.*, 1991, **35** (Suppl.), 37.

Ponticelli C. et al., *Kidney Int.*, 1993, **43**, 1377.

Nefropatia membranosa (NM)

Cattran D. C. et al., *Kidney Int.*, 1995, **47**, 1130.

Pei Y., Cattran D. C., Greenwood C., *Kidney Int.*, 1992, **42**, 1960.

Rostocker G. et al., *Nephron*, 1993, **63**, 335.

J. STEWART CAMERON E GIOVANNI B. FOGAZZI

NEFROPATIE CISTICHE

[v. vol. X, coll. 264-282]

SOMMARIO

MALATTIE CISTICHE EREDITARIE DEL RENE col. 3908

Inquadramento (col. 3908). - Rene policistico autosomico dominante (col. 3909). - Rene policistico autosomico recessivo (col. 3411). - Malattia cistica midollare recessiva o nefromotisi giovanile familiare (col. 3411). - Malattia cistica midollare dominante (col. 3912). - Rene spongioso midollare (col. 3912). - Diaplasia renale multicistica (col. 3912).

MALATTIE CISTICHE EREDITARIE DEL RENE

Inquadramento

Le malattie cistiche ereditarie del rene costituiscono un complesso eterogeneo di quadri clinici e anatomopatologici che riconoscono in un difetto genetico il loro momento determinante.

Queste patologie ereditarie quindi sono causate da alterazioni a carico del genoma che possono verificarsi con diversi meccanismi e a vario livello (cromosomico e genico) e vengono pertanto distinte in: cromosomiche, geniche e multifattoriali. Sono state comunque individuate fino ad ora solo forme geniche e multifattoriali.

Le *patologie geniche* rappresentano quelle forme nelle quali il difetto primario consiste in una mutazione a carico di geni localizzati o sugli autosomi (forme autosomiche) o sui cromosomi sessuali (forme gonosomiche, in genere X-linked).

Ricordiamo a tale proposito che il messaggio informativo contenuto in uno specifico gene viene tradotto nella proteina corrispondente (decodificazione) mediante la lettura secondo triplette delle basi azotate (codone) che costituiscono le unità elementari del filamento di DNA ed a ciascuna delle quali corrisponde uno specifico aminoacido. Tuttavia, la diversa combinazione in triplette delle quattro basi azotate (adenina, timina, citosina, guanina) dà luogo a sessantaquattro codoni, cui corrispondono solo venti aminoacidi; per tale motivo uno stesso aminoacido può essere riconosciuto da più triplette (codice degenerato). Inoltre, tre dei sessantaquattro possibili codoni non codificano per alcun aminoacido, rappresentando bensì un segnale di arresto della traduzione (codone stop).

L'espressione fenotipica di una mutazione genica si verifica allorché in conseguenza della sostituzione, della inserzione, della delezione di una o più basi si modifica l'effetto informativo, che può consistere o in un effetto missenso, con la produzione di un codone codificante per un aminoacido diverso oppure in un effetto non senso, con la produzione di un codone di stop.

La delezione o l'inserzione in particolari condizioni possono determinare un più marcato effetto fenotipico perché possono comportare uno scivolamento della cornice di lettura del DNA (frameshift: spostamento della sequenza di triplette) e di conseguenza la modificazione della struttura aminoacidica a valle della mutazione e la produzione di una diversa proteina.

TAB. III. MALATTIE CISTICHE EREDITARIE DEL RENE

Inquadramento genetico

Rene policistico autosomico dominante

(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD):

— tipo PKD1 (16p13.3);

— tipo PKD2 (4q13-q23);

— tipo PKD3 (non mappato)

Rene policistico autosomico recessivo

(Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease: ARPK)

Malattia cistica midollare recessiva o nefronotisi giovanile familiare (NPH)

Malattia cistica midollare dominante

Rene spongioso midollare

Displasia renale multicistica

Sulla base sia dei quadri clinico-patologici che del modello di trasmissione e del corrispondente difetto genetico, vengono distinte diverse malattie cistiche del rene; nella tab. III viene proposto un loro inquadramento genetico.

Una prerogativa delle forme cliniche che sono raccolte nel quadro della malattia cistica ereditaria del rene è costituita dalla loro ampia variabilità sia sintomatologica che genetica, come si può rilevare da quanto descritto per ciascuna patologia.

Nelle forme multifattoriali tale variabilità è ancora più accentuata anche a causa dell'interazione di fattori ambientali con il condizionamento genetico, quasi sempre poligenico.

Rene policistico autosomico dominante

Il rene policistico ereditario autosomico dominante (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) è una patologia genetica abbastanza frequente nella popolazione europea con una prevalenza pari a 1:1000 (Dalgaard *et al.*, 1957).

Tale patologia è caratterizzata da eterogeneità genetica, dimostrata dalla identificazione di più loci coinvolti su differenti cromosomi; in base a tale reperto è oggi possibile distinguere tre forme clinicamente sovrapponibili (Reeders *et al.*, 1985; Kimberling *et al.*, 1993), ciascuna identificata da uno specifico locus:

a) PKD1, sul braccio corto del cromosoma 16 (16p13.3) (Somlo *et al.*, 1992);

b) PKD2, sul braccio lungo del cromosoma 4 (4q13-q23) (Sanmillan *et al.*, 1995);

c) PKD3, non ancora mappato.

Le mutazioni del gene PKD1 sono responsabili dell'85-90% dei casi del rene policistico autosomico dominante. La caratterizzazione del gene è stata resa difficoltosa dal fatto che la maggior parte di esso, ad eccezione di 3,5 kb dell'estremità 3', risiede in una regione genomica ripetuta diverse volte lungo lo stesso cromosoma. Tale regione, definita HG (Homologous Gene area), codifica tre grandi trascritti ad elevata omologia con PKD1. L'intero trascritto è formato da 46 esoni pari a circa 14,5 kb e codifica per una sequenza proteica costituita da 4304 aminoacidi, dal peso molecolare di 460 kd, denominata «policistina» (IPKD Consortium, Cell, 1995).

Nella metà aminotermine della proteina sono stati identificati cinque domini identificati in altre proteine a localizzazione extracellulare e due domini che consistono in una serie di leucine ripetute (LRRs: Leucine-Rich-Repeats) fiancheggiati, da entrambe le parti, da regioni ricche in cisteina. Questo reperto è presente nella maggior parte delle pro-

teine extracellulari coinvolte in interazioni proteina-proteina, o in interazioni con la matrice extracellulare e nelle proteine con funzione recettoriale coinvolte nella trasduzione del segnale. Una corretta interazione tra cellule e matrice extracellulare, mediata dal prodotto proteico del gene PKD1, sarebbe alla base del normale processo della morfogenesi tubulare. Mutazioni a carico del gene comporterebbero l'alterazione del processo di differenziazione cellulare, fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento dell'architettura tubulare. Il grado di tali alterazioni sembrerebbe correlare con la variabilità fenotipica dell'ADPKD.

Sino ad ora sono state descritte sette mutazioni del gene PKD1 (Harris *et al.*, 1995) interessanti l'estremità terminale 3' non duplicata del gene: tra queste ne sono state caratterizzate due consistenti in delezioni in 18 p.b. (paia di basi) e 20 p.b. a carico dello stesso introne, della lunghezza di 75 p.b., che determinano uno *splicing* aberrante del trascritto primario (HnRNA) (Peral, 1995).

Ulteriori sei mutazioni sono state individuate più recentemente all'interno dell'area duplicata e consistono in due delezioni, una inserzione puntiforme con conseguente scioglimento della cornice di lettura (mutazione *frameshift*), due mutazioni puntiformi non-senso ed una transversione G → C, probabilmente missenso (Peral *et al.*, 1996).

Tuttavia, si ritiene che la maggior parte delle mutazioni a carico del gene PKD1 non siano state ancora definite: tale difficoltà è determinata dalla dimensione e dalla complessità del gene oltre che dalla possibile eterogeneità allelica.

Poiché appare certo che nell'intero processo della morfogenesi tubulare sono coinvolti più geni, la possibilità di una diagnosi molecolare della ADPKD richiede ulteriori conoscenze.

È stato anche dimostrato che una delezione, ampia e totale, del gene PKD1 e del gene adiacente TSC2 (Tuberous Sclerosis 2) provochi una sindrome da «geni contigui» molto grave, caratterizzata dall'insorgenza in età infantile di cisti renali e di sclerosi tuberose (Brook-Carter, 1994). Il gene TSC1 è invece mappato sul cromosoma 9.

Mediante analisi di *linkage* in circa il 14% dei casi di ADPKD nella popolazione europea è stato escluso il coinvolgimento del cromosoma 16 (Kimberling *et al.*, 1988; Romeo *et al.*, 1988). Per tale motivo è stata prima ipotizzata l'esistenza di un secondo gene, denominato PKD2, che recentemente è stato mappato, sempre mediante analisi di *linkage*, sul braccio lungo del cromosoma 4 (4q13-q23) (Kimberling *et al.*, 1993).

Mutazioni a carico del gene PKD2 sembrerebbero comportare un fenotipo clinico meno grave (Ravine *et al.*, 1992); tuttavia tale correlazione non è stata ancora confermata in studi di popolazione più ampi (IPKD Consortium, Cell, 1995). Anche la frequenza della PKD2 presenta variazioni nella popolazione europea, raggiungendo il 30% in quella bulgara (Bogdanova *et al.*, 1995).

Studi più recenti hanno permesso di individuare famiglie nelle quali la ADPKD non era correlata né con il gene PKD1 né con il gene PKD2 permettendo così di ipotizzare l'esistenza di un terzo gene coinvolto nella malattia policistica.

La diagnosi di malattia policistica è legata agli esami clinici, di laboratorio e strumentali che la definiscono; la definizione del tipo di trasmissione ereditaria è invece verificata in sede di consulenza genetica, che ha permesso di stabilire la trasmissione dominante della patologia. La possibilità di effettuare analisi di *linkage* consente di discriminare le forme di ADPKD e quindi il coinvolgimento del cromosoma 16 o del cromosoma 4. L'analisi fine del gene ancora non permette di identificare in tutti i casi il difetto molecolare associato alle due forme note di ADPKD. Per

NEFROPATIE MEDICHE

tale motivo non è ancora divenuto routinario l'impiego delle analisi molecolari nella diagnosi prenatale.

Per la trattazione clinica, v. NEFROPATIE, *displasia renale multicistica* (X, 274-275).

Rene policistico autosomico recessivo

Il rene policistico autosomico recessivo (*Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease*: ARPKD) è una nefropatia ereditaria genica tra le più comuni dell'infanzia, frequentemente associato a fibrosi epatica congenita. È contraddistinto da un'ampia variabilità clinica e può evolvere in grave insufficienza renale già entro il primo anno di vita (Kaplan *et al.*, 1989). La sua incidenza nella popolazione è stimata in 1-2:10.000 nati vivi.

Il gene responsabile della ARPKD è stato localizzato, mediante analisi di *linkage*, sul braccio corto del cromosoma 6 nella regione 6p21-cen (Deget *et al.*, 1995), più recentemente ridefinita e ristretta alla posizione 6p21.1-p12 (Zerres *et al.*, 1994).

Poiché è stato dimostrato il coinvolgimento di un unico gene, si pensa che l'ampia variabilità clinica della malattia (età di esordio e decorso) sia dovuta ad allelia multipla (Guaywoodford *et al.*, 1995). Questa ipotesi giustificherebbe la maggiore concordanza dei quadri clinici nell'ambito della stessa famiglia e la grande variabilità osservata tra famiglie diverse. Per tale motivo è fondamentale, in sede di consulenza genetica, definire la variabilità del quadro clinico nell'ambito di una stessa famiglia (età d'insorgenza, gradi di ipertensione arteriosa e coinvolgimento epatico). Sulla base dell'albero genealogico elaborato e dei dati clinici raccolti è così possibile individuare i soggetti a rischio e determinarne, con analisi di genetica molecolare, la condizione genomica. Questa consente di selezionare i soggetti da sottoporre a periodici esami clinico-strumentali di controllo, che sono invece risparmiati ai componenti della famiglia negativi all'analisi molecolare.

Attualmente i *marker* specifici (D6S465, D6S427, D6S436, D6S272 e D6S466) trovano il loro impiego corrente nella diagnosi prenatale di ARPKD.

Per la trattazione clinica, v. NEFROPATIE MEDICHE, *malattia policistica dell'infanzia* (X, 272-274).

Malattia cistica midollare recessiva o nefronotisi giovanile familiare

La malattia cistica midollare recessiva del rene, nota anche come *nefronotisi giovanile familiare* (NFH: *Nephronophthisis Hepatic*; quest'ultimo simbolo viene adottato in quanto spesso la nefronotisi si associa in fibrosi epatica), è una malattia renale autosomica recessiva caratterizzata dallo sviluppo di cisti multiple a livello della giunzione cortico-midollare dei reni (Waldherr *et al.*, 1982). Tali formazioni cistiche, dopo un quadro iniziale caratterizzato da poliuria, polidipsia, anemia e ritardo dello sviluppo, determinano costantemente insufficienza renale durante la prima adolescenza, rappresentando per tale fascia di età, la più comune causa di insufficienza renale su base genetica in Europa (15%). Nel 16% dei casi è associata alla retinite pigmentosa autosomica recessiva; tale associazione viene definita come *sindrome di Senior-Loken* (SLS). Meno frequentemente può associarsi a fibrosi epatica, atassia cerebellare e alle epati, assue a forma di cono (Hildebrandt *et al.*, 1993).

Il gene per NFH è stato localizzato nell'85% dei casi sul cromosoma 2 (2q13) (Stern *et al.*, 1993; Konrad *et al.*, 1996), e la mutazione più frequentemente riscontrata consiste in un'ampia delezione di circa 70 kb.

Poiché tale evento non è costante, è stato postulato il coinvolgimento di almeno un altro gene e quindi il gene localizzato nella regione 2q13 è stato denominato *NPH1*

(Konrad *et al.*, 1996). Nei soggetti affetti da SLS sembrerebbe escluso il coinvolgimento del gene *NPH1* e ciò indicherebbe anche per questa condizione l'esistenza di una eterogeneità genetica (Antignac, 1995).

La stessa mutazione a carico della regione 2q13 è stata individuata nell'80% dei casi di NPH familiare e nel 65% dei casi sporadici; ciò suggerisce l'esistenza di un meccanismo patogenetico comune. Questo risultato ha una notevole importanza clinica, poiché nella maggior parte dei casi di nefronotisi la diagnosi può essere formulata mediante analisi molecolare senza dover ricorrere alla biopsia renale.

Malattia cistica midollare dominante

È stata descritta anche una forma autosomica dominante, caratterizzata da identico quadro istologico ma a più lenta evoluzione (Avacthi *et al.*, 1996; Gardner, 1971), e definita appunto *malattia cistica midollare di tipo autosomico dominante*. Non è ancora dimostrato se anche tale entità clinica sia conseguente ad una eterogeneità genica o ad una allelia multipla.

Per gli aspetti clinici, v. NEFROPATIE MEDICHE, *malattia cistica della midollare*, X, 277-282.

Rene spongioso midollare

Sebbene il rene spongioso midollare (detto anche *rene a spugna midollare*) sia una malattia congenita, non è stata sinora dimostrata una sicura patogenesi genetica, che possa suggerire la ereditarietà della patologia. Questa consiste in una malformazione parenchimale renale caratterizzata istologicamente da dilatazione cistica dei dotti collettori.

Nella maggior parte dei casi viene diagnosticata in età adulta ed in un 10% dei casi si manifesta in forma bilaterale che può evolvere in grave insufficienza renale.

Per gli aspetti anatomopatologici e clinici, v. NEFROPATIE MEDICHE, *rene a spugna midollare*, X, 275-277.

Displasia renale multicistica

Questa patologia viene classificata nell'ambito delle malformazioni congenite renali ed è generalmente associata ad altre anomalie ostruttive dell'apparato urinario (Devriendt *et al.*, 1995).

La displasia renale multicistica viene trasmessa, in associazione alle altre malformazioni, come un carattere autosomico dominante ad espressione variabile e penetranza incompleta (Devriendt *et al.*, 1995; Moerman *et al.*, 1994), ovvero come un difetto genetico al quale corrisponde una eterogeneità clinica e la cui presenza non determina sempre la comparsa della malattia.

In un caso di displasia renale multicistica bilaterale è stata identificata una traslocazione bilanciata che coinvolgeva il braccio corto del cromosoma 6 ed il braccio lungo del cromosoma 19 (Devriendt *et al.*, 1995; Moerman *et al.*, 1994), evento non dimostrato correlato.

Per gli aspetti clinici, v. NEFROPATIE MEDICHE, *displasia renale multicistica*, X, 274-275.

Bibliografia

- RENE POLICISTICO AUTOSOMICO DOMINANTE
Bogdanova N. *et al.*, *Hum. Genet.*, 1995, **95**, 645-650.
Brook-Carter P. T., *Nature Genetics*, 1994, **6**, 359-362.
Dalgaard O. Z. *et al.*, *Acta Med. Scand.*, 1957, **328**, 1-255.
Harris P. C. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1995, **6**, 1125-1133.
Kimberling W. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1988, **319**, 913-918.
Kimberling W. J. *et al.*, *Genomics*, 1993, **18**, 467-472.
International Polycystic Kidney Disease Consortium (IPKD Consortium), *Cell*, 1995, **81**, 289-298.
Peral B., *Hum. Mol. Genetics*, 1995, **4**, 569-574.
Peral B. *et al.*, *Am. J. Hum. Genetics*, 1996, **58**, 86-96.
Ravine D. *et al.*, *Lancet*, 1992, **340**, 1330-1333.
Rieders S. T. *et al.*, *Nature*, 1983, **317**, 542-544.

Romeo G. *et al.*, *Lancet*, 1988, 2, 8-11.
 Sanmillan J. L. *et al.*, *Am. J. Hum. Genetics*, 1995, 56(1), 248-253.
 Somlo V. *et al.*, *Genomics*, 1992, 13, 152-158.

RENE POLICISTICO AUTOSOMICO RECESSIVO

Deget F. *et al.*, *Clin. Genet.*, 1995, 47, 248-253.
 Guaywoodford L. M. *et al.*, *Am. J. Hum. Genetics*, 1995, 56, 1101-1107.

Kaplan B. S. *et al.*, *Pediatr. Nephrol.*, 1989, 3, 43-49.
 Zerres K. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, 7, 429-432.

MALATTIA CISTICA MIDOLLARE DEL RENE

Antignac C. *et al.*, *Nature Genetics*, 1993, 3, 342-345.
 Antignac C. *et al.*, *Kidney Int.*, 1995, 47, 730-731.
 Avacthi P. S. *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 1996, 84, 157-161.
 Gardner K., *Ann. Intern. Med.*, 1971, 74, 47-54.
 Hildebrandt F. *et al.*, *Am. J. Hum. Genetics*, 1993, 53, 1256-1261.
 Konrad M. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, 367-371.
 Waldherr R. *et al.*, *Virchow's Arch. Pathol. Anat. Histopathol.*, 1982, 394, 235-254.

RENE SPUNGIOSO MIDOLLARE

Pesce C. *et al.*, *Pediatr. Med. Chir.*, 1995, 17, 65-67.

DISPLASIA RENALE MULTICISTICA

Devriendt K. *et al.*, *Am. J. Med. Genet.*, 1995, 59, 396-398.
 Moerman P. *et al.*, *Pediatr. Pathol.*, 1994, 14, 405-410.

GIUSEPPE DEL PORTO

NELSON SINDROME DI: V. CUSHING, MORBO E SINDROME DI* (col. *2052).

NEONATO [v. vol. X, coll. 337-448; Agg. I, coll. *5332-5351]

QUADRO SISTEMATICO

ARGOMENTI	RIMANDI
Alimentazione e allattamento del neonato	ALLATTAMENTO (I, 1263-1290; *225-229); BAMBINO (II, 1888-1897; *998-1002)
Anatomia e fisiologia del neonato	NEONATO (X, 339-351); BAMBINO (II, 1888-1897; *982-998); LATTANTE (VIII, 1145-1155)
Anemie del neonato	NEONATO (X, 424-425; *5350-5351; **3922-3924); ANEMIE DISERITROPOIETICHE** (*272-279); ANEMIE (I, 1810); EMOLITICA MALATTIA DEL NEONATO (V, 1453-1473)
Auxologia	AUXOLOGIA (II, 1680-1701)
Bambino	BAMBINO (II, 1854-1897; *982-1002); BAMBINO** (accidenti del bambino) (*697-704)
Bronchiolite	BRONCHIOLITE** (796-813)
Cefaloematoma	CEFALOEMATOMA (III, 1300); CRANIO (IV, 1369); NEONATO (X, 436)
Convulsioni del neonato	CONVULSIONI, le convulsioni nel neonato (IV, 1036-1039; X, 1049-1050)
Diarrea	DIARREA, diarrea nel bambino (V, 46-64); DIARREA** (diarrea nel bambino) (*1565-1579); GASTROENTERITE DEL LATTANTE (VI, 2202-2204)
Disidratazione	DISIDRATAZIONE, nel lattante e nel bambino (V, 312-316)
Dolore nel bambino	DOLORE** (dolore acuto nel bambino) (*1655-1670)
Down, sindrome di	DOWN, SINDROME DI (V, 610-620; *2285-2297)
Embrioflora	EMBRIOFORIA (V, 1190-1194)
Embriopatie e fetopatie	EMBRIOPATIE E FETOPATIE (V, 1275-1284); v. anche GRAVI-

ARGOMENTI	RIMANDI
	DANZA (VII, 898-918; *3491-3497)
Emergenze cardiologiche neonatali	NEONATO** (*3935-3945)
Emoglobinopatie	EMOGLOBINOPATIE (V, 1412-1433; *2552-2568; **1839-1844)
Encefalopatie fetali e infantili	ENCEFALOPATIE FETALI E INFANTILI (V, 1774-1795; *2604-2613)
Enterocolite necrotizzante del neonato	NEONATO (X, 425-433); PREMATURITÀ (XII, 983-984)
Epilessia	EPILESSIA* (2848-2862)
Eritroblastosi fetale	EMOLITICA MALATTIA DEL NEONATO (V, 1453-1473)
Età	ETÀ (VI, 362-386)
Età gestazionale	NEONATO** (*3919-3922); PREMATURITÀ (XII, 967-973)
Feci del lattante	FECI, feci del lattante (VI, 1033-1039)
Fototerapia dell'ittero neonatale	NEONATO** (*3925-3934)
Gastroenterite del lattante	GASTROENTERITE DEL LATTANTE (VI, 2202-2204)
Gemelli	GEMELLI (VI, 2289-2312)
Idrocefalo	IDROCEFALO (VII, 1196-1213; *3590-3597)
Immaturità	PREMATURITÀ (XII, 962-996); NEONATO**, neonato di basso peso (*3916-3922)
Infezioni e sepsi del neonato	NEONATO (X, 384-399; *5336-5344)
Infezioni prenatali	GRAVIDANZA, embriofetopatie di origine infettiva (VII, 903); NEONATO (X, 396-399)
Ipervitaminosi	IPERVITAMINOSI (VIII, 287-294)
Ipoglicemia del neonato	GRAVIDANZA (VII, 821); NESIDIOLASTOSI* (*5373-5375)
Itteri neonatali	NEONATO (X, 411-425; *5347-5349; v. anche NEONATO**, fototerapia dell'ittero neonatale, **3925-3934)
Lattante	LATTANTE (VIII, 1145-1155)
Lesioni ostetriche del neonato	NEONATO (X, 433-448)
LIP	POLMONITI* (*6022); PNEUMOPATIE INTERSTIZIALI DIFFUSE* (*5926-2927)
Malattie delle membrane ialine	NEONATO (X, 367-370; *5333-5335); PREMATURITÀ (XII, 977-978); RIANIMAZIONE* (*6441-6446)
Malattia di Caroli	FEGATO E VIE BILIARI* (*3105-3108)
Malattie emorragiche del neonato	NEONATO (X, 399-410); EMOFILIA* (*2530-2546; **1829-1833)
Malattie genetiche	GENETICA UMANA (VI, 2395-2402) e relativo quadro sistematico; GENETICA MEDICA (*3338-3361); GENETICA MEDICA E UMANA** (*2433-2471) e relativo quadro sistematico

ARGOMENTI	RIMANDI
Malformazioni del neonato	CARDIOCHIRURGIA (III, 807-926; *1242-1279; **863-876); CUORE, <i>malformazioni congenite del cuore e dei grossi vasi</i> (IV, 1712-1805; *1999-2008); EMBRIOFETOPATIE (V, 1190-1194); EMBRIOFETOPATIE E FETOPATIE (V, 1275-1284); ENCEFALOPATIE FETALI E INTANTILI (V, 1774-1795); FACOMATOSI (VI, 635); FEGATO E VIE BILIARI (VI, 1202-1206; VI, 1353-1357; *3105-3108; **2205-2212); GRAVIDANZA, <i>embriofetopatie e gravidanza</i> (VII, 898-918; *3491-3497); INTESTINO TENUE E CRASSO (VII, 2259-2276); MALFORMAZIONI (IX, 189-212); MESINGOCITI (IX, 902); NERVOSO SISTEMA, <i>malformazioni</i> (X, 621-627); POLMONE (XII, 432-443; *5979-5983); TRACHEA* (7174-7193); RETTO E ANO (XIII, 1160-1164); SPINA BIFIDA (XIV, 717-721); URINARIO APPARATO (XV, 1248-1286)
Meconio	MECONIO (IX, 543-545); FETO (VI, 1528)
Megacolon	MEGACOLON, <i>megacolon congenito</i> (IX, 695-716; *4945-4950; **3611-3614)
Morte improvvisa del lattante	MORTE IMPROVVISA (IX, 1994-1998; **3817-3826)
Mucoviscidosi	MUCOVISCIDOSI (IX, 2088-2095; *5222-5237; **3840-3856)
Neonato	NEONATO (X, 337-444; *5332-5351; **3913-3945) e relativo nuovo quadro sistematico
Neonato di basso peso e ad alto rischio	NEONATO** (*3916-3922); PREMATURITÀ (XII, 962-966); PERINATALE PATOLOGIA (XI, 1640-1644)
Patologia perinatale	PERINATALE PATOLOGIA (XI, 1625-1644)
Polmoniti	POLMONITI, <i>polmoniti dell'infanzia</i> (XII, 654-677); POLMONITI*, <i>polmoniti nel bambino</i> (*6020-6023)
Postmaturità	POSTMATURITÀ (XII, 783-792)
Prematurità	PREMATURITÀ (XII, 962-966); NEONATO**, <i>neonato di basso peso</i> (*3916-3922)
Prenatale diagnosi	PRENATALE DIAGNOSI (XII, 996-1001; *6055-6062; **)
Puericoltura	PUERICOLTURA (XII, 2017-2022)
Punteggio di Agpar	NEONATO (X, 359-360)
Rianimazione del neonato	RIANIMAZIONE (XIII, 1328-1333; *6440-6454)
Sintomi e segni del neonato	SINDROME DA IMMUNODEFICIENZA* <i>infezione del neonato</i> (*6697-6702)
Sindrome da respirazione distress nel neonato e nel lattante	DRS

ARGOMENTI	RIMANDI
Sindrome di Kartagener	KARTAGENER, TRIADE DI (VIII, 889-890); BRONCHIETASMI* (*1109-1113)
Sindrome neonatale da astinenza	NEONATO* (*5344-5347)
Sindromi respiratorie del neonato	NEONATO (X, 363-384; *5332-5336); v. anche RIANIMAZIONE*, <i>malattia delle membrane ialine</i> (*6441-6446)
Spina bifida	SPINA BIFIDA (XIV, 717-721)
Stenosi ipertrofica del piloro	STENOSI IPERTROFICA DEL PILORO, <i>del lattante</i> (XIV, 1149-1154)
Surfattante alveolare	SURFATTANTE ALVEOLARE* (*6888-6899)
Teratologia	TERATOLOGIA (XIV, 1996-2006; TERATOMA (XIV, 2006-2017; *7010-7013)
Tetania	TETANIA (XV, 4146-4156)
Vaccinazioni	VACCINI (XV, 1568-1583; *7461-7471; **)
Vomito	VOMITO, <i>vomito nel bambino</i> (XV, 2241-2248)

SOMMARIO GENERALE

NEONATO DI BASSO PESO	col. 3916
ANEMIE	col. 3922
FOTOTERAPIA DELL'ITTERO NEONATALE	col. 3925
EMERGENZE CARDIOLOGICHE NEONATALI	col. 3935

NEONATO DI BASSO PESO

SOMMARIO

Introduzione e classificazione (col. 3916). - **Incidenza** (col. 3917). - **Mortalità** (col. 3918). - **Patologia connessa con il basso peso dei neonati** (col. 3919). - **Handicap dei bambini di basso peso e/o di età gestazionale molto bassa** (col. 3919). - **Studio particolare dei neonati piccoli per età gestazionale (SGA)** (col. 3920)

Introduzione e classificazione

Il peso alla nascita è, in pratica, il più importante parametro di vitalità e normalità del neonato. Fra i 2,500 e i 4,000 kg il neonato è considerato *normosoma*, sotto i 2,500 kg è *neonato di basso peso* o *iposoma*, sopra i 4,000 kg è *macrosoma* o *ipersoma*.

La classificazione più accettabile dei n. di basso peso è quella riportata nella tab. I.

Il problema del n. di basso peso è strettamente legato a quello dei n. che nascono prima della 37ª settimana di gestazione. Vi sono controversie sul termine *premature* (v. *PREMATURITÀ*) assegnato a questi neonati: l'OMS lo mantiene, mentre secondo gli AA. di questa voce sarebbe più corretto indicare questa condizione con il termine *pretermine*.

In base alla durata della gravidanza si distinguono:

a) n. LGA (*Large for Gestational Age*): grandi per l'età gestazionale.

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DEI NEONATI DI BASSO PESO

Neonati di basso peso (LBW: <i>Low Birth Weight</i>): sotto kg 2,500 e sopra kg 1,500
Neonati di peso molto basso (VLBW: <i>Very Low Birth Weight</i>): sotto kg 1,500 e sopra kg 1,000
Neonati di peso estremamente basso (ELBW: <i>Extremely Low Birth Weight</i> ; o anche VVBW [<i>Very Very Low Birth Weight</i>): sotto kg 1,000

b) n. AGA (*Appropriate for Gestational Age*): adeguati all'età gestazionale;

c) n. SGA (*Small for Gestational Age*): piccoli per l'età gestazionale.

Per gli SGA sono state usate anche altre denominazioni: dismaturi (Sijostedt), pseudoprematuri (Baird), piccoli per la data di gravidanza o *Small for Date* (SFD; Butler), feto ipotrofico, n. con ritardo di crescita intrauterina o IUGR (*Intra Uterine Growth Retardation* [Warkany, 1961]), sindrome di Clifford, *distress* fetale cronico (Gruenvald), «*failure to thrive*» in utero. Naturalmente tante denominazioni sono in rapporto al fatto che questi n. sono diversi clinicamente tra loro, derivano da cause diverse e hanno una prognosi, nell'immediato e a distanza, altrettanto diversa.

In base a scale di crescita intrauterina, si è definito SGA il n. al disotto del 3° percentile delle griglie di crescita di Usher, Babson e Miller ed al disotto del 10° percentile di quelle di Lubchenco che tengono conto anche della lunghezza occipito-sacrale e della circonferenza cranica (v. NEONATO, X, 339-340, fig. 1).

È molto difficile separare i fattori etiologici associati alla nascita pretermine da quelli associati alla IUGR. Esiste una correlazione per entrambi con le condizioni socioeconomiche depresse. Vi sono invece una serie di cause identificabili che determinano la *nascita prematura* (*fetali*: *fetal distress*, eritroblastosi, idrope non immune; *placentali*: placenta previa, *abruptio placentae*; *uterine*: utero bicorni, dilatazione prematura; *maternali*: preeclampsia, cardiopatie cianotiche, insufficienza renale, infezioni del tratto urinario, corioamnionite), e fattori associati con la IUGR (ipossia, asfissia perinatale, ipoglicemia, policitemia e iperviscosità legata all'aumento della produzione di eritropoietina, anomalie cromosomiche, complesso TORCH [toxoplasma, rosolia, citomegalovirus, herpes]). Vi è comunque una grande difficoltà a separare i fattori della prematurità da quelli associati a IUGR.

Comunque l'insieme di entrambi i fattori determina la nascita di un n. di basso peso.

Incidenza

L'insieme dei n. di basso peso in Italia è intorno al 5%; tra gli illegittimi si riscontra una incidenza doppia, tra i nomadi tripla (Salvioli). Tra i primogeniti l'incidenza è molto maggiore (tab. II).

In Italia i n. iposomi sono molto più frequenti al Nord che al Sud. Tra le cause una percentuale maggiore di primogeniti tra i nati del Nord per la minore natalità ma più di tutto sono i fattori climatici che influenzano il peso nascita; il fenomeno è più evidente per la Valle d'Aosta e altre regioni montuose ove il peso nascita è particolarmente basso.

L'incidenza delle gravidanze multiple sui nati di peso < 2,500 kg è (Italia, 1991) del 20,5% (6427 su 30.754 nati vivi).

L'incidenza dei casi con gravidanza prima della 37ª set-

TAB. II. NATI DI BASSO PESO E ORDINE DI GENERAZIONE

(Italia, 1991)

Ordine generazionale	Nati vivi	Nati con peso < 2,499 kg	%
Primogeniti	281.023	17.736	6,14
Secondogeniti e successivi	281.787	13.428	4,77
TOTALE	562.810	30.754	5,46

TAB. III. NATI DI BASSO PESO IN RAPPORTO ALLA DURATA DELLA GRAVIDANZA

(Italia, 1991)

Categoria di peso	Gravidanze < 37 settimana		Gravidanze > 37 settimana	
	n.	%	n.	%
Sotto 2,499 kg	9.327	30,32	21.427	59,68
Sotto 1,499 kg	3.622	92,60	291	7,40

timana e a termine sui nati con peso basso è molto diversa se si prendono in esame tutti i neonati sotto kg 2,500 o solo quelli sotto kg 1,500 (tab. III).

Negli U.S.A. (1981), pur permanendo una incidenza elevata tra la popolazione negra (12,7%), l'incidenza generale è scesa dall'11% nel 1971 al 6,8% nel 1981 (Goldenberg *et al.*, 1981), per risalire al 7,1% nel 1991.

Mortalità

La mortalità dei n. di basso peso prescindendo dalla durata della gravidanza (Mac Farlane, 1990) è stata maggiore per l'anno 1983 che per l'anno 1987, in Inghilterra, come riportato in tab. IV.

Tenendo invece conto della durata della gravidanza è stata, per gli anni 1984 e 1989 in Scozia (The Scottish low birth weight study), quella riportata in tab. V.

Si nota perciò oltre al notevole miglioramento in pochi anni, anche la dipendenza della mortalità più dalla età gestazionale, che dal peso alla nascita.

I limiti di vitalità studiati da Allen *et al.* (1993) su 142 nati pretermine tra la 22ª e la 25ª settimana di gestazione hanno accertato:

a) solo 56 n. del totale (39%) sono sopravvissuti per 6 mesi;

TAB. IV. MORTALITÀ DEI NEONATI DI BASSO PESO

(Inghilterra, nel 1983 e nel 1987)

Classi di peso	1983	1987
Sotto kg 1,000	56,6	50,2
Tra kg 1,000 e kg 1,499	16,7	13,7
Tra kg 1,499 e kg 1,999	4,7	3,6
Tra kg 1,999 e kg 2,499	1,3	0,9

TAB. V. MORTALITÀ DEI NEONATI DI BASSO PESO IN RAPPORTO ALL'ETÀ GESTAZIONALE

(The Scottish low birth weight study)

Età gestazionale	1984 (%)	1989 (%)
Inferiore a 26 settimane	79,3	92,2
26-27 settimane	47,2	35,7
28-31 settimane	16,6	10,7
32-36 settimane	2,0	1,2

b) nessuno è sopravvissuto dei 29 n. nati alla 22^a settimana di gestazione;

c) sono sopravvissuti 6 dei 40 n. (15%) nati alla 23^a settimana di gestazione;

d) sono sopravvissuti 19 dei 34 n. (56%) nati alla 24^a settimana di gestazione;

e) sono sopravvissuti 31 di 39 n. (79%) nati alla 25^a settimana di gestazione.

Dei bambini nati alla 23^a settimana di gestazione, solo il 2% è sopravvissuto senza gravi danni intracranici, comparato con il 21% di quelli nati alla 24^a settimana e con il 69% di quelli nati alla 25^a settimana.

Il peso alla nascita dei n. di questa esperienza era ovviamente molto basso e mediamente correlato con l'età gestazionale.

Gli AA. concludono che le tecniche di rianimazione aggressive sono indicate solo per i n. nati alla 25^a settimana di gestazione (v. sotto, col. *3920).

Patologia connessa con il basso peso dei neonati

Rinviamo al capitolo successivo per quanto concerne i reliquati stabili di n. con basso peso e soprattutto dei n. con età gestazionale molto bassa. In questa sede ricordiamo le patologie più frequentemente riscontrabili nell'immediato (tenendo presente che queste possono dar luogo, successivamente, a patologie particolarmente invalidanti): ipossia e ischemia cerebrale, enterocolite necrotizzante (soprattutto in n. di peso alla nascita molto basso), anemia (per gli aspetti clinici e il trattamento, v. sotto coll. **3922-3924), aumento delle infezioni (tenere presente l'immaturità del n. di basso peso per quanto concerne il metabolismo dei farmaci, nel caso di somministrazioni di antibiotici), insufficienza respiratoria e malattia delle membrane ialine (l'incidenza di quest'ultima è inversamente proporzionale all'età gestazionale e al peso alla nascita: è del 60-80% nei n. al di sotto della 28^a settimana di gestazione, del 15-30% nei n. con età gestazionale tra la 32^a e la 36^a settimana, del 5% nei n. oltre la 37^a settimana, ed è rara nel neonato a termine).

Handicap dei bambini di basso peso e/o di età gestazionale molto bassa

Gli handicap dei bambini che sopravvivono sono più legati all'età gestazionale che non al peso, quando il basso peso non sia determinato da una età gestazionale bassa (22^a-25^a settimana).

I neonati sono soprattutto costituiti dai danni neurologici, dovuti sempre all'emorragia intraventricolare, con le gravissime conseguenze per quanto concerne la visione e l'udito, e per quanto concerne le parafisi cerebrali, come la spaziosità, l'attenzione, la capacità di apprendimento.

Rapportiamo i dati del lavoro del gruppo scozzese di studi sul basso peso alla nascita. Su 611 sopravvissuti (69% dei

TAB. VI. RELIQUATI NEUROLOGICI IN BAMBINI DI BASSO PESO

(The Scottish low birth weight study)

	kg 1,000	da kg 1,000 a kg 1,499	da kg 1,500 a kg 1,750
Reliquati neurologici	22%	14%	10%
Disturbi visivi	43%	17%	16%
Cecità	5%	0,3%	1,2%
Disturbi uditivi	3%	2%	2,7%

i nati), i bambini all'età di 4 anni presentavano i valori riportati in tab. VI.

Whyte *et al.* (1993) denunciano assenza di handicap a 2 anni solo nel 50% dei n. sopravvissuti alla nascita dopo 23 settimane di gestazione, nel 41% dei n. alla 24^a settimana e nel 59% di quelli nati dopo 25 settimane di gestazione.

Lo studio regionale di Oxford (Johnson *et al.*, 1993) denuncia da moderato a grave handicap a 4 anni nell'80% dei bambini nati con meno di 25 settimane di gestazione, e il 66% di handicap nei bambini nati alla 25^a settimana di gestazione.

La maggior parte degli AA. propendono per una aggressiva rianimazione solo per i n. nati alla 25^a settimana, ma sono ad essa contrari per quelli nati alla 22^a settimana di gestazione. Per i nati tra la 23^a e la 24^a settimana di gestazione suggeriscono una certa flessibilità di scelta che tenga conto della cattiva prognosi in questi casi soprattutto per quanto concerne i reliquati neurologici.

Studio particolare dei neonati piccoli per età gestazionale (SGA)

I n. piccoli per l'età gestazionale (SGA) rappresentano un insieme eterogeneo sia dal lato somatofisiologico sia dal lato etiopatogenetico. Li divideremo in due gruppi.

1) *Neonati con peso molto più ridotto rispetto all'altezza ed alla circonferenza cranica*, aspetto vecchieggiante, cute desquamante, fontanelle e suture ampie, mani e piedi grandi, cordone ombelicale piccolo e rapidamente mummificato.

Vengono chiamati *SGA asimmetrici* o *sproporzionati* particolarmente per il cranio voluminoso per effetto della circolazione distrettuale, con spasmo dei vasi di vari organi e maggiore irrorazione dei vasi del capo, come risposta ad anossia cronica. La *noxa* si determina in genere nel III trimestre di gravidanza e può essere dovuta a cause numerose, che sono le stesse che determinano anche i pesi neonatali relativamente bassi (tra kg 2.500 e 3.000). Comunque le cause più frequenti sono l'ipertensione gravidica, la preeclampsia, il diabete grave (che può determinare anche, al contrario, macrosomia), la malnutrizione, il tabagismo, la tossicodipendenza, l'alcolismo e, tra le cause sociali, la povertà, la illegittimità ed il nomadismo.

Ad esclusione dei casi (es. embriofetopatia alcolica) il cui danno da malnutrizione dell'ultima fase della gravidanza segue a condizioni sfavorevoli in periodo precedente, i n. di questo tipo di SGA recuperano abbastanza facilmente il peso e non presentano gravissimi problemi di adattamento alla vita extrauterina. La loro mortalità in periodo neonatale è più bassa di quella dei veri prematuri; ciononostante presentano alcuni problemi con particolare frequenza: problemi di controllo della termoregolazione, nonché quelli relativi alla maturità ed alla fisiologia dell'apparato respiratorio e meno frequentemente l'anemia da carenza di ferro e anemia da carenza di B₁₂ con gravidanza superiore alle 34

settimane). Per la policitemia, legata alla anossia cronica, è invece frequente la iperbilirubinemia e, anche per l'elevato consumo di glicogeno (le riserve possono raggiungere anche la decima parte di quelle dei neonati a termine) per l'ipossia, possono aversi ipoglicemie gravi e persistenti. Frequentemente è l'ipocalcemia.

2) Il secondo gruppo di SGA, chiamato *simmetrico o proporzionato* perché le tre misure, peso, altezza e circonferenza cranica non sono per lo più sproporzionate tra loro, è invece molto disomogeneo nell'etiopatogenesi, nella clinica e nella prognosi, specie a distanza.

a) Un primo sottogruppo è costituito da n. normali ma di basso peso per fattori razziali, familiari o ambientali (ad es. in climi di montagna con ipossigenazione). Naturalmente i problemi di allevamento sono maggiori rispetto ai n. di maggior peso, ma non molto dissimili.

b) Un secondo sottogruppo è costituito da n. con alterazioni genetiche, esiti di embriopatie e precoci fetopatie. Si tratta dei n. con patologie da TORCH (complesso toxoplasma-rosolia-citomegalovirus-herpes), nonché da embriopatie da radiazioni, da somministrazione di farmaci e infine da cause sconosciute.

In questo sottogruppo non sempre vi è proporzione fra le varie misure perché vi può essere microcefalia.

Questo sottogruppo comprende anche i casi descritti come iposomia patologica del neonato (Menichella, 1955) o come *Intra Uterine Growth Retardation* (IUGR; Warkany et al., 1961) e caratterizzati da microcefalia, oligofrenia, grave compromissione della crescita staturale e frequenti malformazioni associate. È chiaro che il confine tra questi soggetti ed il nanismo primordiale (Ballantine; Gilford) è difficilmente delimitabile. L'individuazione di questo gruppo di SGA chiarisce meglio i problemi della prognosi somatopsichica dei n. di basso peso (LBW); vi fu una vecchia polemica relativa allo sviluppo degli immaturi e prematuri. I lavori citati e quelli di Baird e di Hepner e Bowen hanno contribuito a far luce sul fatto che il vero prematuro ha spesso una prognosi sullo sviluppo somatopsichico favorevole e non così lo SGA simmetrico o proporzionato ed in particolare lo IUGR.

Dubowitz L. e Dubowitz V. (1977) hanno creato delle scale per la valutazione dell'età gestazionale su criteri somatici e di valutazione neurologica.

Per una ampia trattazione del n. pretermine, si rinvia alla voce **PREMATURITÀ** (XII, 962-996).

In sintesi i criteri diagnostici tra le varie categorie di n. di basso peso sono principalmente i seguenti:

— Diagnosi differenziale tra prematuri e SGA:

a) età gestazionale in base alla data dell'ultima mestruazione;

b) scale di Dubowitz su parametri somatici e neurologici.

— Diagnosi differenziale tra SGA asimmetrici o sproporzionati e SGA simmetrici:

a) sproporzione tra cranio e peso;

b) sproporzione tra peso e altezza.

— Diagnosi differenziale tra SGA simmetrici normali e SGA simmetrici patologici (IUGR):

a) fattori razziali, familiari, climatici per i primi;

b) presenza di malformazioni, microcefalia, evoluzione negativa dello sviluppo somatopsichico e staturale per i secondi.

Bibliografia

- Allen M. C., Donohue P. K., Dusman A. E., *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 1597.
Burgio G. R. et al., *Pediatria essenziale*, 1997, UTET, Torino, pp. 160-171.
Copper R. L., Goldenberg R. L., Creasy R. K. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, 168, 78.

Colarizi P., Cappadocia P., *Elementi di Neonatologia*, 1993, Verduci, Roma.

Dubowitz L., Dubowitz V., *Gestational Age of the Newborn*, 1977, Addison Wesley, Reading (MA).

Fanaroff A. A., Korones S. B., Wright L. L. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 1107.

ISTAT, *Nascite e Decessi*, 1991 e 1994.

Johnson A. et al., *Br. Med. J.*, 1993, 306, 1715-1718.

Lubchenko L., *The High Risk Infant*, 1976, Saunders, Philadelphia.

MacFarlane A. S., 12° Congresso Medicina Perinatale, Lyon, 1990.

Menichella V., *Atti VIII Congresso Nipologia*, Napoli, giugno 1955.

Menichella V., *Maternità e Infanzia*, 1967, 11, 1013-1082.

Nelson *Textbook of Pediatrics*, 1996, Saunders, Philadelphia, pp. 454-462.

Orzalesi M., *Prospettive in Pediatria*, 1991, 23, 85.

Shono P., Behrman R. E. eds., *Low Birth Weight, The Future of Children*, 1993, 5 (1), 1-213.

Smith C. S. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339 (25), 1817-1822.

Warkany J., Monroe B., Sutherland B., *Am. J. Dis. Child.*, 1961, 102, 249.

Whyte H. E. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1993, 82, 1-7.

Wright K., Dawson J. P., Fallis D. et al., *Pediatrics*, 1993, 91, 922.

VINCENZO MENICHELLA E GIOVANNA MENICHELLA

ANEMIE

[v. vol. X, coll. 411-425; Agg. I, coll. *5347-5351]

SOMMARIO

Cenni sulle anemie del neonato (col. 3922). - Trattamento delle anemie del neonato (col. 3923). - Impiego dell'eritropoietina (col. 3923).

Cenni sulle anemie del neonato

Il periodo neonatale è caratterizzato da una notevole frequenza di sindromi anemiche. Possiamo classificarle, secondo la causa, in:

1) anemie da perdita di sangue:

a) trasfusioni feto-fetali, feto-materne e feto-placentari;

b) emorragie da malattia emorragica del neonato (es. melena);

c) emorragie ventricolari del n. di basso peso;

d) emorragie da coagulopatie, piastrinopenie, piastrinopatie;

e) ripetute sottrazioni di sangue a scopo diagnostico;

2) anemie da accentuata distruzione di globuli rossi:

a) emolisi da trasmissione transplacentare di anticorpi materni (malattia da incompatibilità Rh e ABO);

b) emolisi da alterazioni genetiche del globulo rosso;

c) emolisi da carenze enzimatiche del globulo rosso, emolisi da farmaci ed emolisi da elevata sensibilità del globulo rosso a fatti ossidativi;

3) anemie da carenze nutrizionali di elementi necessari alla formazione del globulo rosso (ferro, ac. folico, vit. B₁₂, proteine);

4) anemie da aplasia eritroide (malattia di Diamond-Blackfan);

5) anemie da inappropriata risposta eritropoietica con carenza di eritropoietina.

Di particolare interesse sono le sindromi anemiche che colpiscono il neonato di basso peso (v. sopra, col. **3916) per l'intervenire dell'anemia su di una già grave patologia con quadri clinici complessi e necessità di frequenti prelievi. Possiamo dire che peculiari del n. di peso molto basso sono:

a) un'anemia delle prime due settimane legata alle gravi condizioni generali e ai frequenti prelievi;

b) un'anemia, specie tra la IV e l'VIII settimana di vita, da scarsa risposta eritropoietica e da scarsi livelli di eritropoietina (*anemia del pretermine*);

c) un'anemia da carenza di elementi nutrizionali, specie di ferro, del II-III mese (*anemia del pretermine tardiva*) ed anemie megaloblastiche, da carenza di ac. folico e Vit. B₁₂.

Trattamento delle anemie del neonato

Il trattamento delle anemie del n. va diviso in:

- 1) trattamento trasfusionale (v. TRASFUSIONE**);
- 2) trattamento farmacologico. Quest'ultimo concerne quattro gruppi di farmaci:

a) *ac. folico e vit. B₁₂*: anemie megaloblastiche, anemie emolitiche croniche ereditarie, anemia megaloblastica acquisita.

Dosi: ac. folico: da 0,05 mg, come apporto giornaliero in condizioni normali, a 1 mg/die nelle anemie emolitiche; Vit. B₁₂: 1 mg a settimana per i.m.

b) *Ferro*: anemie postemorragiche, anemia tardiva del pretermine (profilassi e terapia).

Dosi: nel pretermine, con inizio in periodo variabile dalla II alla VIII settimana di vita, usare ferro bivalente per os alla dose di:

2 mg/kg/die per nati da 1,5 a 2,5 kg;

3 mg/kg/die per nati da 1,0 a 1,5 kg;

4 mg/kg/die per nati sotto 1,0 kg.

c) *Corticosteroidi*: malattia Diamond-Blackfan.

Dosi: variabili a seconda della risposta; iniziare con 2 mg/kg/die di prednisone.

d) *Eritropoietina umana ricombinante*: anemia del pretermine; sequele anemiche della malattia emolitica da alloimmunizzazione Rh. Per le dosi v. sotto.

Impiego dell'eritropoietina

L'eritropoietina ricombinante umana (rHuEPO) si è resa disponibile in questi ultimi anni ed ha assunto subito una grande importanza terapeutica, permettendo di evitare trasfusioni e conseguenti complicazioni (v. ERITROPOIETINA*; ERITROPOIETINA**).

Il gene dell'eritropoietina è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7. La produzione di eritropoietina è epatica nel feto e renale nell'adulto; il passaggio dalla sede epatica a quella renale inizia nel III trimestre della vita intrauterina ed è completo alcune settimane dopo la nascita. In presenza di ipossia si verifica un aumento della concentrazione sierica di eritropoietina, come avviene in casi di grave malattia emolitica o di insufficienza placentare.

Sono stati compiuti numerosi studi sull'uso della eritropoietina nel n. di basso peso (Shannon *et al.* [1992]; Ohls e Christensen [1991]; Carnielli *et al.* [1992]; Bechensteen *et al.* [1993]; Messer *et al.* [1993]; Emmerson *et al.* [1993]) ed oltre a questi, quello del «Gruppo di studio europeo multicentrico per l'eritropoietina» (1994), guidato da Maier, su 120 neonati ed altrettanti controlli. Anche se si esigono ulteriori conferme, alcuni punti sembrano definiti.

1) Gli effetti della eritropoietina sulla crisi ematica sono i seguenti: aumento dell'ematocrito, aumento dei reticolociti, riduzione della sideremia e della ferritina, leucopenia. Vi è, in pratica, una stimolazione dell'attività eritropoietica con riduzione, forse correlata, dell'attività leucopoietica ed un maggior consumo di elementi nutrizionali, in particolare di ferro. Di conseguenza, il trattamento va associato alla somministrazione di ferro per ottenere adeguati risultati ed evitare l'anemia tardiva da carenza di ferro, già comune nell'immaturo.

2) A differenza dei n. trattati con trasfusione di sangue di adulti, in cui si ha una depressione della produzione di eritropoietina endogena perché l'HbA cede molto ossigeno ai tessuti e perciò fa sparire lo stimolo ipossico, il trattamento con eritropoietina stimolando la produzione di HbF, che cede con difficoltà l'ossigeno ai tessuti, non deprime la produzione endogena della stessa.

3) Il vantaggio maggiore del trattamento consiste nella riduzione delle necessità di trasfusioni ed è perciò notevole per i n. di peso molto basso, che necessitano, in genere, di frequenti trattamenti trasfusionali.

Nello studio multicentrico di Maier *et al.* (1994) sono, perciò, stati presi in esame solo n. di peso tra i 750 ed i 1500 g e di durata di gravidanza inferiore alle 34 settimane (neonati di peso molto basso ma di età gestazionale superiore alle 34 settimane vanno difficilmente incontro ad anemia). Naturalmente l'indicazione al trattamento ha seguito criteri standardizzati in rapporto alle settimane di vita, all'ematocrito, alla Hb, alla concentrazione di ossigeno inspirato.

Il trattamento è stato iniziato al 3° giorno di vita e proseguito fino al 42°; la dose di eritropoietina beta è stata di 250 U.I./kg, tre volte alla settimana per via sottocutanea; sono stati somministrati inoltre 2 mg di ferro al giorno a partire dal 14° giorno.

Nel lavoro di Maier *et al.*, si è realizzato un trattamento profilattico dal 3° giorno di vita; nello studio di Ohls e Christensen (1991) e in quello di Shannon *et al.* (1992) si trattava invece di terapia per anemia già in atto.

Per quanto concerne le trasfusioni di sangue, il successo pieno (nessuna necessità di trasfusioni ed ematocrito mai sceso al di sotto del 32%) si è avuto nel 27,5% dei trattati con eritropoietina contro il 4,1% dei controlli. La quantità di sangue trasfusa per giorno e per kg era stata di 0,09 ml nei trattati con eritropoietina e di 0,41 ml nei controlli.

4) Quanto agli aspetti negativi del trattamento con eritropoietina, a parte due casi di morte improvvisa che hanno indotto Emmerson *et al.* (1993) ad interrompere lo studio, non confermati però da altri ricercatori e specialmente dalla vasta casistica di Maier, l'accento va posto sulla eventuale azione proinfettiva. Maier *et al.* (1994) hanno riscontrato 14 episodi setticemici contro 7 nei controlli. Più che alla leucopenia gli A.A. attribuiscono il dato alla necessità, per il trattamento, di numerose iniezioni sottocutanee ed alla carenza di ferro.

Tra i soggetti trattati con eritropoietina vi sarebbe una minor crescita in peso rispetto ai controlli, secondo vari A.A. Bechensteen *et al.* (1993) hanno invece riscontrato crescite analoghe tra i due gruppi, se viene dato, oltre al ferro, un supplemento di proteine. È verosimile che la stimolazione eritropoietica aumenti la necessità di proteine e calorie.

Oltre che per l'anemia del pretermine l'eritropoietina è stata usata per l'anemia tardiva da grave malattia emolitica fetoneonatale da alloimmunizzazione Rh. Questa anemia caratterizzata da reticolocitopenia e bassi livelli sierici di eritropoietina si sviluppa dalla fine del I mese di vita al II mese, specie nei soggetti già trattati in utero con trasfusioni di globuli rossi concentrati. Sembra sia proprio l'elevata quota di Hb di tipo adulto, presente a causa delle trasfusioni, ad inibire, attraverso la correzione dell'ipossia tissutale, la produzione di eritropoietina. Il trattamento va fatto con 200 U.I./kg/die per 10 giorni ovvero a giorni alterni per 2-4 settimane.

Bibliografia

- Bechensteen A. G., Haga P., Halvorsen S. *et al.*, *Arch. Dis. Child.*, 1993, **69**, 19-23.
 Carnielli V., Montini G., DaRiol R. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1992, **121**, 98-102.
 Casadei Pistilli A. M., Carapella De Luca E., Carlucci F., Pascone R., *Att. XVI Corso Neonatologia*, Nov. 1993, 135-145.
 Emmerson A. J. B., Coles H. J., Stern C. M. M., Pearson T. C., *Arch. Dis. Child.*, 1993, **68**, 291-296.
 European Multicentre Erythropoietin Study Group (Maier R. F. *et al.*), *N. Engl. J. Med.*, 1994, **330** (17), 1173-1178.
 Gallagher P. G., Eherenkrantz R. A., *Clinics in Perinatology*, 1993, **20**, 1, 169-187.
 Messer J., Haddad J., Donato L. *et al.*, *Pediatrics*, 1993, **92**, 519-523.
 Ohls R. K., Christensen R. D., *J. Pediatr.*, 1991, **119**, 781-788.
 Shannon K. M., Mentzer W. C., Abels R. J. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1992, **120**, 586-592.

VINCENZO MENICHELLA E GIOVANNA MENICHELLA

FOTOTERAPIA DELL'ITTERO NEONATALE

SOMMARIO

Cenni storici sull'ittero neonatale e sulla fototerapia (col. 3925). - Fotodegradazione della bilirubina (col. 3926): Fotossidazione. - Fotoisomerizzazione configurazionale. - Fotoisomerizzazione strutturale o fotocicizzazione. - La luce come farmaco (col. 3928). - Nuove fototecnologie (col. 3930). - Quale futuro per la fototerapia? (col. 3933).

Cenni storici sull'ittero neonatale e sulla fototerapia

«Generally speaking, icterus neonatorum is an affection of very little importance...». Così nel 1854 si esprimeva Francis Condie nel suo manuale di pediatria: a quei tempi l'iperbilirubinemia neonatale veniva considerata «un'affezione di scarsissima importanza».

Di fatto queste considerazioni non si discostavano da quanto, un secolo prima, affermava Gian Battista Morgagni che nel *De Sedibus et Causa Morborum* narra come «quindici suoi figli, appena partoriti, divenissero gialli ed alcuni in modo piuttosto grave, e che «l'itterizia svanì di per se stessa insensibilmente in tutti, senza il benché menomo soccorso dell'arte».

Fu Michael Underwood a discostarsi da questa diffusa opinione e a distinguere nel suo testo di pediatria, due «tipi di giallezza infantile: uno frequente ma lieve, senza i caratteri di una vera e propria malattia, che guarisce in pochi giorni, ed uno raro, grave, che si manifesta in talune famiglie con segni oscuri, ma tali da far pensare all'intervento dei fattori ereditari».

Del secondo tipo riporta la storia di un singolarissimo caso indicatogli dal Pearson che può essere considerato la prima descrizione clinica apparsa in letteratura della malattia emolitica del neonato.

«La Signora J. ebbe undici figli. In nove di essi apparve l'itterizia qualche giorno dopo la nascita e morirono tutti entro la fine del primo mese. Il decimo figlio visse, ma fu colto anch'egli da itterizia e morì al termine del sesto anno. Nel maggio del 1796 la signora J. partorì l'undicesimo figlio: al terzo giorno il neonato divenne giallo, torpido e sonnolento, cadendo di tanto in tanto in un leggero stato convulsivo. Nel quarto giorno la tinta morbosa cutanea variò spesso mostrandosi a momenti più fosca e talora svanendo quasi per intero. Il languore si aggravò. Il bambino, pur essendo insensibile, continuò a poppare al seno materno fino a poche ore prima della morte, che avvenne al nono giorno».

L'Underwood riporta questo drammatico racconto senza commenti «in attesa che ulteriori esperienze lo mettano in grado di tirare qualche pratica deduzione». I primi dati sperimentali non tardano a comparire e con essi le prime teorie etiopatogenetiche di chi, come Lasseigne, afferma che «l'elemento colorante contenuto nel sangue dei neonati itterici può derivare non da travaso di bile ma dalla dissoluzione del sangue» o di chi, come Ylpo asserisce «che l'iperbilirubinemia neonatale è una manifestazione di immaturità funzionale epatica».

Tuttavia, solo dopo la memorabile scoperta dei gruppi sanguigni, agli inizi del XX secolo, da parte di Landsteiner e Wiener e la successiva scoperta del fattore Rhesus (v. SANGUIGNI GRUPPI [v.; v.*]) è possibile chiarire che entrambe le teorie sono valide, che diversi meccanismi etiopatogenetici coesistono e che, in linea generale si possono distinguere gli itteri epatogeni da quelli emolitici e, relativamente all'epoca neonatale, gli itteri fisiologici da quelli da incompatibilità materno-fetale (v. EMOLITICA MALATTIA DEL NEONATO). L'iperbilirubinemia neonatale non viene più considerata «un'affezione di scarsissima importanza» ma un'entità clinica ben definita, particolarmente grave quando, per

gli elevati livelli di bilirubina (BR) nel sangue, viene colpito il S.N.C. (encefalopatia bilirubinica).

Le problematiche di carattere terapeutico diventano pressanti: trovano una loro iniziale risposta nell'exanguinotrasfusione, metodica però che si rivela rischiosa per il neonato per le possibili complicanze immediate e a distanza.

Sicuramente il cosiddetto ittero fisiologico (v. NEONATO, X, 418) è il segno clinico di maggior riscontro in epoca neonatale. Ancora oggi non mancano notevoli differenze di approccio ideologico e terapeutico, come indicato recentemente da Maisels *et al.* (1988), i quali affermano che abbiamo bisogno di «una nuova definizione di ciò che è e ciò che non è ittero fisiologico».

Benché fosse noto fin dal 1938 che la BR è fotolabile, l'applicazione di questa nozione in medicina e soprattutto in neonatologia risale alla fine degli anni '50. L'originale articolo di R. J. Cremer, P. W. Perriman e D. H. Richards dal titolo «Influenza della luce sull'iperbilirubinemia del neonato» viene pubblicato nella rivista inglese *The Lancet* il 24 maggio del 1958. Le fondamentali esperienze cliniche di Cremer e collaboratori dimostrarono come la luce fosse in grado di determinare la riduzione della concentrazione sierica della BR nei neonati itterici. Fu comunque l'osservazione casuale, da parte di una suora-infermiera, Sister Ward, che nei neonati posti in zone del reparto più esposte alla luce l'ittero scompariva più rapidamente rispetto ai neonati posti in zone meno illuminate, a dare l'intuizione ai neonatologi inglesi di adoperare la luce per la terapia dell'iperbilirubinemia neonatale.

Da allora la fototerapia (FT) viene eseguita quotidianamente nei reparti di neonatologia. La prima unità fototerapica entrata in un reparto di neonatologia di fatto non si discosta molto da quelle che vengono oggi universalmente impiegate. Milioni di neonati sono stati trattati con successo in tutto il mondo e tuttora «le lampade dei pannelli per fototerapia» quotidianamente illuminano la pelle dei piccolissimi pazienti (attualmente, secondo stime approssimative, si può calcolare che in Italia siano trattati con la FT dai 40.000 ai 60.000 neonati l'anno). L'exanguinotrasfusione, metodica non esente da rischi per il paziente, l'unica terapia possibile prima della scoperta di Cremer, salvo rare eccezioni, viene abbandonata.

L'attenzione dei ricercatori si è successivamente spostata dal piano strettamente clinico a quello sperimentale con lo studio dei meccanismi di degradazione della BR per azione della luce. Dal grossolano concetto di distruzione della BR si passa ad un'interpretazione più scientifica dell'azione della luce con l'acquisizione dei due processi fondamentali di fotossidazione ed isomerizzazione.

Fotodegradazione della bilirubina

Fotossidazione

L'assorbimento di un fotone da parte della molecola di BR dà luogo ad una reazione di fotossidazione, o meglio produce un'azione fotodinamica.

La reazione suddetta è schematizzata con i seguenti processi (l'asterisco indica lo stato eccitato):

a) assorbimento del fotone ed eccitazione della BR nello stato eccitato di singoletto



b) transizione interna (*intersystem crossing*) da stato di singoletto a stato di tripletto



c) trasferimento di energia nella collisione con una molecola di ossigeno nello stato fondamentale



d) ossidazione della BR da parte dell'ossigeno eccitato



Il rendimento quantico di questa reazione è molto basso, circa 10^{-4} . Lo spettro d'azione è stato misurato abbastanza tardi rispetto all'inizio degli studi sulla fotochimica della BR. Lo spettro d'azione della fotossidazione della BR-IXa ricalca, come previsto, lo spettro di assorbimento della BR-IXa.

Fotoisomerizzazione configurazionale

L'assorbimento di radiazione ottica da parte della BR nativa (configurazione *cis* = 4Z, 15Z) fa sì che uno dei due doppi legami che uniscono il pirrolo interno a quello più esterno va incontro a rottura permettendo la libera rotazione del pirrolo attorno all'asse C=C, con rottura dei relativi legami idrogeno intramolecolari, e successiva riformazione del doppio legame. Questa reazione fotochimica non cambia il numero o il tipo di atomi presenti nella molecola di BR, ma solo la loro distribuzione spaziale e i prodotti sono indicati come isomeri configurazionali della BR.

Fotoisomerizzazione strutturale o fotociclizzazione

L'irraggiamento prolungato di soluzioni contenenti BR porta alla formazione di un isomero più stabile, la «luminubina» (LR), nella quale il gruppo vinilico legato a C3 è andato incontro a ciclizzazione con l'anello pirrolico adiacente. In sintesi, nell'economia generale del processo del fotocatabolismo della BR l'isomerizzazione configurazionale sembra giocare un ruolo rilevante, data la maggior resa quantica, ma la lenta clearance dei fotoprodotto ne dimi-

nuisce l'importanza. Il contrario sembra avvenire per l'isomerizzazione strutturale a minor resa quantica ma ad eliminazione assai più rapida dei fotocataboliti.

La FT agisce come un sistema integrato dove ogni singola foto-reazione concorre al raggiungimento del medesimo obiettivo seguendo vie diverse: immediata trasformazione della BR in isomeri configurazionali con verosimilmente rapida perdita della sua tossicità; isomerizzazione strutturale più lenta che garantisce una eliminazione sicura e rapida del pigmento; ossidazione, con minore importanza, anche se recenti studi *in vitro* sembrano riconoscerle non solo il ruolo di «semplice comparsa» ma anche la possibilità di svolgere un'azione sinergica con i meccanismi di isomerizzazione, incrementando la produzione di LR.

Nella fig. 1 viene schematicamente riportato il quadro delle reazioni della fotodegradazione della BR.

La luce come farmaco

Dosaggio. — Per il rapporto dose-risposta, è stata stabilita una correlazione tra intensità della irradiazione e decremento della BR nel plasma. Le recenti acquisizioni sui processi del fotocatabolismo della BR, sopra ricordati, spiegano come non sia consigliabile l'impiego di intensità superiori: non consente migliori risultati terapeutici, può essere associato ad effetti collaterali dannosi per il neonato.

Lunghezza d'onda della luce impiegata. — In 30 anni di

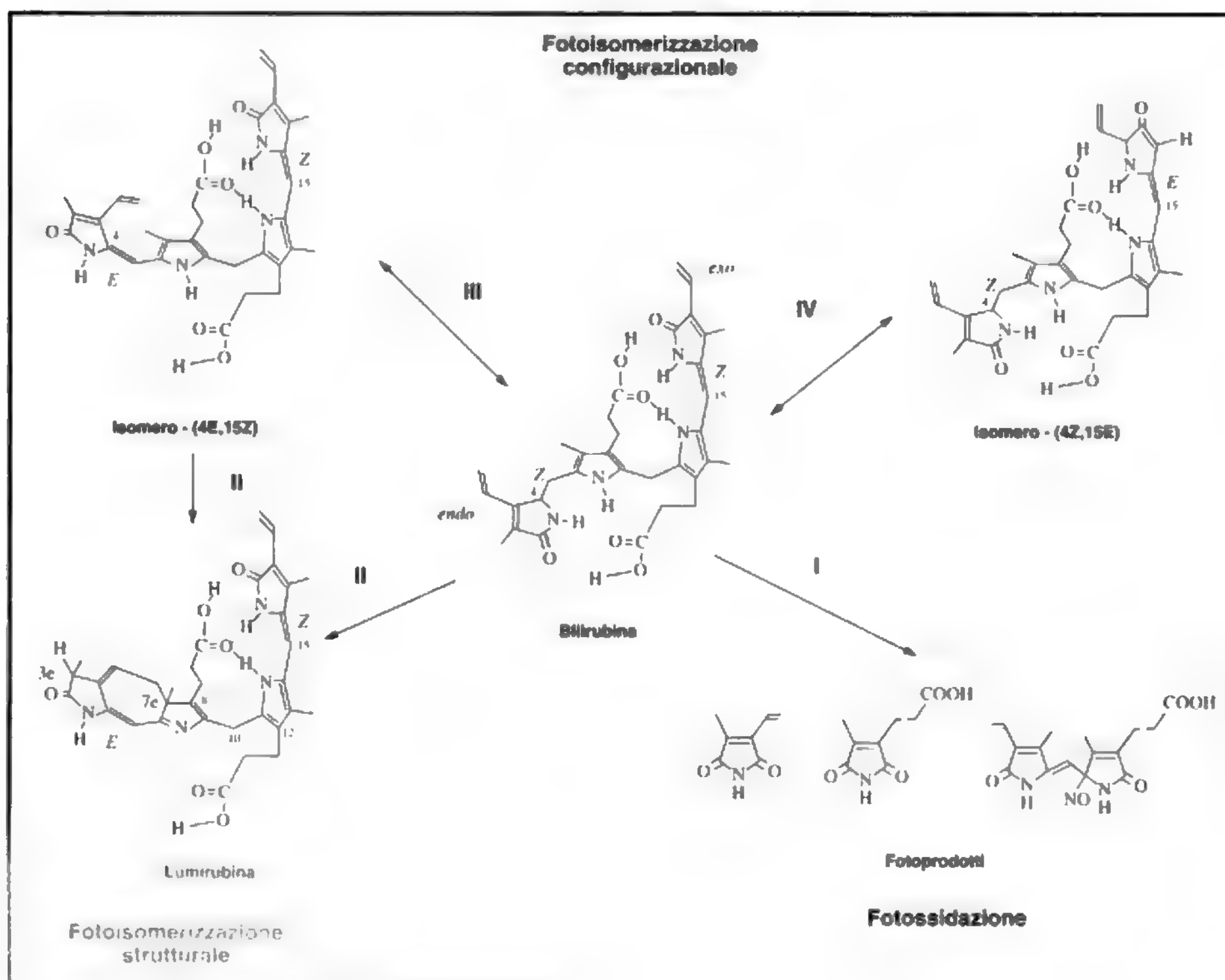


Fig. 1. Fotodegradazione della bilirubina.

FT sono stati utilizzati vari tipi di sorgente luminosa, ma la lunghezza d'onda ottimale (massima efficacia e minimi effetti collaterali) non è stata ancora determinata. Fino a tempi molto recenti le lampade emittenti luce blu, a banda stretta e picco intorno a 446 nm, coincidente col picco di assorbimento della BR legata all'albumina (valori ottenuti *in vitro*), sono state considerate le più efficienti nel ridurre le concentrazioni plasmatiche della BR. Il loro uso è però associato ad effetti collaterali sul neonato e sul personale di assistenza. Con l'intento di ottimizzare la FT, è stata valutata l'efficacia di diverse bande spettrali ritenute più sicure della luce blu, studiando il processo di fotolisi della BR *in vitro* con l'impiego di una sorgente di luce monocromatica emessa da un laser ad argon. Inaspettatamente è stato constatato che anche la 'riga' verde (514 nm: quasi fuori dallo spettro di assorbimento della BR) era in grado di determinare una sensibile fotolisi della molecola. Queste esperienze sono state la logica premessa per l'utilizzazione di lampade emittenti luce verde nella terapia dell'iperbilirubinemia neonatale. I risultati clinici ottenuti sono stati superiori alle aspettative: migliori di quelli ottenuti con luce bianca e paragonabili a quelli con luce blu. L'inaspettata efficacia della luce verde, anche dopo eliminazione delle bande spettrali inferiori ai 500 nm, può essere in parte spiegata dalla dimostrazione che il processo di isomerizzazione strutturale è correlato con la lunghezza d'onda della luce impiegata e che la sua resa quantica è più elevata per lunghezze d'onda superiori a 500 nm (picco 510 nm). Anche gli studi sulle proprietà ottiche della cute umana e sullo spettro di assorbimento della BR *in vivo* hanno fornito contributi importanti alla comprensione del fenomeno.

La «green light» ha in definitiva avuto il merito di aprire un dibattito su consolidati principi di fotobiologia, mettendo in discussione dati ottenuti *in vitro* e su animali da esperimento, ma mai verificati sull'uomo. Questi principi hanno portato a conclusioni non scientificamente corrette e su di esse si basano tuttora protocolli terapeutici che dovranno essere rivisti.

Pragmaticamente, qualsiasi tipo di lampada con una buona emissione tra 420 e 530 nm è in grado di raggiungere l'obiettivo terapeutico: la riduzione dei livelli ematici della BR. Ma per definire quale sia la lampada ottimale per la FT è necessario un nuovo approccio che tenga conto delle seguenti considerazioni: a) il grado di riduzione dei livelli di BR plasmatica non può essere utilizzato come unico parametro per definire l'efficacia di una fonte luminosa, dato che riflette solo una parte dell'intero processo fotobiologico; b) è di fondamentale importanza stabilire il grado di tossicità *in vivo* di ciascun fotoisomero.

La lunghezza d'onda ottimale per la FT dell'ittero neonatale sarà quella che consente di ottenere, a partire dalla BR nativa, neurotossica, la formazione di fotocataboliti a bassa o nulla tossicità, nel tempo più breve e nelle concentrazioni maggiori. Sulla base di questi studi è stata recentemente sviluppata una nuova lampada per la FT dell'iperbilirubinemia neonatale con banda spettrale di emissione nel blu-verde. La validazione clinica, attualmente in corso presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Firenze, Sezione di Terapia Intensiva Neonatale, sta fornendo tempi di decremento della BR metà di quelli della *special blue*.

Posologia. - Studi clinici condotti sul ritmo di somministrazione della luce hanno fornito risultati contrastanti. Mentre alcuni AA. hanno ottenuto risultati migliori con la FT continua, altri hanno notato che un'utilizzazione intermittente della luce offre risultati altrettanto efficaci. Il dibattito è aperto: le risposte tardano a venire. Il problema non viene affrontato nell'unico corretto approccio,



Fig. 2. Fototerapia convenzionale di un neonato posto in incubatrice.

vale a dire la valutazione quantitativa e qualitativa della produzione di fotoisomeri con FT continua rispetto a quella con FT intermittente.

Effetti collaterali. - Ne sono stati ipotizzati numerosi: danno retinico, alterazioni cutanee, influenza sull'accrescimento, squilibri endocrinologici, maggior incidenza di pervietà del dotto di Botallo etc. Nessuno di questi ha mai trovato conferme nei *follow-up* dei bambini in precedenza sottoposti a FT. Praticamente, la perdita insensibile di acqua, con le conseguenti alterazioni idroelettrolitiche e termiche, è l'unico effetto collaterale che deve essere attentamente preso in considerazione.

La FT può causare disturbi relazionali genitori-neonato: nella nostra esperienza, è una pratica assistenziale che suscita emozioni negative nei genitori, anche quando il figlio è sottoposto ad altre ben più invasive terapie (supporto ventilatorio, nutrizione parenterale, etc.). L'immagine del figlio bendato, avvolto dalla luce (fig. 2), emessa da un'apparecchiatura che sovrasta l'incubatrice, evidentemente evoca fantasie cariche di preoccupazione.

Tossicità. - Molte ricerche *in vitro* e su animali da esperimento hanno messo in evidenza come le radiazioni luminose, specie quelle nella regione violetto-blu dello spettro, possono essere mutagene. Queste come altre simili ricerche, non hanno mai trovato conferme nell'uomo.

In definitiva la luce deve essere considerato un «farmaco» efficace, sicuro, economico.

Nuove fototecnologie

Recentemente è stata introdotta una nuova metodica per la FT dell'ittero neonatale basata sulla somministrazione della radiazione ottica mediante fibre ottiche (FT a fibre ottiche).

La fibra ottica è un sottile filo di materiale dielettrico (quarzo, vetro, plastica, per la trasmissione nel visibile) su cui è possibile focalizzare la radiazione luminosa di una lampada, in modo da propagare a distanza la radiazione. In pratica viene visualizzato un raggio luminoso che si propaga «per riflessione totale» lungo una fibra ottica dritta immersa in aria. Secondo leggi dell'ottica geometrica un raggio luminoso che, propagandosi da un mezzo ad indice di rifrazione minore ad un mezzo ad indice di rifrazione maggiore (quarzo/aria), incide all'interfaccia fra i due mezzi con un angolo maggiore di un angolo cosiddetto «limite» o «critico», determina la riflessione totale della radiazione luminosa. Sfruttando tali principi è possibile trasportare la «luce» da una sorgente luminosa e utilizzarla, quindi, a distanza. La tecnologia delle fibre ottiche ha offerto recentemente la possibilità di realizzare dei pannelli irradianti, in cui le fibre sono state opportunamente tessute, curve e intrecciate in modo che la luce fuoriesca con una distribuzione il più omogenea possibile. Opportune micro o macrocurvature possono avere effetto sulla propagazione della radiazione luminosa; a livello delle curvature si determina una variazione dell'angolo di incidenza dei raggi luminosi propagantisi per riflessione totale con formazione di radiazione rifratta che fuoriesce dalla fibra. L'impiego di opportuni filtri ottici interposti fra la sorgente di luce e i «terminali» delle fibre permette, poi, di inviare ai pannelli irradianti solo la parte di radiazione spettralmente efficace per la terapia, riducendo così al massimo il carico termico ed i potenziali effetti collaterali prodotti dalla componente a lunghezza d'onda più corta.

La sorgente ottica consiste in una lampada alogena in quarzo da 150 W; filtri per ultravioletto e infrarosso riducono le componenti spettrali tossiche e caloriche nelle bande spettrali 200-370 nm e 590-1100 nm al di sotto dell'1%. La banda spettrale emessa dall'illuminatore è: 400-550 nm. Le fibre ottiche, che convogliano la radiazione luminosa al pannello, sono raccolte in un mazzetto cilindrico, di lunghezza di 150 cm, che ha l'estremità inserita in un terminale metallico, da innestare in un'apposita presa d'ingresso sull'apparecchio. Una volta posizionata, sulla superficie del mazzetto viene focalizzata la radiazione della lampada che, tramite le fibre ottiche, fuoriesce dal pannello irradiante di dimensioni 10×15 cm, collocato direttamente sul dorso o sul torace del neonato. La densità massima di potenza al centro dell'illuminatore è risultata essere di $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. La densità di potenza nell'intervallo spettrale blu-verde è risultata essere poco meno di $7 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. L'illuminazione non è uniforme su tutta la superficie dell'illuminatore, e varia di circa il 30% dal centro ai bordi.

Nonostante il minor rendimento attualmente dimostrato rispetto alla FT con lampade fluorescenti, la FT a fibre ottiche si presenta promettente e appare sinergizzare le più moderne tecnologie in tema di fibre ottiche, di sistemi di estrazione della luce e di sorgenti luminose, per ottenere un sistema fototerapico moderno, efficace e meno «stressante» per il neonato e per i genitori.

Il minor rendimento fototerapico della «copertina» a fibre ottiche è verosimilmente correlato con la notevole limitatezza della superficie irradiante del pannello a fibre, con cui si può coprire solo il torace o il dorso del paziente, lasciando scoperti gli arti e soprattutto la testa, riducendo così di circa 2/3 la superficie illuminata rispetto alla FT a lampade fluorescenti. Nel caso di due neonati di peso estremamente basso (490 g e 510 g rispettivamente) trattati con *Biliblanket*, la copertina aderiva completamente a tutta la cute: il decremento della BR nelle prime 24 h è risultato in questi casi sovrapponibile a quello ottenibile con la FT tradizionale.

Il riuscire, inoltre, a selezionare mediante opportuni filtri ottici una stretta zona spettrale coincidente con quella più efficace nel formare la LR (luminubina) *in vivo*, la «blu-verde» secondo le più recenti teorie, senza, però, ridurre la quantità di irradiazione totale costituirebbe un'ulteriore potenziamento del rendimento fototerapico della FT a fibre ottiche.

La copertina per FT ha mostrato notevoli vantaggi pratici: a) trasmette direttamente sulla cute del neonato luce «fredda», priva cioè delle componenti spettrali più

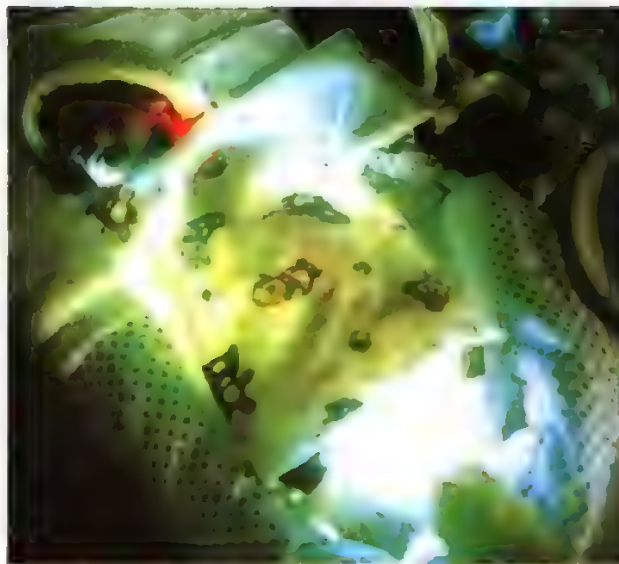


Fig. 3. Fototerapia con fibre ottiche, durante la quale è superfluo l'uso di mascherina per la protezione degli occhi del neonato.

spondenti all'infrarosso; b) la possibilità di porre la sorgente di luce a distanza fa sì che il microclima (temperatura e umidità interna) dell'incubatrice non venga influenzato.



Fig. 4. La fototerapia con fibre ottiche consente di non sospendere il lattinamento durante l'allattamento del neonato.

evitando in tal modo l'effetto indesiderato della FT tradizionale, cioè l'incremento delle perdite insensibili di acqua; c) la radiazione luminosa raggiunge direttamente le zone cutanee da irraggiare, escludendo la possibilità di potenziale danno retinico e rendendo superfluo l'uso di mascherine per la protezione degli occhi (fig. 3); d) il neonato può durante il trattamento mantenere la postura più adeguata alle sue esigenze, senza dover giacere nudo, supino e bendato come nella FT tradizionale, e può essere contenuto o allattato dalla propria madre senza interrompere la FT (fig. 4); e) sono evitati i fastidiosi disturbi, quali cefalea e nausea, nel personale che accudisce il neonato. Tali vantaggi insieme con la possibilità di aumentare sensibilmente il rendimento fototerapico della copertina con interventi relativamente semplici, primo fra tutti l'aumento delle dimensioni del pannello radiante, fanno della FT a fibre ottiche un'interessante alternativa alla FT tradizionale di consigliabile impiego nei reparti di patologia neonatale.

Quale futuro per la fototerapia?

Recentemente alcuni AA. si sono chiesti se, questa misteriosa sostanza che è la BR, oltre agli evidenti effetti tossici, non avesse un possibile ruolo fisiologico nell'organismo umano. Se così fosse, dovremmo temere, in un certo senso, anche la tanto terapeuticamente agognata riduzione della bilirubinemia. In realtà le proprietà fisiologiche dei cosiddetti pigmenti biliari, cui la BR appartiene, non sono stati ancora sufficientemente esplorati nell'uomo (nelle piante e negli invertebrati tali pigmenti hanno, invece, un'importante ruolo biologico). Ciò che questi AA. fanno notare in difesa del ruolo della BR è, per esempio, la contraddizione fra la supposta inutilità di questa molecola e il suo così complesso percorso metabolico: la conversione dell'eme a biliverdina ad opera dell'eme-ossigenasi avviene sempre per rottura solo di uno dei quattro ponti metinici a disposizione, quello in posizione alfa. Perché tanta precisione nel rompere l'anello dell'eme se l'unico fine è la sua distruzione ed escrezione? Inoltre non basterebbe la formazione di un prodotto non tossico e facilmente eliminabile come la biliverdina? L'ulteriore trasformazione di questa in BR è un passaggio che appare non necessario ed energeticamente dispendioso. Non sembra neanche che la ragione dell'evoluzione dell'enzima biliverdina-reduttasi sia stata la impermeabilità della placenta per la biliverdina, in quanto la BR è stata ritrovata anche nei mammiferi privi di placenta. Non bisogna dimenticare che l'iperbilirubinemia è una condizione fisiologica nel periodo neonatale: forse la combinazione di un'aumentata produzione di BR con una sua non ancora efficiente escrezione nel neonato potrebbe non essere casuale, ma anzi vantaggiosa.

Recenti studi hanno ripreso l'idea, espressa già 35 anni fa, di considerare la BR come un elemento facente parte del gruppo degli antiossidanti endogeni, cioè enzimi o molecole non enzimatiche in grado di neutralizzare sostanze altamente reattive come i radicali liberi dell'ossigeno. È stato visto che l'eme-ossigenasi, l'enzima che porta alla formazione della BR, fa parte di un particolare gruppo di proteine la cui sintesi aumenta in risposta a vari tipi di stress, incluso quello ossidativo. Studi *in vitro* suggeriscono che la BR abbia, *in vivo*, un ruolo nel prevenire il danno ossidativo delle membrane biologiche, specialmente nel periodo neonatale precoce, quando maggiore può essere l'insidia di stress ossidativi e minori i sistemi antiossidativi. Questa nuova corrente di pensiero «escatologica» attribuisce all'ittero fisiologico un ruolo significativo assegnando alla presenza della BR nei primi giorni di vita del neonato il ruolo finalistico di azione antiossidante, di «scavenger» dei radicali liberi dell'ossigeno (V. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA

DA [v.; v.*]), praticamente di fattore protettivo nei confronti della retinopatia del pretermine e della broncodisplasia. Un ritorno a Condie con la differenza che la sua sentenza viene ad essere modificata in: «*icterus neonatorum seems to be an affection of relevant importance*». L'immagine è suggestiva e darebbe ragione a chi ritiene che la natura non fa le «cose a caso», ed in questa occasione il termine di ittero fisiologico sarebbe pertinente, perché livelli moderatamente elevati di BR nel neonato sano non sarebbero da considerare come un evento di transitoria disfunzione ma come funzionali per la tutela della salute del neonato. Certo che, se quanto recentemente affermato trovasse adeguate conferme, ciò comporterebbe un mutamento di attitudini consolidate nel tempo. Ancora una volta, anche sulla base di queste considerazioni, ci sembra opportuno sottolineare come sia più corretto parlare di terapia del neonato con ittero e non tanto di ittero del neonato perché non sono le concentrazioni di BR nel sangue a segnare il confine tra fisiologia e patologia, ma le condizioni globali di salute del neonato.

Al di là di ogni considerazione, resta comunque da approfondire quanto la prospettata attività antiossidante della BR sia clinicamente significativa. In definitiva si prospetta per la FT dell'ittero neonatale un futuro più «certo» perché supportato da una maggiore rigorosità scientifica nel suo impiego secondo linee guida più personalizzate per ogni singolo neonato.

Bibliografia

- Agati G., Fusi F., Donzelli G. P., Pratesi R., *J. Photochem. Photobiol.*, 1993, **18**, 197-203.
 Condie D. F., *A practical Treatise on the Diseases of Children*, 1854, Blanchard and Lea, Philadelphia.
 Cremer R. J., Perryman P. W., Richards D. H., *Lancet*, 1958, **1**, 1094.
 Donzelli G. P., *Long-wavelength phototherapy*, in Douglas R. H., Moan S., Dall'Acqua F. eds., *Light in Biology and Medicine*, 1988, Plenum Press, New York, vol. 1, p. 161.
 Donzelli G. P., *J. Photochemistry and Photobiology*, 1989, **4**, 126.
 Donzelli G. P., Migliorini M. G., Sbrana G., Pratesi R. et al., *Laser-oriented search of the optimum light phototherapy*, in Rubaltelli F., Iori G. eds., *Neonatal Jaundice*, 1984, Plenum Press, New York, p. 187.
 Donzelli G. P., Moroni M., Pratesi S., Rapisardi G., Agati G., Fusi F., *Fiberoptic Phototherapy in the Management of Jaundice in Low Birthweight Neonates*, *Acta Paediatr.*, 1996, **85**, 366-370.
 Donzelli G. P., Pratesi S., Rapisardi R. et al., *Lancet*, 1995, **346**, 184-185.
 Ennever J. F., *Phototherapy in a new light*, in *Pediatric Clinics of North America*, 1986, **33**, 603.
 Lucey J. F., *Pediatrics*, 1982, **69**, 381.
 Malsels M. J., Gifford K., Antle C. E., Leib G. R., *Pediatrics*, 1988, **81**, 505.
 McDonagh A. F., Lightner D. A., *Pediatrics*, 1985, **75**, 443.
 Morgagni G. B., *De Sedibus et Causis Morborum*, 1761, Epistol. 48, art. 60.
 Pratesi R., *Photobiology and Photobiophysics*, 1987, suppl. 57.
 Pratesi R., Agati G., Cecchi G., Fusi F., *Il Nuovo Cimento*, 1984, **3**, 1075.
 Pratesi R., Ronchi L., Cecchi G., Sbrana G., Migliorini M. G., Donzelli G. P., Vecchi C., *Photochem. Photobiol.*, 1984, **40**, 77.
 Sbrana G., Donzelli G. P., Vecchi C., *Pediatrics*, 1987, **80**, 395.
 Sbrana G., Migliorini M. G., Donzelli G. P., Vecchi C., *Pediatr. Res.*, 1981, **15**, 1517.
 Tan K. L., *J. Pediatr.*, 1988, **114**, 132.
 Underwood M. A., *Treatise on the Diseases of Children*, 1784, London.
 Vecchi C., Donzelli G. P., *Riv. Ital. Ped.*, 1987, **13**, 583.
 Vecchi C., Donzelli G. P., Sbrana G., Migliorini M. G., *Pediatr. Res.*, 1983, **17**, 461.
 Vecchi C., Donzelli G. P., Sbrana G., Migliorini M. G., Pratesi R., *Lancet*, 1982, **1**, 390.
 Vecchi C., Donzelli G. P., Sbrana G., Migliorini M. G., Pratesi R., *Med. Biol. Env.*, 1983, **11**, 501.
 Vecchi C., Donzelli G. P., Sbrana G., Pratesi R., *J. Pediatr.*, 1986, **108**, 452.
 Yllpo A., *Zeitschr. f. Kinderh.*, 1913.

GIAN PAOLO DONZELLI E SIMONE PRATESI

EMERGENZE CARDIOLOGICHE NEONATALI

SOMMARIO

Emergenze cardiologiche mediche (col. 3935): *Pervietà del dotto arterioso*. - *Iperensione polmonare persistente*. - *Ischemia miocardica transitoria*. - *Emergenze aritmiche neonatali*. - **Cardiopatie congenite a emergenza chirurgica neonatale** (col. 3941).

Emergenze cardiologiche mediche

Negli anni più recenti, per l'aumento delle gravidanze «a rischio» e delle nascite estremamente pretermine, alle cardiopatie congenite che necessitano di correzione o palliazione chirurgica (o con tecniche interventistiche) subito dopo la nascita, si sono affiancate nuove «urgenze cardiologiche» neonatali (Figini *et al.*, 1990).

Si tratta di condizioni patologiche non irrilevanti dal punto di vista numerico: è stato calcolato che in Italia si verificano ogni anno 8000 nuovi casi di sindrome da pervietà del dotto arterioso nel prematuro, e il numero è destinato ad aumentare con il miglioramento dell'assistenza intensiva, e l'aumentata sopravvivenza di neonati di peso molto basso. In questo gruppo di urgenze neonatali che potremmo definire «di interesse medico», i quadri di più frequente riscontro sono, oltre alla pervietà del dotto arterioso, la ipertensione polmonare persistente e la cosiddetta «ischemia miocardica transitoria».

Un problema a parte è rappresentato dalle aritmie, che possono richiedere un intervento in epoca neonatale soprattutto per l'insorgenza di scompenso cardiaco.

Pervietà del dotto arterioso

Nel neonato a termine il dotto arterioso pervio è solitamente ben tollerato: si tratta infatti quasi sempre di dotti piccoli, con *shunt* quindi modesto sul piano emodinamico. Anche nei rari casi nei quali il dotto è ampio, si determina un aumento delle pressioni e delle resistenze vascolari polmonari, con conseguente riduzione dello *shunt* transduttale.

La pervietà del dotto può viceversa rappresentare un'urgenza cardiologica nei neonati di peso molto basso e bassa età gestazionale, nei quali è generalmente presente una malattia polmonare severa (Shimada *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994). Le arteriole polmonari del prematuro sono infatti scarsamente muscolarizzate e permettono un ampio *shunt* attraverso il dotto; lo *shunt* sinistro-destro diventa significativo nella fase di miglioramento della pneumopatia (e quindi di riduzione delle resistenze vascolari polmonari), obbliga la continuazione della ventilazione meccanica e aumenta quindi il rischio di broncodisplasia.

L'Eco Color Doppler cardiaco rappresenta il mezzo diagnostico fondamentale sia per l'identificazione del dotto e la valutazione del calibro, sia per la precisazione del tempo opportuno per la chiusura farmacologica, che corrisponde al momento in cui aumenta la velocità dello *shunt* sinistro-destro (per la caduta delle resistenze vascolari polmonari), prima quindi che compaiano i classici segni radiologici e clinici di iperafflusso polmonare e/o scompenso cardiaco (Milanesi, 1989) (fig. 5). V. ECOCARDIOGRAFIA*; ECOGRAFIA**.

La terapia medica si basa prima di tutto sulla restrizione idrica e l'uso dei diuretici; negli ultimi 20 anni è entrato nella pratica clinica l'uso della *indometacina*, un antagonista delle prostaglandine, per la chiusura farmacologica del dotto. La percentuale di successo varia nei diversi studi riportati, e sembra dipendere soprattutto dall'età del neonato (essendo più efficace, ma non prima della 32ª settimana di gestazione). L'effetto collaterale più frequente è rappresentato da una insufficienza renale — talmente transitoria. Alcuni AA. hanno addirittura proposto di imple-



Fig. 5. Eco Color Doppler cardiaco, sezione asse corto parasternale a livello dei grossi vasi. In arancione (in avvicinamento) è rappresentato il jet da *shunt* sinistro-destro attraverso il dotto arterioso. AO) aorta; AP) arteria polmonare.

gare l'indometacina a scopo profilattico in tutti i neonati prematuri. È tuttavia necessario ricordare che gli effetti del farmaco non sono circoscritti a livello del dotto. Con esame Eco-Doppler dei vasi transcranici è stata documentata in particolare una riduzione del flusso cerebrale, probabilmente per vasocostrizione dei vasi cerebrali. Più recentemente per la chiusura farmacologica del dotto è stato impiegato l'ibuprofene, che sembra ottenere risultati analoghi all'indometacina con minori effetti collaterali.

La terapia chirurgica consiste nel prematuro non nella sezione ma nella legatura del dotto, o nell'applicazione di una *clip* metallica, se possibile «in culla», limitando così i rischi per il piccolo paziente; è da riservare ai casi nei quali l'uso dell'indometacina è controindicato (per insufficienza renale, piastrinopenia, diatesi emorragica o enterocolite necrotizzante), quando la terapia non è stata efficace, o infine quando uno scompenso cardiaco severo non consenta di attendere il tempo di azione del farmaco (circa 24 ore).

Iperensione polmonare persistente

La Iperensione Polmonare Persistente del Neonato (IPPN) risulta dalla mancanza di una corretta transizione dalla circolazione fetale alla circolazione polmonare extrauterina, ed è caratterizzata dalla persistenza di pressioni polmonari sistemiche o sovrastemiche, con *shunt* destro-sinistro attraverso i cosiddetti «circuiti fetali» (forame ovale e dotto arterioso). Rappresenta un evento grave, a prognosi non raramente infausta se non tempestivamente riconosciuta. L'incidenza di IPPN non è ben definita; i valori riportati in letteratura presentano una ampia variabilità, in relazione ai criteri definiti per la diagnosi e al tipo di popolazione esaminata: è infatti rara nella popolazione generale dei neonati, ma rappresenta una delle più frequenti e temibili emergenze cardiologiche neonatali nei centri di Terapia Intensiva Neonatale, dove le percentuali riportate oscillano dal 2% fino al 9% dei ricoveri totali (Long, 1990).

Il cardiologo è chiamato soprattutto a discriminare la IPPN da quadri clinicamente simili — secondari a cardiopatie congenite cianogene — nei quali l'approccio terapeutico sarà completamente diverso.

Nella fase diagnostica la ecocardiografia Color Doppler appare anche qui fondamentale, consentendo di escludere una cardiopatia strutturale, di evidenziare l'alterata geome-



Fig. 6. Iperensione polmonare persistente del neonato all'eco Color Doppler cardiaco. A sinistra: sezione «4 camere» subcostale: il setto interatriale appare convesso dal lato sinistro (ipertensione atriale destra). A destra: stessa sezione, con Color Doppler si evidenzia (in blu) shunt destro-sinistro attraverso il forame ovale. AD) atrio destro; AS) atrio sinistro; VD) ventricolo destro; VS) ventricolo sinistro.

tria delle camere cardiache (con il setto interventricolare e interatriale convessi a sinistra, per l'ipertensione destra) (fig. 6, a sinistra) e lo shunt destro-sinistro a livello del dotto arterioso e/o del forame ovale (fig. 6, a destra).

La IPPN non è una entità morbosa singola, ma piuttosto la via finale comune di processi fisiopatologici diversi. A rare forme «idiopatiche» (per le quali in ambito neonatologico è spesso impiegato il vecchio termine di «persistenza della circolazione fetale») si affiancano, molto più numerose, le forme secondarie ad un'ampia varietà di patologie, in particolare polmonari e metaboliche, che vanno dalla sofferenza asfittica perinatale alle condizioni di riduzione dell'ampiezza del letto vascolare polmonare per agenesia di un lobo, o per ernia diaframmatica congenita. Le classificazioni proposte (Rudolph, 1980; Geggel e Reid, 1984) concordano nel distinguere forme in cui prevalgono alterazioni «funzionali» del letto vascolare polmonare, da quadri nei quali le alterazioni sono fondamentalmente «anatomiche». La prognosi appare generalmente favorevole nelle prime (con normale sviluppo dei vasi polmonari alla nascita), caratterizzate da una vasocostrizione, per lo più reattiva all'ipossia; un esempio è la IPPN secondaria a severa asfissia perinatale, ma anche forme secondarie a malattie respiratorie. L'ipossia acuta e cronica, durante la vita intrauterina o in epoca perinatale, è in grado di impedire la fisiologica caduta delle resistenze vascolari polmonari, e di determinare alterazioni strutturali dei vasi polmonari (Rabinovitch, 1989). Il grado di sviluppo raggiunto dal letto vascolare polmonare è fondamentale nel determinare la risposta allo stimolo ipossico, non solo in termini di severità dell'ipertensione polmonare, ma anche per le potenzialità di sviluppo e «rimodellamento» dopo la rimozione dello stimolo, ed è tanto più grave quanto più è precoce.

Rabinovitch e coll. hanno dimostrato che ratti esposti all'ipossia durante il periodo della maturazione polmonare presentano successivamente, dopo vari mesi in aria ambiente, una ipertensione polmonare residua, secondaria a modificazioni strutturali probabilmente irreversibili.

I neonati con IPPN sono molto instabili, e la prima regola è quindi l'essere meno aggressivi possibile (Long, 1990). Al momento inoltre non vi è un consenso generale sul metodo migliore di trattamento; l'approccio è piuttosto guidato dall'esperienza personale, e non esistono in letteratura studi che documentino in modo inequivocabile la

superiorità di un determinato tipo di terapia (Sahni *et al.*, 1994). Infine occorre ricordare che la IPPN è associata a malattie di base molto diverse, che condizionano in ultima analisi le scelte terapeutiche.

Lo spettro terapeutico comprende la ventilazione meccanica, l'uso di farmaci vasodilatatori e, più recentemente, l'impegno dell'ossido nitrico e della circolazione extracorporea a membrana (ECMO: *Extracorporeal Membrane Lung Oxygenation*; v. OSSIGENAZIONE EXTRACORPOREA*). I farmaci vasodilatatori più impiegati, sulla base delle segnalazioni della letteratura, sono clorpromazina, tolazolina e prostaciclina (PGE_1). Lo svantaggio comune a queste sostanze è la non-specificità per il circolo polmonare, e quindi il grado più o meno marcato di riduzione della pressione sistemica.

Più recentemente è stata proposta la terapia inalatoria con bassi dosaggi di ossido nitrico, che ha un effetto vasodilatatore a livello polmonare, da tempo ben conosciuto negli adulti e negli animali, e i primi risultati suggeriscono che possa avere un ruolo importante nel trattamento dei neonati con IPPN (Roberts *et al.*, 1992).

L'ECMO rappresenta l'ultima possibilità terapeutica, per neonati che sembrano destinati a morire per scompenso respiratorio; l'obiettivo è mettere per alcuni giorni «in riposo» il polmone, che dovrebbe così recuperare una funzione sufficiente, tale da consentire la successiva rimozione dell'ECMO stessa. Si tratta di una terapia relativamente complessa, e di costo molto elevato; nonostante questo, l'impiego si va rapidamente diffondendo nei centri di Terapia Intensiva Neonatale, limitatamente a neonati con IPPN resistenti ai comuni presidi terapeutici.

Ischemia miocardica transitoria

Il termine «ischemia miocardica transitoria» è stato proposto per la prima volta da Rowe e Hoffmann, nel 1972, per descrivere le forme di sofferenza miocardica secondaria a ipossia, che generalmente vanno incontro a regressione nei primi giorni di vita. Nell'anamnesi vi è generalmente una asfissia perinatale e/o una sofferenza intrauterina: in queste situazioni l'ipossia predispone al metabolismo anaerobio e all'acidosi metabolica (che di per sé condiziona negativamente l'efficienza contrattile); la deplezione di glicogeno miocardico, eventualmente aggravata in condizioni di ipoglicemia, è particolarmente temibile per il metabolismo del muscolo cardiaco, strettamente glicoso-dipendente; infine

la stessa ipertensione polmonare persistente, secondaria essa stessa alla ipossia, può determinare un *mismatch* fra le necessità e l'apporto di ossigeno al ventricolo destro.

L'esordio è molto variabile; inoltre i segni clinici più frequenti (tachipnea, tachicardia, *distress* respiratorio, spesso soffio sistolico da rigurgito delle valvole atrio-ventricolari) non sono di per sé diagnostici. L'ECG è generalmente patologico, e presenta segni di ischemia subendocardica (sottoslivellamento del tratto S-T, appiattimento o inversione dell'onda T) (Farru *et al.*, 1986). La valutazione con Ecocardiografia Color Doppler permette anche in questo caso di documentare l'ipocinesia parietale, generalmente diffusa, e la ridotta funzione sistolica ventricolare, e insieme di escludere una cardiopatia congenita o un'origine anomala della coronaria sinistra quale causa dello scompenso cardiaco.

Nei bambini deceduti l'esame istologico del miocardio riscontra costantemente una necrosi disseminata delle fibre miocardiche della regione subendocardica. L'ischemia-necrosi coinvolge spesso anche i muscoli papillari della valvola tricuspidale, il che ne giustifica l'insufficienza in fase sistolica.

La diagnosi si basa in questi casi sui segni clinici e strumentali, ma anche su un'attenta anamnesi perinatale, ed appare in particolare necessaria l'attenta sorveglianza delle gravidanze e dei parti ad alto rischio.

La risoluzione è generalmente spontanea entro i primi giorni di vita. In alcuni casi può essere necessaria una terapia farmacologica dello scompenso: digitale, diuretici ed ACE-inibitori sono, come per l'adulto, i farmaci di uso più frequente.

Il miglioramento clinico precede la normalizzazione dell'ECG, che avviene di solito entro qualche settimana o qualche mese. Studi scintigrafici di perfusione miocardica (Tallio 201) hanno documentato in qualche caso difetti residui di perfusione a distanza, di incerto significato clinico e prognostico.

Emergenze aritmiche neonatali

Le urgenze aritmiche rappresentano eventi relativamente rari in epoca neonatale; in questi casi, d'altra parte, la diagnosi precoce ed un trattamento adeguato sono premesse fondamentali ai fini prognostici (Kachaner e Batisse, 1987).

Negli anni più recenti, si è verificato un crescente interesse per i problemi aritmici da parte dei neonatologi e dei cardiologi pediatri; uno dei motivi è senz'altro la diffusione della Ecocardiografia fetale e del monitoraggio elettrocardiografico durante la vita fetale (v. FETO*) e neonatale, che ha messo in evidenza la varietà e la frequenza dei disturbi del ritmo, in epoca sempre più precoce. Sia la modalità di presentazione delle aritmie che la farmacocinetica e farmacodinamica degli antiaritmici rivestono caratteri peculiari in questa fascia di età. Alcune turbe del ritmo possono essere sufficientemente severe da determinare uno scompenso già in utero, con scompenso anasarcatco feto-placentare; in questi casi un trattamento antiaritmico viene iniziato già durante la vita fetale.

Le *tachicardie non sinusali* mal tollerate dal neonato hanno di solito una frequenza cardiaca > 220/min, e spesso molto elevata (> 300/min); nella maggior parte dei casi la tachicardia è regolare e a complessi fini (ad origine cioè sopraventricolare).

Le *tachicardie sopraventricolari* (TSV) costituiscono la causa più frequente di *aritmia* neonatale; nel 70% dei casi sono dovute alla presenza di una via anomala, spesso occulta. Il rilievo di TSV può essere occasionale, ma più frequentemente è secondario al rilievo di pallore, tachicardia, tachipnea, fino al quadro di scompenso cardiaco.

congestizio conclamato. Una cardiopatia congenita è riscontrata solo in una minoranza dei casi (circa 10%).

Nei casi «a cuore sano» la prognosi è generalmente buona, con il ripristino del ritmo sinusale. L'approccio terapeutico inizia con le manovre fisiologiche di stimolazione vagale; nel neonato risulta particolarmente efficace il *diving reflex* (riflesso di annegamento) che consiste nel mantenere applicato sul viso del bambino un contenitore pieno di ghiaccio per 10-15 secondi, e che permette il ripristino del ritmo sinusale nel 90% dei neonati. In caso di insuccesso, il farmaco di primo impiego è l'adenosina (v.*; v.**), che interrompe l'aritmia nella gran parte dei casi di tachicardia da rientro (Domanovitz *et al.*, 1994). Il rapido metabolismo (l'emivita è circa 5 sec) esclude nella pratica effetti collaterali maggiori; l'assenza di effetto inotropo negativo ne consente l'impiego anche in neonati in scompenso. Oltre all'adenosina trova impiego l'ATP (1 mg/kg; fig. 7), che ha le stesse caratteristiche farmacologiche. Il mancato successo delle manovre vagali e della terapia con adenosina o con ATP obbliga a prendere in considerazione altri farmaci (propafenone, amiodarone), con effetti collaterali potenzialmente maggiori, o in ultima istanza la soppressione dell'aritmia con overdrive transesofageo o con shock elettrico. In assenza di terapia, le TSV tendono a recidivare frequentemente nel primo anno di vita; secondo alcuni AA., la digitale è ancora oggi il farmaco d'elezione nel trattamento cronico del neonato per la prevenzione delle recidive.

Le *tachicardie ventricolari* (TV) rappresentano viceversa una rara causa di emergenza neonatale. Nella maggior parte dei casi si tratta di forme idiopatiche. Deve essere sempre escluso uno squilibrio elettrolitico, una intossicazione digitale, un Q-T lungo congenito, una cardiopatia congenita, una cardiomiopatia e soprattutto un tumore cardiaco.

Tutte le TV del neonato tendono ad avere andamento incessante, ed esitano quindi fatalmente in scompenso cardiaco congestizio. Il ripristino del ritmo sinusale si ottiene generalmente per via farmacologica (xilocaína, procainamide, propafenone c.v.), ma se le condizioni del bambino sono molto instabili è necessario interrompere l'aritmia con cardioversione elettrica. Le forme idiopatiche rispondono generalmente bene alla terapia orale con amiodarone.

Anche *aritmie ipocinetiche* possono essere causa di scompenso neonatale. In caso di ritmo lento stabile si tratta quasi sempre di *blocchi atrio-ventricolari completi*. Sono riconosciuti quasi sempre prima della nascita, e possono essere causa di idrope fetale. L'ecocardiografia fetale (v. FETO**) consente di precisare se si tratta di un disturbo del

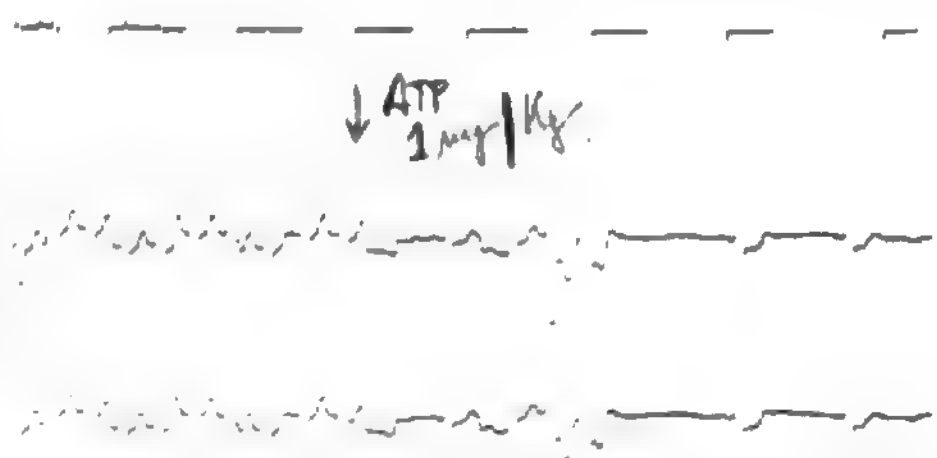


Fig. 7. Tachicardia sopraventricolare a complessi stretti. L'aritmia è interrotta dall'iniezione e.v. di ATP (1 mg/kg in bolo), nel tempo di circolo.

ritmo isolato o associato a cardiopatia congenita (discordanza atrio-ventricolare, canale atrio-ventricolare, ventricolo unico). Quando il blocco è isolato, è quasi sempre conseguenza di passaggio transplacentare di anticorpi prodotti dalla madre affetta da una malattia autoimmune conosciuta o latente. Nei casi mal tollerati alla nascita vi è indicazione all'impianto di *pacemaker*.

Cardiopatie congenite a emergenza chirurgica neonatale

L'incidenza di *cardiopatie congenite* (CC) varia, secondo i diversi studi, fra il 5% e l'8%; si può calcolare che il 30% di queste costituisca potenzialmente una urgenza in epoca neonatale.

Le profonde modificazioni cardiocircolatorie che si verificano alla nascita e nei primi mesi di vita sono in grado di conferire un carattere di «urgenza» o addirittura di «emergenza» a cardiopatie strutturali che non avevano dato segno di sé durante la vita fetale (Anderson, 1987).

La mortalità per le CC cosiddette «critiche» è calcolato in Italia intorno al 18%, sostanzialmente equiparabile a quella degli altri paesi industrializzati. Al di là del progressivo sviluppo delle tecniche chirurgiche, una ulteriore riduzione di questo tasso richiede probabilmente soprattutto un più precoce riconoscimento delle CC, mediante ecocardiografia fetale, e quindi una precoce identificazione dei neonati a rischio, la pianificazione del tempo e della sede del parto, e un più tempestivo arrivo al Centro cardiocirchirurgico.

L'approccio diagnostico alle CC è stato rivoluzionato dalla diffusione della ecocardiografia Doppler (v. ECOGRAFIA**); l'analisi ecotomografica «sequenziale» permette una accurata definizione dell'anatomia della malformazione cardiaca. L'angiografia rimane il *gold standard* soprattutto per lo studio del circolo polmonare (rami polmonari periferici) e delle arterie coronarie.

Le CC ad emergenza clinica alla nascita o nei primi giorni di vita, si presentano con due quadri clinici principali: la cianosi e lo scompenso cardio-circolatorio (tab. VII).

Le *cardiopatie che si esprimono con cianosi* in epoca neonatale sono tutte forme severe, che richiedono una rapida diagnosi e un pronto intervento terapeutico; sono rappresentate dalle malposizioni vascolari, dagli ostacoli del cuore destro (a livello polmonare e tricuspidoale), dal ritorno

venoso polmonare anomalo totale, con *shunt* destro-sinistro a livello del forame ovale e del dotto arterioso, e dal *truncus*. Un primo orientamento diagnostico si ottiene dalla radiografia del torace, che distingue casi con ridotta vascolarizzazione polmonare, e casi con vascolarizzazione normale o aumentata.

Fra le forme che si presentano con cianosi alla nascita o nei primi giorni di vita, la *trasposizione dei grossi vasi* a setto intatto (TGV) è la cardiopatia più frequente. L'incidenza è di 1:5000 nati vivi. La tollerabilità del difetto alla nascita si basa sulla persistenza dei circuiti fetali, ed in particolare della comunicazione a livello del forame ovale. La dilatazione del dotto mediante le prostaglandine migliora solo incostantemente la saturazione, in presenza di un forame ovale restrittivo. In questi casi può rendersi necessaria, per stabilizzare il bambino, la settostomia atriale con palloncino (*manovra di Rashkind*) (v. PROCEDURE CARDIOVASCOLARI PERCUTANEE PEDIATRICHE*, col. *6082). La diagnosi, già suggerita dall'esame obiettivo (cianosi, assenza di soffi all'ascoltazione cardiaca) e dalla radiografia del torace (ombra cardiaca ovoidale, con peduncolo vascolare «stretto», vascolarizzazione polmonare normale in oltre la metà dei casi) è agevole con Ecocardiografia Doppler, che documenta l'emergenza dell'aorta dal ventricolo destro e dell'arteria polmonare dal ventricolo sinistro, e permette di valutare lo *shunt* bidirezionale a livello del dotto arterioso e del forame ovale. Attualmente l'indicazione nelle TGV a setto intatto è la correzione chirurgica anatomica (*switch*), da effettuarsi nelle prime settimane di vita, quando il ventricolo sinistro è ancora idoneo a sostenere pressioni sistemiche.

Nelle cardiopatie con ostacolo a livello polmonare o tricuspidoale la vascolarizzazione è tipicamente ridotta. Queste forme possono aggravarsi improvvisamente dopo la nascita per la costrizione del dotto arterioso e si giovano in modo spettacolare del trattamento con prostaglandine (Matsuura *et al.*, 1993). In presenza di un difetto del setto interventricolare si tratta generalmente di atresia polmonare. La cianosi è spesso intensa, in assenza di soffi. La diagnosi è anche qui possibile con Ecocardiografia Doppler, ma un cateterismo cardiaco è indispensabile per studiare in modo approfondito l'albero arterioso polmonare (che è il fattore determinante ai fini della prognosi) e visualizzare eventuali collaterali sistemico-polmonari. Nelle lesioni con setto interventricolare intatto, la cianosi è secondaria allo *shunt* destro-sinistro attraverso il forame ovale. Può trattarsi di atresia polmonare, stenosi polmonare o agenesia della valvola polmonare. In quest'ultimo caso la lesione è generalmente complessa, vi è una marcata ectasia dei rami polmonari e del dotto arterioso, che determina compressione bronchiale.

Fra le anomalie della tricuspide occorre ricordare l'*atresia della tricuspide* e la *malattia di Ebstein*. In quest'ultimo caso la diagnosi è in genere facile anche prima della valutazione ecocardiografica, per il rilievo della marcata cardiomegalia. Tipico è inoltre l'ECG, caratterizzato da ipertrofia ventricolare sinistra e deviazione assiale sinistra.

Il *ritorno venoso polmonare anomalo totale* si presenta, solitamente qualche giorno dopo la nascita, con un quadro di cianosi refrattaria, e rappresenta una tipica urgenza chirurgica. L'Ecocardiografia consente la diagnosi attraverso la dimostrazione del collettore (che raccoglie le vene polmonari) che può essere seguito fino allo sbocco nel sistema cavale sopra o sottodiaframmatico.

Le *cardiopatie che si presentano con scompenso cardio-circolatorio* alla nascita sono soprattutto le ostruzioni all'efflusso ventricolare sinistro. Il quadro più severo è la *sindrome del ventricolo sinistro ipoplasico*, caratterizzata da atresia mitralica e aortica, ipoplasia dell'aorta ascendente e

TAB. VII. CARDIOPATIE CONGENITE AD EMERGENZA CLINICA NEONATALE

A) Cardiopatie cianogene

Cardiopatie con shunt destro-sinistro e ipoafflusso polmonare

- a) tetralogia di Fallot
- b) atresia polmonare con difetto del setto interventricolare
- c) atresia polmonare (o stenosi valvolare polmonare serrata) a setto intatto
- d) atresia della tricuspide + stenosi o atresia polmonare

Cardiopatie con shunt destro-sinistro e iperafflusso polmonare

- a) truncus
- b) ritorno venoso polmonare anomalo totale

Trasposizione dei grandi vasi

B) Cardiopatie con scompenso cardiocircolatorio

- a) forma «maggiore» di ipoplasia del ventricolo sinistro, con atresia mitralica e cavità ventricolare sinistra «virtuale»
- b) atresia aortica o mitralica con difetto del setto interventricolare
- c) stenosi valvolare aortica serrata
- d) coartazione aortica



Fig. 8. Ecocardiografia fetale, sezione «4 camere»: sindrome del ventricolo sinistro ipoplasico.

cavità ventricolare sinistra virtuale (fig. 8). I neonati sono asintomatici finché il dotto rimane pervio; il quadro clinico, caratterizzato da tachicardia, tachipnea, dispnea e cianosi, diviene conclamato entro i primi giorni di vita. La mortalità, in assenza di trattamento, è elevatissima e raggiunge il 95% dei casi entro il primo mese di vita.

La causa più comune di scompenso cardiaco in un bambino acianotico nella prima settimana di vita è la *coartazione aortica*. La diagnosi è già possibile valutando la riduzione di ampiezza dei polsi femorali (o la differenza fra i valori di pressione arteriosa agli arti superiori e inferiori). Meno frequentemente, lo scompenso può essere secondario a *stenosi valvolare aortica serrata*. In caso di ostacolo critico all'efflusso ventricolare sinistro, con dotto-dipendenza sistemica, l'infusione di prostaglandine stabilizza generalmente il quadro emodinamico ed è spesso utilizzata, non al fine di differire l'intervento, ma per portare il neonato in buone condizioni alla correzione chirurgica o alla valvuloplastica con palloncino.

Il ventricolo sinistro di un neonato può scompensarsi an-

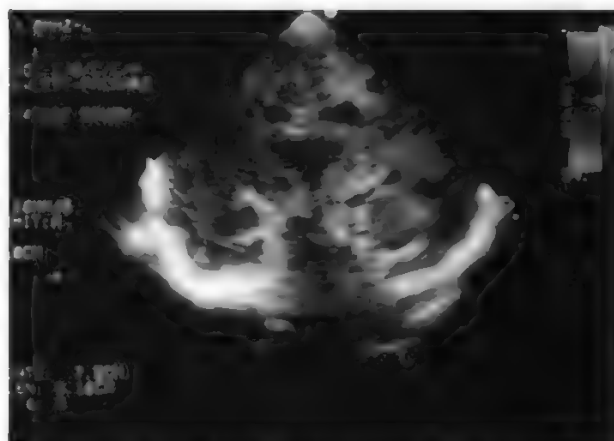


Fig. 10. Stesso caso della figura precedente, Eco Color Doppler cerebrale. Nell'emisfero di sinistra sono evidenziabili due aree eco-prive, all'interno delle quali si evidenzia un flusso bidirezionale (malformazione artero-venosa cerebrale).

che per alcune forme di *shunt* sinistro-destro, di insufficienza delle valvole aortica o mitrale o, raramente, per fistole artero-venose sistemiche. In presenza di segni di sovraccarico di volume delle sezioni sinistre, in assenza di *shunt* intracardiaci visualizzabili, occorre pensare sempre alla possibilità di malformazioni artero-venose, da ricercare nelle sedi più comuni (polmonare, epatica, cerebrale). Talvolta lo *shunt* importante attraverso la fistola condiziona la mancata caduta fisiologica delle pressioni polmonari dopo la nascita, con un quadro clinico e strumentale di ipertensione polmonare persistente (Favilli *et al.*, 1995) (figg. 9 e 10).

Una rara causa di scompenso cardiaco neonatale è infine rappresentata dall'*origine anomala delle arterie coronarie*. L'anomalia più comune è rappresentata dalla nascita della coronaria sinistra dall'arteria polmonare. Le manifestazioni cliniche si rendono evidenti con la riduzione delle resistenze polmonari. I segni elettrocardiografici possono essere progressivi, con l'evoluzione dell'ischemia-necrosi. L'esame ecocardiografico mostra abitualmente un cuore di dimensioni aumentate e ipocinetico. È spesso possibile identificare l'origine anomala dall'arteria polmonare, o comunque la partenza di una sola arteria coronaria dall'aorta, ma un cateterismo cardiaco è necessario per la completa definizione diagnostica.

Tutte le comunicazioni a livello del setto interventricolare o dei grossi vasi (che costituiscono la causa più comune di scompenso cardiaco dopo il primo mese di vita) non hanno quasi mai espressione clinica in epoca neonatale, poiché le elevate resistenze vascolari polmonari costituiscono, fin verso la fine del primo mese, un ostacolo efficace allo stabilirsi di uno *shunt* importante. Nel prematuro la scarsa muscolarizzazione delle arterie polmonari può viceversa consentire un ampio passaggio di sangue attraverso il circolo polmonare, e rendere quindi sintomatica per es. una comunicazione interventricolare ampia, analogamente a quanto già descritto per la pervietà del dotto arterioso.

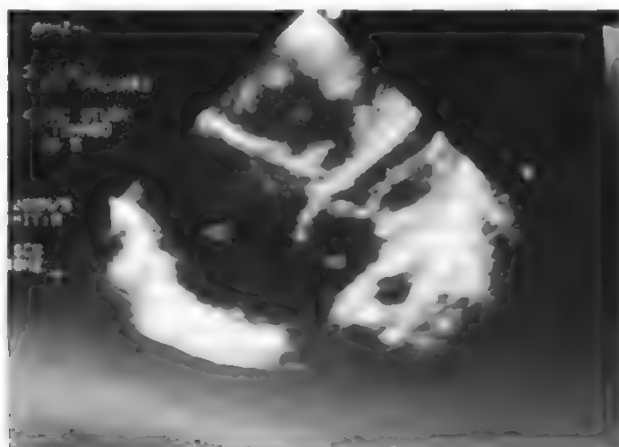


Fig. 9. Eco Color Doppler cardiaco. Si evidenzia una marcata dilatazione delle sezioni sinistre del setto interatriale e interventricolare (ipertensione polmonare). AD) atrio destro; AS) atrio sinistro; VD) ventricolo destro; VS) ventricolo sinistro.

Bibliografia

- Anderson R. H., *Pediatric Cardiology*, 1987, Churchill Livingstone.
- Domanovits H., Fiske H., Stark G., *et al.*, *Eur. Heart J.*, 1994, **15**, 589.
- Latta G., Rizzandini M., Cruzian N., *Arch. Mal. Coeur*, 1986, **79**, 633.

- Favilli S., De Simone L., Scarano E. *et al.*, *Giorn. Ital. Cardiol.*, 1995, 25, 885.
- Figini A., Austoni P., Vignati G., *Il problema delle emergenze cardiologiche neonatali*, in Rovelli F. ed., *Cardiologia 1990*, 1990, Librex, Milano.
- Gegge R. L., Reid L. M., *Clin. Perinatol.*, 1984, 11, 525.
- Kachaner J., Batisse A., *Troubles du rythme cardiaque chez l'enfant*, 1987, Doin, Paris.
- Long W. A., *Persistent pulmonary hypertension of the newborn syndrome (PPHNS)*, in Long W. A. ed., *Fetal and neonatal cardiology*, 1990, Saunders, Philadelphia.
- Matsuura H., Saji T., Yamamoto S. *et al.*, *Am. Heart J.*, 1993, 125, 1453.
- Milanesi O., *Riv. Ital. Ped.*, 1989, 15, 344.
- Rabinovitch M., *Struttura e funzione del letto vascolare polmonare: un aggiornamento*, in Friedman W. F., Talner N. S. eds., *Cardiology Clinics (ed. ital.): Recenti acquisizioni in Cardiologia Pediatrica*, 1989, McGraw-Hill Libri Italia, Milano.
- Roberts J. D., Polaner D. M., Lang P., Zapol W. M., *Lancet*, 1992, 340, 818.
- Rowe R. D., Hoffmann T., *J. Pediatr.*, 1972, 81, 24.
- Rudolph A. M., *Clin. Pediatr.*, 1980, 19, 585.
- Sahni R., Wung J. T., James L. S., *Pediatrics*, 1994, 94, 307.
- Shimada S., Kasai T., Konishi M., Fujiwara T., *J. Pediatr.*, 1994, 125, 270.
- Takahashi Y., Harada K., Ishida A. *et al.*, *Arch. Dis. Child.*, 1994, 71, 118.

SILVIA FAVILLI E ADRIANO MANETTI

NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE

Sin.: poliadenomatosi endocrine. - *t. multiple endocrine neoplasias*.

SOMMARIO

Definizione (col. 3945). - **Classificazione** (col. 3946). - **Etiopatogenesi** (col. 3946): **Fattori intrinseci: aspetti di genetica molecolare**. - **Fattori estrinseci**. - **Aspetti generali di clinica** (col. 3949): **Sindrome MEN 1**. - **Sindrome MEN 2A**. - **Sindrome MEN 2B**. - **Complicanze ed esiti**. - **Diagnosi** (col. 3951): **MEN 1**. - **MEN 2A e 2B**. - **Prognosi** (col. 3953): **MEN 1**. - **MEN 2A**. - **MEN 2B**. - **Terapia** (col. 3953): **MEN 1**. - **MEN 2A e MEN 2B**.

Definizione

Il termine di *neoplasie endocrine multiple* (MEN = Multiple Endocrine Neoplasias), o quello meno appropriato di *poliadenomatosi endocrine* (v. XII, 135-139), individua un gruppo eterogeneo di entità anatomo-cliniche caratterizzate da lesioni proliferative a tipo iperplastico, adenomatoso e/o carcinomatoso di più ghiandole endocrine non correlate fra di loro sul piano funzionale. Dal punto di vista clinico si tratta di patologie riferibili ad iperfunzione primitiva di 2 o più ghiandole endocrine. Di tali affezioni sono descritte una forma sporadica ed una, più frequente, a carattere familiare. Questa ultima forma viene trasmessa come carattere autosomico dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile.

Classificazione

La descrizione di 3 forme distinte di tali sindromi ha permesso la seguente classificazione clinica: MEN di tipo 1 (MEN 1) o *sindrome di Wermer*, MEN 2A o *sindrome di Sipple* e MEN 2B, anche descritta come MEN di tipo 3 (tab. I).

La forma di tipo 1 (MEN 1) è una patologia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da patologie iperplastiche/neoplastiche delle paratiroidi, dell'ipofisi anteriore, della componente neuro-endocrina del tratto gastroenterico e di altri tessuti endocrini (cortico-surrene, tiroide, componente cromaffine dell'albero respiratorio e del tratto gastrointestinale) e non (lipomi sia viscerali che cutanei). La sintomatologia clinica è strettamente dipendente dalle ghiandole coinvolte e dalla conseguente ipercrezione ormonale. L'ipercalcemia associata ad eccesso di ormone paratiroideo è l'anormalità biochimica più frequentemente osservata nella sindrome. L'ipersecrezione di polipeptidi pancreatici (gastrina, insulina, PP [Pancreatic Polypeptide]) può estrinsecarsi in sindromi distinte (la sindrome di Zollinger-Ellison in caso di ipergastrinemia [v. ZOLLINGER-ELLISON, SINDROME DI, XV, 2396-2399] e l'insulinoma [v., VII, 2083-2086; *4141-4144] in caso di iperinsulinismo) oppure essere individuabile solo dopo specifiche indagini ormonali. La MEN 2A condivide con la MEN 1 il solo interessamento delle paratiroidi, peraltro con minore frequenza, presentandosi invece più spesso l'associazione del carcinoma midollare della tiroide (CMT; v. TIROIDE**) con il feocromocitoma. La MEN 2B, di più recente descrizione (1966), ha in comune con la MEN 2A il CMT ed il feocromocitoma, ma si caratterizza per la presenza di neuromi mucosi multipli, *habitus* di tipo marfanoide e per l'assenza di iperparatiroidismo.

Etiopatogenesi

Numerose teorie patogenetiche sono state descritte per fornire possibili spiegazioni al fine di comprendere lo sviluppo dei tumori, endocrini e non, associati alle sindromi MEN. Sono stati considerati fattori intrinseci alle cellule endocrine, fattori estrinseci alle stesse e la cooperazione dei due moventi patogenetici come possibili cause eziologiche delle sindromi MEN.

Fattori intrinseci: aspetti di genetica molecolare

I recenti progressi della genetica molecolare (v. GENETICA, VI, 2315; *3310; GENETICA MEDICA*, *3338; GENETICA MEDICA E UMANA**, GENETICA UMANA, VI, 2395; GENOMA UMANO**, SONDE MOLECOLARI [v.*; v.**]) hanno permesso di individuare la sede del difetto in tali sindromi, fornendo solide basi interpretative della loro etiopatogenesi.

TAB. I. QUADRO RIASSUNTIVO DELLE MANIFESTAZIONI CLINICHE DELLE NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE

	MEN 1	MEN 2A	MEN 2B o MEN 3
Lesioni «tipiche»	Iperparatiroidismo Tumori adeno-ipofisari Tumori neuro-endocrini del tratto gastro-enterico	CMT Feocromocitoma Iperparatiroidismo	CMT Feocromocitoma Neuromi mucosi multipli <i>Habitus</i> marfanoide
Lesioni «atipiche»	Adenomi cortico-surrenali Iperplasia/neoplasia tiroidea Carcinoidi bronchiali/intestinali Lipomi cutanei/viscerali		

MEN 1. - Studi di *linkage* in famiglie affette hanno evidenziato che il gene *men 1* è localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma umano 11, nella regione q12-13. L'analisi del genotipo, effettuata su tessuti paratiroidi e pancreatici ottenuti da pazienti affetti dalla MEN 1 ed a livello costitutivo nei soggetti appartenenti a famiglie affette, ha dimostrato che la perdita allelica nella regione 11q13 serviva ad eliminare la copia normale («wild-type») del gene *men 1*, in accordo a quanto postulato da Knudson nel suo modello dei due eventi («two-hits»). L'applicazione di tale ipotesi è stata utile per identificare meccanismi simili in altre forme tumorali. La perdita di materiale genetico a livello del cromosoma 11 nei tumori associati alla MEN 1 viene dimostrata come perdita di eterozigotia costitutiva specificatamente *in loci* a livello 11q13 ed è presente sia nelle forme familiari che in quelle sporadiche. Tutto questo sostiene l'ipotesi che nella patogenesi dei tumori associati alla MEN 1 sia coinvolto lo smascheramento di una mutazione recessiva al *locus men 1* e che tale gene appartenga a quella famiglia dei geni onco-soppressori. La mappatura delle delezioni tumorali di due lesioni paratiroidi associate alla sindrome suggerisce come il gene *men 1* si localizzi telomericamente al *locus* PYGM, codificante una glicogeno-fosforilasi muscolare ed entro un intervallo di 5 cM (centiMorgan) tra PYGM e D11S97. Più recentemente ancora sono state descritte ricombinazioni per D11S807 e per D11S460, restringendo in tal modo la regione di interesse a 3 cM, fra PYGM e D11S460 separati da una distanza fisica inferiore a 2 Mb (Megabasi). Basandosi sulla trasmissione autosomica dominante appare chiaro come la progenie di pazienti affetti da MEN 1 abbia un rischio pari al 50% di sviluppare la sindrome. Gli individui affetti possono presentarsi con una o più delle lesioni associate alla malattia, come pure essere asintomatici per diversi decenni. Fino ad oggi era buona norma sottoporre i figli di pazienti MEN 1 ad annuali *screening* biochimici per cercare di cogliere le prime anomalie il più precocemente possibile. Comunque, dato che le patologie associate alla MEN 1 possono evolvere lentamente, i parenti non affetti a rischio non potevano essere esclusi come portatori «late-onset» del gene fino all'età di 35 anni nonostante *screening* biochimici reiterati. Attualmente avendo a disposizione dei sistemi *markers* di DNA altamente informativi della regione 11q12-13 è possibile eseguire la diagnostica genetica di portatore della mutazione predisponente con accuratezza elevata. È pertanto consigliato il consultorio genetico delle famiglie affette dalla sindrome. La genetica molecolare ci permette infatti di effettuare l'analisi del portatore del gene mutato e di paragonare i dati ottenuti con quelli biochimici. Come già citato l'analisi delle delezioni tumorali, condotta su 27 tumori, ha permesso di identificare il *locus* D11S427 come *marker* fiancheggiante più vicino sul lato centromerico della regione mentre la mappatura fisica della regione 11q12-13, utilizzando nuovi cloni di cDNA isolati, permette di stimare in 900 chilobasi la distanza fra i *markers* D11S807 e D11S427, rispettivamente sul lato telomerico e centromerico.

Recentemente è stata descritta una nuova fosfolipasi C fosfatidilinositolo-specifica il cui gene, *PLC β 3*, è situato in 11q13 e viene normalmente espresso nei tessuti che sono coinvolti nella sindrome MEN 1 suggerendo un suo eventuale coinvolgimento nella tumorigenesi di neoplasie endocrine, anche se non sono ancora note mutazioni a livello di tale gene. Il coinvolgimento di tale *locus*, né tantomeno l'effetto di eterozigotia nei tessuti endocrini interessati dalla sindrome in soggetti affetti.

La reale incidenza della sindrome MEN 1 è ancora sconosciuta non essendo disponibili studi di popolazione. La prevalenza della patologia è stimata essere compresa in un

«range» di 0,02-0,175 per mille, con una variabilità geografica considerevole. Con la possibilità di effettuare la diagnosi genetica adesso si potrà disporre di un valido supporto per definire il reale impatto della sindrome a livello di popolazione.

Tutte queste informazioni ottenute dall'analisi genetica molecolare ci hanno permesso e ci permetteranno in futuro una maggior comprensione delle basi molecolari della patogenesi delle sindromi MEN. Come in altre sindromi ereditarie tumorali è stato proposto che la suscettibilità a sviluppare un certo tipo di neoplasia non venga trasmessa come mutazione di oncogeni ad azione dominante, bensì come una mutazione ereditata in maniera dominante. Si eredita, pertanto, un allele mutato e la perdita funzionale di geni inibenti la crescita cellulare, ad espressività recessiva, avviene mediante la perdita della funzione dei due alleli costituenti il gene. Tale teoria prevede che la trasformazione neoplastica di una cellula sia il risultato di due mutazioni genetiche recessive, indicate anche come «hits», delle quali, nelle forme ereditarie, la prima è a livello germinale e pertanto presente in tutte le cellule dell'organismo. La natura recessiva di tale mutazione non ne permette l'espressione fenotipica, ma conferisce una predisposizione alla neoplasia. Quando una seconda mutazione, di natura somatica, causa la perdita dell'allele normale nella cellula del tessuto bersaglio, la mutazione recessiva si esprime con conseguente induzione della trasformazione neoplastica. Nelle forme sporadiche entrambi gli eventi mutazionali coincidono nella stessa cellula somatica bersaglio e pertanto tali forme sono più rare. Con questi presupposti ci possiamo spiegare la multicentricità dei tumori ereditari quando confrontati con la localizzazione monofocale delle forme sporadiche.

MEN 2A e MEN 2B. - Il gene responsabile della sindrome MEN 2A è stato recentemente identificato mediante tecniche di mappatura fisica e genetica nel protooncogene *Ret* indicato anche con *RET* (v. ONCOGENI E PROTOONCOGENI**), codificante un recettore tirosinchinasico espresso nel CMT e nel feocromocitoma ed, a più bassi livelli, nella tiroide normale umana. Anche per la sindrome MEN 2B il difetto genetico è a livello di *Ret*. Mutazioni «missense» di uno dei cinque codoni per la cisteina negli esoni 10 ed 11 di *Ret* sono state identificate nella maggioranza delle famiglie MEN 2A e nella forma familiare di solo carcinoma midollare della tiroide (FMCT), mentre mutazioni di un singolo codone nell'esone 16, che codifica parte del dominio tirosinchinasico, sono state identificate in oltre il 90% dei casi di MEN 2B. In ogni caso dove la mutazione di *Ret* è stata osservata nei campioni tumorali, la stessa sequenza variante era presente nella linea germinale, indicando che le mutazioni non insorgono somaticamente durante la tumorigenesi. È stato, quindi, dimostrato che gli alleli mutanti segregano con la patologia, cioè la stessa mutazione è presente nei membri affetti di una famiglia, ma non nei soggetti sani della stessa. Mutazioni del gene *Ret* sono alla base anche di altre patologie che coinvolgono cellule che originano dalle creste neurali, come il morbo di Hirschsprung (v. MEGACOLON, IX, 696-716; *4945-4950; **3611-3614). Tuttavia, il ruolo svolto da *Ret* nel normale sviluppo dei tessuti di origine neuroectodermica è ancora sconosciuto.

Fattori estrinseci

È ben nota l'esistenza di un fattore circolante nel plasma di pazienti affetti da MEN 1 capace di stimolare la proliferazione di linee cellulari di endotelio paratiroideo sia bovino che umano. Tale fattore mitogeno possiede caratteristiche chimico-fisiche comuni ai membri della famiglia dei *basic Fibroblast Growth Factors* (bFGFs). La fonte tissutale di pro-

duzione di tale *bFGF-like* nei soggetti affetti da MEN 1 non è ancor definita. Studi recenti hanno contribuito a caratterizzare sia l'indipendenza dall'età sia il rapporto con gli indici endocrini del fattore mitogeno circolante MEN 1 in soggetti affetti e non affetti da sindrome MEN 1. L'attività mitogena plasmatica risulta essere più alta nei soggetti giovani (< 15 anni) portatori della mutazione del gene *men 1* rispetto ai non portatori. La mancanza di dipendenza dall'età suggerisce che l'attività mitogena sia elevata nei portatori della mutazione precocemente nella vita, prima delle manifestazioni cliniche della patologia endocrina.

Aspetti generali di clinica

Sindrome MEN 1

L'iperparatiroidismo primario (v. IPERPARATIROIDISMO E IPOPARATIROIDISMO, VIII, 105; *3966; **2870) è la prima manifestazione della sindrome MEN 1 ed in genere la più comune (95%). Dal punto di vista clinico l'ipercalcemia, secondaria alla patologia paratiroidea, è asintomatica nel 50% dei casi, mentre il restante 50% presenta una storia di pregressa nefrolitiasi, talora recidivante, ed un 10% manifesta complicanze ossee dovute al riassorbimento del calcio dai depositi scheletrici con relativo rimodellamento di tali strutture. Un accurato *screening* clinico-strumentale della funzione paratiroidea e degli indici metabolici del *turnover* osseo (v. RIMODELLAMENTO OSSEO**) permettono una diagnosi in tempi brevi.

Seconda, per incidenza, alla patologia paratiroidea è probabilmente la patologia pancreatica e quella della componente endocrina del tratto gastroenterico. La sintomatologia, se presente, è riferibile in ca. i 2/3 dei casi, ad ipersecrezione di gastrina che a sua volta comporta una ipersecrezione acida gastrica, dispepsia e la comparsa di ulcere peptiche in genere multiple, di difficile controllo farmacologico. In 1/3 dei casi invece sono presenti i sintomi legati all'ipoglicemia sostenuta da ipersecrezione insulinica secondaria alla presenza di un insulinoma. In una minoranza di casi la sintomatologia può essere ricondotta alla ipersecrezione di altri ormoni pancreatici, ed agli effetti ad essi correlati, da parte di neoplasie pancreatiche endocrine tipo vipoma, glucagonoma (v. VII, 2080-2088; *2181, *5509) e/o neurotensinoma. Talora si possono verificare condizioni patologiche legate alla increzione di tipo misto da parte delle cellule neoplastiche pancreatiche. Come nel caso dell'iperparatiroidismo, anche per la patologia pancreatica un accurato *screening* biochimico-strumentale può permettere una individuazione precoce dei soggetti affetti.

La patologia ipofisaria associata alla MEN 1 si manifesta con sintomatologia varia a seconda del volume della neoplasia e del tipo di secrezione ormonale. Raro è il verificarsi di una situazione di ipopituitarismo primitivo da compressione, mentre è più frequente il riscontro di una forma ipofunzionante isolata come nel caso dei prolattinomi (v. *4068-4071), in cui l'eccessiva produzione di prolattina può essere nella donna responsabile della comparsa di disturbi del ciclo mestruale, con amenorrea ed associata galattorrea, mentre nel maschio si assiste ad una riduzione della libido sino all'impotenza. Anche gli altri ormoni ipofisari, come già citato, possono essere responsabili di patologia da ipersecrezione come nel caso dell'ormone somatropo, sostenuta da adenoma GH-secrente o da iperplasia eosinofila con conseguente acromegalia, o del morbo di Cushing secondario ad iperproduzione di ACTH da parte di un adenoma ipofisario.

Oltre queste tre sedi «tipiche», sopracitate, sono state descritte patologie tumorali associate alla MEN 1 anche in sedi anatomiche «atipiche» quali carcinoidi bronchiali ed/o

intestinali, che in rapporto alla loro sede possono o meno produrre la sintomatologia classica con *rash* cutanei e diarrea; e lipomi, unica localizzazione non endocrina, che possono presentarsi sia in sede cutanea che viscerale e generalmente sono asintomatici.

Sindrome MEN 2A

Le sue implicazioni cliniche sono gravi in quanto nella quasi totalità dei soggetti affetti è presente il carcinoma midollare della tiroide, la cui estrinsecazione clinica è generalmente subdola, essendo allo stadio iniziale praticamente silente. Via via che il tumore progredisce compaiono sintomi e segni locali (disfagia e senso di compressione al collo) e/o riferibili a metastasi a distanza. Generalmente quando è possibile scoprire la lesione già all'esame fisico del paziente il diametro maggiore della lesione nodulare è ormai di circa 1,5 cm. La sintomatologia del CMT è legata anche al tipo di sostanze che possono venir prodotte dal tumore, come nel caso di comparsa di diarrea in relazione alla produzione di prostaglandine e di serotonina da parte delle cellule neoplastiche. È stata anche descritta, associata a questa sindrome, una sindrome di Cushing sostenuta da secrezione ectopica di ACTH da parte del CMT.

Nella MEN 2A l'iperparatiroidismo si riscontra istologicamente in circa il 50% dei pazienti, ma si manifesta come franca ipercalcemia in non più del 10% dei casi.

Il feocromocitoma può precedere o seguire dal punto di vista sintomatologico il CMT. I sintomi ed i segni legati al feocromocitoma possono essere caratteristici e severi oppure scarsi e persino inesistenti. La diagnosi di feocromocitoma può essere sospettata in pazienti con ipertensione parossistica, stabile, alternata a crisi ipotensive con tachicardia e sudorazione. Tali sintomi possono essere scatenati da stimoli di natura svariata, fisici, chimici, farmacologici, emozionali e meccanici. L'anomalo comportamento della patologia ipertensiva fa sì che questa non sia consistente nel tempo in più del 50% dei casi, rendendo estremamente difficile e tardiva la diagnosi. Sono state descritte alcune famiglie in cui la patologia neoplastica della midollare surrenale rappresentava la patologia dominante, ma nella maggior parte dei casi (60%) il feocromocitoma viene documentato assieme al CMT, pur essendo clinicamente silente. Negli stadi iniziali, infatti, si possono riscontrare solo semplici anomalie biochimiche che, successivamente, possono sfociare in ipersecrezione franca od in un'anomala regolazione della produzione di catecolamine da parte delle cellule cromoaffini della ghiandola medullosurrenale.

Il lichen cutaneo, quando presente, si localizza a livello scapolare o sovrascapolare e più frequentemente interessa solo un lato. La lesione, che si presenta rilevata o piatta, pigmentata oppure incolore, può dare prurito ed anche dolore locale. La sintomatologia può anche precedere lo sviluppo della lesione cutanea stessa.

Sindrome MEN 2B

In questa sindrome il carcinoma midollare della tiroide è più aggressivo che nella sindrome MEN 2A e costituisce la causa più frequente di decesso. L'*habitus* marfanoide e la ganglioneuromatosi appaiono stigmati pressoché costanti di questa sindrome. L'*habitus* marfanoide astenico è caratterizzato da un diminuito rapporto tra il segmento superiore e quello inferiore dello scheletro, aracnodattilia, lassità ligamentosa, palato arcuato, aumentata apertura alare, petto scavato o carenato e cifoscoliosi. La ganglioneuromatosi del tratto alimentare si può associare a formazioni deturpanti le labbra, la mucosa linguale e buccale. La sintomatologia clinica di tali lesioni neuromatose è dipendente dalla loro localizzazione anatomica essendo praticamente

asintomatiche quelle presenti su labbra, lingua ed a livello della mucosa buccale, mentre le nodularità congiuntivali e palpebrali sono causa di frequenti episodi di cheratite ed i neuromi delle corde vocali provocano modificazioni della voce. Le lesioni neuromatose del tratto intestinale, plessi sottomucoso e mioenterico, si accompagnano a costipazione e talora a megacolon tossico.

La clinica delle sindromi MEN può manifestarsi in forma completa anche se sono state descritte forme familiari in cui una certa patologia endocrina (iperparatiroidismo, tumori endocrini pancreatici, neoplasie ipofisarie, CMT e feocromocitoma) si presenta isolata. Simili presentazioni sono considerate forme «varianti» di sindromi MEN.

Complicanze ed esiti

MEN 1. – La diagnosi precoce di iperparatiroidismo ha praticamente annullato la complicanza uremica secondaria alla compromissione renale legata all'ipercalcemia. La più frequente causa di decesso è riferibile alla patologia pancreatica endocrina, benigna o maligna. L'introduzione delle tecniche endoscopiche nella routine diagnostica della patologia ulcerosa gastro-duodenale e i progressi farmacologici degli antagonisti recettoriali istaminici di tipo H_2 e degli inibitori della pompa H^+-K^+ -ATP-dipendente bloccanti la secrezione acida gastrica hanno fortemente ridotto le complicanze dovute ad emorragie gastroenteriche che potevano condurre all'*exilis*. Di conseguenza, comunque, si è assistito ad un aumento relativo delle complicanze legate alla metastatizzazione dei tumori endocrini pancreatici e del tratto gastroenterico. La patologia ipofisaria ha generalmente andamento benigno, anche se non diagnosticata col passare del tempo può accentuarsi la sua aggressività locale, soprattutto in soggetti in cui l'insorgenza è stata precoce. Il carcinomide è per la sua natura maligna causa di decesso se non diagnosticato ed asportato chirurgicamente prima della sua metastatizzazione.

MEN 2A. – Il carcinoma midollare della tiroide è la più frequente causa di morte. Quando esso si presenta con dimensioni ancora contenute si può sperare in una sua diffusione limitata alle stazioni linfonodali latero-cervicali, ma se le dimensioni sono maggiori sono estremamente frequenti le recidive a distanza. Talora queste possono essere la causa della sintomatologia che precede la diagnosi della neoplasia. Quei tumori midollari che presentano cellule positive alla reazione immunoistochimica per la calcitonina sono considerati avere prognosi migliore. Il feocromocitoma può essere causa di decesso in questa sindrome, sia per le complicanze legate allo stato ipertensivo, sia per l'eventuale metastatizzazione del tumore.

MEN 2B. – Il quadro delle complicanze è del tutto simile a quello descritto per la MEN 2A, anche se, come già citato, il CMT è più aggressivo.

Diagnosi

MEN 1

Diagnosi clinica. – Si può sospettare la sindrome in quei soggetti che presentano episodi ricorrenti o familiari di litiasi renale e di ulcere gastro-duodenali multiple e recidivanti. Un'accurata anamnesi familiare e l'esame clinico devono essere volti a scoprire i sintomi e le complicanze dell'ipercalcemia, della malattia ulcerosa, della ipoglicemia, delle neoplasie ipofisarie, dei carcinoidi e la presenza di lipomi, sottocutanei e viscerali. La diagnosi biochimica è generalmente effettuabile fra i 12 ed i 25 anni di età, età media 18 anni, indagando la funzionalità di paratiroidi, pancreas endocrino ed adenoipofisi ed avvalendosi anche della diagnostica per immagini per la localizzazione della

lesione/i. La diagnosi clinica prevede, oltre alla valutazione della funzionalità epatica e renale, la misura dei livelli ematici di calcio totale e ionizzato, fosforo, fosfatasi alcalina, glicoso, PTH, gastrina, PP, insulina, C-peptide, VIP, glucagone, ACTH, GH e prolattina. Nel dubbio diagnostico di una eventuale presenza di iperfunzione cortico-surrenale o di un carcinomide è opportuno dosare gli ormoni glico- e mineral-corticoidi, i livelli urinari di cortisolo libero e di aldosterone-glicuronide.

Diagnosi genetica. – Per l'indagine genetica, che si effettua sul DNA costitutivo ottenuto dal sangue periferico, si fa riferimento ai dati ottenuti dalla mappatura fisica dettagliata della regione 11q12-13. In pratica 13 sistemi *markers* (17 sonde) hanno rivelato un *linkage* significativo con il gene *men 1*. Cinque di queste sonde (v. SONDE MOLECOLARI*, col. *6766) sono localizzate vicino al gene *men 1*, così da non mostrare alcun *cross-over* meiotico, mentre quattro di questi sistemi fiancheggiano il gene sul lato centromerico e quattro sul lato telomerico. Quando almeno tre DNA *markers*, uno a ricombinazione 0 e due fiancheggianti ciascun lato, risultano essere informativi si raggiunge un'accuratezza diagnostica del 99,5%. Tale indagine offre numerosi vantaggi: a) necessità di un solo prelievo di sangue; b) non obbligatorietà di controlli periodici per i soggetti «non portatori»; c) obiettività dei risultati ed indipendenza dall'età del soggetto. Esistono, tuttavia, alcune limitazioni al test genetico in questa sindrome riferibili al fatto che: a) dato che il gene non è ancora stato clonato è necessario analizzare almeno due individui affetti nell'ambito di una famiglia; b) possibilità, anche se rara, di ricombinazione tra il gene ed i *markers* genetici impiegati.

MEN 2A e 2B

Diagnosi clinica. – Il CMT si può presentare all'esame scintigrafico come una lesione nodulare fredda. È una neoplasia spesso multifocale e può metastatizzare precocemente per via linfatica a livello dei linfonodi loco-regionali. La diagnosi biochimica si può attuare fra i 5 ed i 35 anni, media 20 anni. I livelli circolanti di calcitonina sono elevati in tutti i pazienti con lesioni riconoscibili alla palpazione e sembrano correlare con le dimensioni della neoplasia. In pazienti che esibiscono iperplasia della midollare della tiroide i livelli basali di calcitonina sono normali, ma incrementano dopo test di stimolo con pentagastrina da sola o associata a calcio. Il test alla pentagastrina ha una penetranza diagnostica pressoché completa dato che il 90% dei portatori del gene mutato può essere identificato prima di 30 anni, anche se, comunque, solo il 70% dei portatori del gene esibiscono neoplasie. Altre sostanze possono essere dosate nel plasma ed utilizzate per diagnostica quali istaminasi, prostaglandine, serotonina, ACTH e peptidi ad esso correlati. La diagnosi di feocromocitoma è basata sulle rilevazioni ripetute dei livelli plasmatici ed urinari delle catecolamine e loro metaboliti. La scintigrafia con ^{131}I -metaiodobenzilguanidina è in grado di fornire una diagnosi di sede e di evidenziare lo stato di attività delle neoplasie della ghiandola medullo-surrenale. Il feocromocitoma è presente nel 50% dei casi di MEN 2A e, se non diagnosticato, può essere letale in corso di interventi chirurgici. Data la loro frequente bilateralità o multicentricità è estremamente importante eseguire la diagnosi di localizzazione mediante TAC, angiografia e dosaggi delle catecolamine mediante prelievi venosi multipli. È chiaro che prima di sottoporre il paziente ad una tiroidectomia totale per il CMT debba essere esclusa una concomitante neoplasia della midollare del surrene, la quale avrà la precedenza chirurgica. In corso di MEN 2A dovranno essere dosati anche i livelli plasmatici di calcio totale e ionizzato e di PTH.

Diagnosi genetica. - Come sopra citato è oggi possibile effettuare la diagnosi genetica di portatori della mutazione per la MEN 2A, per la MEN 2B e per la sindrome «MTC only» (*Medullary Thyroid Carcinoma only*). Verrà utilizzato a tale scopo il DNA costitutivo, ottenuto da sangue periferico dei soggetti da analizzare, e saranno valutate, mediante reazione di polimerizzazione a catena (PCR [v. *]) e seguente sequenziamento dei prodotti così amplificati, tutte le possibili mutazioni descritte in letteratura che sappiamo essere prevalentemente a livello degli esoni 10 ed 11 del gene *Ret* per la MEN 2A e dell'esone 16 dello stesso gene per la MEN 2B. Essendo il gene responsabile noto, tale indagine potrà essere effettuata anche in un singolo individuo ed avrà una grande importanza per la diagnosi prenatale di tali patologie.

Prognosi

MEN 1

La combinazione dei test clinico-strumentali e genetici ci mette in condizione di effettuare una diagnosi precoce della sindrome. Qualora un soggetto, ancorché asintomatico, risulti essere portatore del gene mutato, sarà sufficiente effettuare lo *screening* biochimico e ripeterlo annualmente per riconoscere i primi segni della patologia ed intervenire tempestivamente. Una precoce terapia chirurgica dell'iperparatiroidismo contribuirà alla prevenzione delle complicanze ossee e renali e migliorerà la sintomatologia riferibile ad ipersecrezione gastrinica. È importante tenere in considerazione la prospettiva che una terapia farmacologica profilattica della sindrome da gastrinoma potrebbe essere responsabile di un aumento relativo di decessi legati a cancerizzazione dei tumori pancreatici e del tratto gastroenterico associati. Si riducono, infatti, le complicanze e si offre un tempo sufficiente alla neoplasia per acquisire caratteristiche di malignità.

MEN 2A

Importante è la valutazione dei livelli basali di calcitonina e di quelli ottenuti dopo stimolo con pentagastrina annualmente per un'età compresa fra i 5 ed i 35 anni. Dopo i 35 anni di età la possibilità che il test si positivizzi è inferiore al 5% e quindi si potrà ridurre la frequenza dello *screening* ad ogni due anni. Prognosi più infausta si avrà in quei casi, non frequenti, di CMT che non manifestano, né di base né dopo stimolo, livelli elevati di calcitonina. L'identificazione del gene responsabile ha nettamente migliorato la prognosi della sindrome in quanto i soggetti sono individuabili precocemente. È ancora discusso il comportamento da tenere nei bambini risultati portatori di mutazioni del gene *Ret*.

MEN 2B

L'analisi genetica acquisisce un'importanza notevole, in quanto una precoce tiroidectomia totale a scopo profilattico è in grado di ridurre la morbidità e la mortalità da CMT. È comunque sempre importante effettuare anche lo *screening* biochimico essendo ancora discutibile se praticare come profilassi la tiroidectomia totale in soggetti risultati geneticamente portatori della mutazione, ma clinicamente negativi.

Terapia

MEN 1

La terapia dell'iperparatiroidismo è chirurgica e si può associare il dosaggio intraoperatorio del PTH che permette una monitoraggio della rimozione completa del tessuto patologico. Attualmente si esegue una paratiroidectomia totale con reimpianto autologo di un frammento ghiandolare

a livello dei muscoli dell'avambraccio in vista di un'eventuale reintervento per recidiva. È consigliabile effettuare anche una timectomia in modo da poter prevenire l'eventuale esordio di un carcinoma timico. La sindrome da gastrinoma può essere farmacologicamente controllata impiegando antagonisti dei recettori H_2 o inibitori della pompa H^+-K^+ -ATP-dipendente. La terapia chirurgica della sindrome da gastrinoma viene riservata a quei casi in cui il tumore pancreatico è isolato oppure in quei soggetti appartenenti a famiglie che presentano una tendenza alla evoluzione maligna di tali lesioni. Prima di procedere all'intervento per il gastrinoma si deve, comunque, correggere l'iperparatiroidismo e la relativa ipercalcemia. In corso di insulinoma viene effettuata una pancreatectomia distale vista la presenza di lesioni multiple e di iperplasia della cellule beta insulari. Se anche dopo l'intervento persiste lo stato ipoglicemico si può fare ricorso a terapia con diazossido. Le patologie tumorali ipofisarie secernenti GH ed ACTH vengono aggredite chirurgicamente, preferenzialmente per via transfenoidale, mentre i microprolattinomi possono essere trattati farmacologicamente con antidopaminergici.

MEN 2A e MEN 2B

Il CMT deve essere trattato chirurgicamente mediante tiroidectomia totale ed eventuale linfadenectomia se presenti ripetizioni locali. Se è evidente un aumento delle dimensioni di una paratiroide si deve procedere alla sua asportazione, mentre se tutte quante sono aumentate viene eseguita una paratiroidectomia subtotale in quanto le recidive di iperparatiroidismo non sono frequenti nella MEN 2A. Una volta diagnosticata la presenza di sindrome da feocromocitoma si deve correggerla chirurgicamente, anche in vista di un futuro intervento sulla tiroide.

Bibliografia

- Brandi M. L., Marx S. J., Aurbach G. D. et al., *Endocrine Rev.*, 1987, **8**, 391-405.
 Larsson C., Sheperd J., Nakamura Y., *J. Clin. Invest.*, 1992, **89** (4), 1344-1349.
 Larsson C., Skogseid B., Oberg K., *Nature*, 1988, **332**, 85-87.
 Lips C. J., Van Der Sluis Veer J., Struyvenberg A., *Am. J. Med.*, 1981, **70**, 1051-1060.
 Lips C. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 828-835.
 Mulligan L. M., Kwok J. B., Healey C. S., *Nature*, 1993, **363**, 458.
 Mulligan L. M. et al., *Nature Genetics*, 1994, **6**, 70.
 Sherman S. J., Gagel R. F., *Disorders Affecting Multiple Endocrine Systems*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1998, McGraw-Hill, New York, pp. 2131-2138.
 Wermer P., *Am. J. Med.*, 1954, **16**, 363-371.

MARIA LUISA BRANDI

NERVO [v. vol. X, coll. 450-527]

CHIRURGIA

(vol. X, coll. 520-527)

SOMMARIO

Cenni di anatomia dei nervi periferici (col. 3954). - Classificazione delle lesioni dei nervi periferici (col. 3956). - *Neuroprassia* (I grado). - *Axonotmesis* (II grado). - *Neurotmesis* (III grado). - *Lesione di IV grado*. - *Lesione di V grado*. - *Meccanismi di lesione dei nervi* (col. 3959). - *Valutazione clinica e strumentale delle lesioni dei nervi periferici* (col. 3960). - *Trattamento neurochirurgico* (col. 3962): *Decompressione*. - *Ricostruzione*. - *Conservazione dell'integrità dei nervi*. - *Riabilitazione postoperatoria* (col. 3970).

Cenni di anatomia dei nervi periferici

Per nervi periferici [NP] s'intendono i nervi [n.] cranici (dal III al XII paio), i nervi spinali (cervicali, toracici, lombari e sacrali), i plessi cervicale, brachiale e lombo-sacrale, e i nervi degli arti superiori ed inferiori (fig. 1, A).

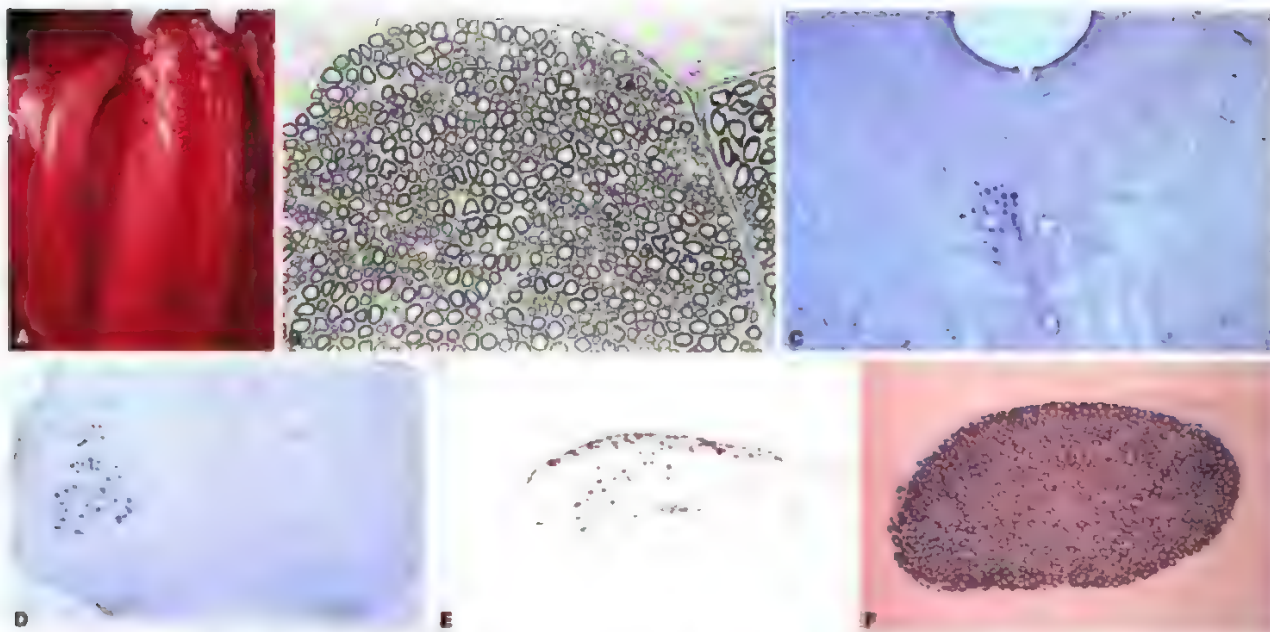


Fig. 1. A) N. sciatico umano fotografato con il microscopio operatorio dopo intervento di neurolisi. Nel fascicolo più a destra si intravedono altri fascicoli più piccoli. B) Sezione istologica trasversa di un n. sciatico di ratto normale. Ben evidenti i singoli assoni circondati da mielina, il connettivo compatto del perinevrio circondante gruppi di assoni o fascicoli, ed intorno il connettivo più lasso dell'epinevrio. C) Sezione trasversa del tronco dell'encefalo (mesencefalo) di ratto normale in cui è visibile il gruppo (subnucleo) di motoneuroni che innerva il muscolo oculare retto mediale. I motoneuroni sono marcati con HRP (*Horse Radish Peroxidase*; perossidasi del rafano). D) Sezione trasversa del midollo spinale di ratto normale in cui è visibile il gruppo di motoneuroni (nucleo) i cui assoni andranno a costituire il n. sciatico. Motoneuroni marcati con HRP. E) Ganglio di una radice dorsale spinale di ratto normale. Neuroni sensitivi marcati con HRP. F) Parte intracranica del n. oculomotore di ratto normale. Si nota la struttura monofascicolare del n. circondato da solo endonevrio.

I NP sono costituiti da fibre nervose, o assoni, da guaine connettivali (fig. 1, B) e da vasi sanguigni. Le fibre nervose, o assoni sono prolungamenti citoplasmatici di neuroni contenuti nel tronco dell'encefalo (fig. 1, C) e nel midollo spinale (fig. 1, D) e in strutture gangliari (fig. 1, E). Si distinguono assoni motori e sensitivi sia somatici che viscerali. Ciascun assone è circondato da strati di mielina, cellule di Schwann e membrana basale e da una prima guaina connettivale, l'endonevrio.

Un gruppo di assoni circondato da una seconda guaina di connettivo, il perinevrio, costituisce un fascicolo. Uno o più fascicoli delimitati da una terza guaina connettivale, l'epinevrio, formano il tronco nervoso (fig. 1, B). Il segmento intracranico dei n. cranici è formato da un singolo gruppo di assoni ed è rivestito da solo endonevrio (fig. 1, F), mentre il loro segmento extracranico si organizza in una struttura plurifascicolare in cui si aggiungono perinevrio ed epinevrio (fig. 1, B). Il perinevrio è più resistente allo stiramento e l'epinevrio alla compressione per cui la prevalenza dell'uno o dell'altro è responsabile delle caratteristiche meccaniche dei n. I NP sono vascolarizzati da un abbondante plesso intraneurale. Una rete capillare linfatica è presente nell'epinevrio e drena nei linfonodi regionali.

All'interno dei NP, i fascicoli si dividono e si uniscono ripetutamente tra di loro costituendo una rete, il «plesso del nervo» (fig. 2). L'esistenza di tale plesso spiega come sezioni trasverse eseguite a differenti livelli di uno stesso nervo possano presentare una differente struttura fascicolare (fig. 2). Questo aspetto anatomico ha implicazioni pratiche sia nella chirurgia ricostruttiva che decompressiva dei NP. Infatti, nella chirurgia ricostruttiva dei nervi interrotti, il moncone prossimale e quello distale possono avere strutture fascicolari talmente diverse da ren-

dere illusorio ogni tentativo di riallineare e collegare i fascicoli come erano in origine. Nella chirurgia decompressiva dei n., bisogna tenere conto della struttura plessica del n. quando si esegue la cosiddetta neurolisi interna. Questa consiste nella rimozione del tessuto reattivo fibro-cicatriziale che si può formare tra i fascicoli non interrotti di un n. lesionato. Durante tale procedura si deve avere cura di non danneggiare le anastomosi nervose interfascicolari, evento che comporterebbe la perdita di contingenti assonali. Si ricorda infine che il decorso ondulado degli assoni nei fascicoli, dei fascicoli nei n. e dei n. nel loro letto fornisce un certo grado di protezione dagli stiramenti durante i movimenti.

Classificazione delle lesioni dei nervi periferici

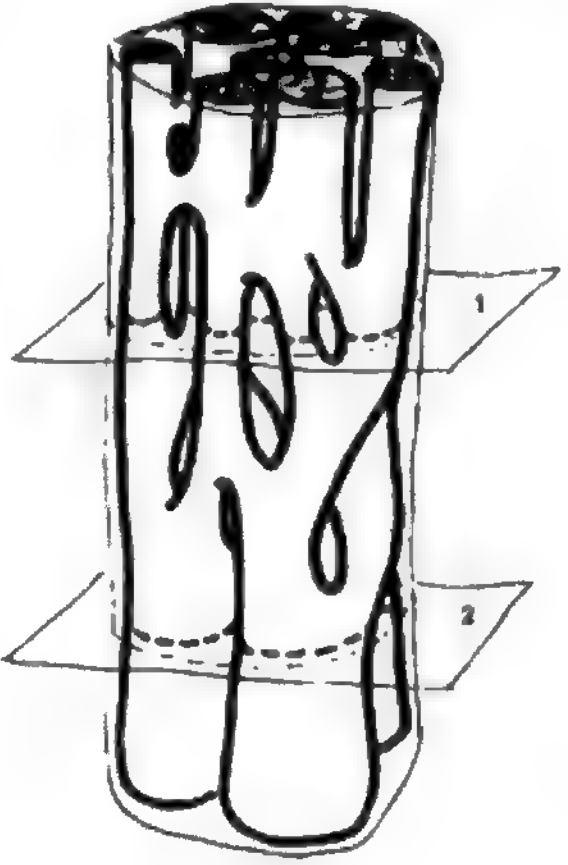
Nel 1943 Seddon (cfr. 1954) introdusse una classificazione delle lesioni dei NP in tre gradi lesionali riferiti all'unità anatomica assone: neuroaprassia, axonotmesis, e neurotmesis (fig. 3, A). Successivamente, Sunderland (1978) considerava 5 gradi di lesione dei NP (figg. 3, A e 3, B), i primi tre gradi coincidenti con quelli di Seddon.

V. anche POLINEUROPATIE E MONONEUROPATIE PERIFERICHE**.

Neuroaprassia (1° grado)

Consiste nella lesione funzionale assonale, sebbene più recentemente siano state rilevate lesioni anatomiche focali consistenti in aree di demielinizzazione. Si tratta di un blocco della conduzione nervosa assonale a livello del sito lesionale mentre, distalmente la conduzione è mantenuta. Si ha perdita della funzione assonale. Clinicamente l'entità del deficit funzionale motorio e/o sensitivo è in relazione con il numero di assoni coinvolti dalla neuroaprassia. Que-

Fig. 2. Il plesso interno del n. La prevalenza di epinevrio o perinevrio determina le caratteristiche meccaniche del n.

IL PLESSO INTERNO DEL NERVO È RESPONSABILE DELLA DIVERSA STRUTTURA FASCICOLARE IN SEZIONI TRASVERSE CONTIGUE DELLO STESSO NERVO	DIVERSE CARATTERISTICHE MECCANICHE DELL'EPINEVRIO E DEL PERINEVRIO
	- EPINEVRIO: protezione soprattutto nei confronti della COMPRESSIONE - PERINEVRIO: protezione soprattutto nei confronti dello STIRAMENTO 1) NERVO CON MOLTI FASCICOLI (MOLTO PERINEVRIO, POCO EPINEVRIO): > RESISTENZA ALLO STIRAMENTO < RESISTENZA ALLA COMPRESSIONE 2) NERVO CON POCCHI FASCICOLI (POCO PERINEVRIO, MOLTO EPINEVRIO): > RESISTENZA ALLA COMPRESSIONE < RESISTENZA ALLO STIRAMENTO

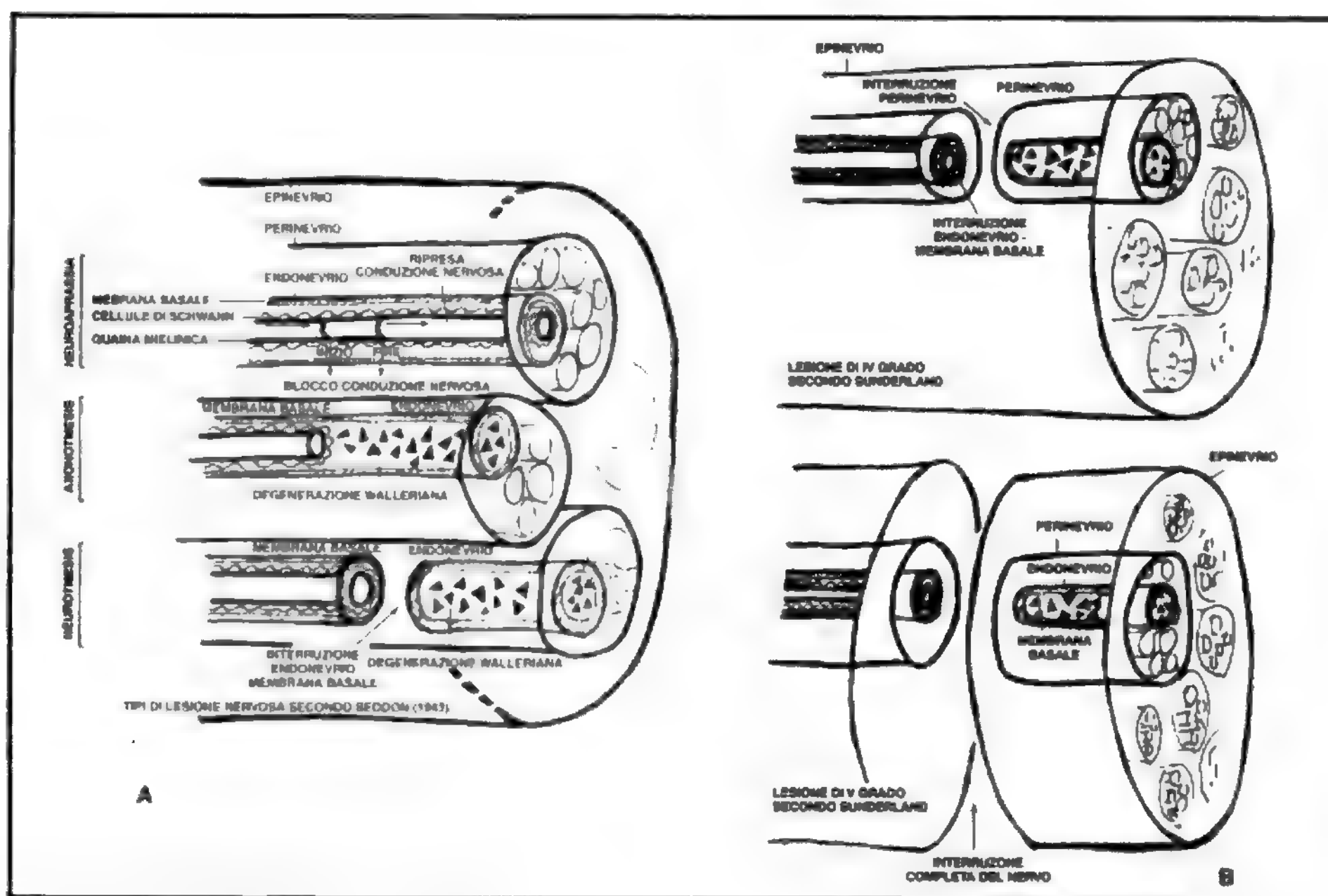


Fig. 3. A e B): gradi di lesione dei n.

sta si risolve spontaneamente con un recupero funzionale completo in 4-6 settimane.

Axonotmesis (II grado)

È l'interruzione completa dell'assone a livello della membrana cellulare, o axolemma, mentre la guaina connettivale endonevriale rimane integra. Il tratto assonale distale va incontro a un processo di frammentazione-disintegrazione o degenerazione walleriana. La funzione assonale è persa. Clinicamente, l'entità del deficit funzionale del n. lesionato è proporzionale al numero di fibre nervose coinvolte dall'axonotmesis. L'axonotmesis è reversibile. Il segmento assonale prossimale è in grado di rigenerare, seguendo la guida del tubo endonevriale integro, e di reinnervare lo stesso organo bersaglio originale. Si realizza pertanto una reinnervazione selettiva ed un recupero funzionale completo in un tempo che dipende dalla distanza tra sito lesionale ed organo bersaglio (velocità media di rigenerazione assonale = 1 mm al giorno).

Neurotmesis (III grado)

È l'interruzione completa dell'assone incluso il tubo endonevriale cui segue degenerazione walleriana. Si associano inoltre emorragia interfascicolare, edema e ischemia con evoluzione verso la fibrosi. L'entità del deficit funzionale motor-sensitivo del n. lesionato è proporzionale al numero di fibre nervose coinvolte dalla neurotmesis. La rigenerazione assonale è possibile, ma l'interruzione dei tubi endonevriali aumenta le probabilità che assini rigeneranti, privi di guida nel tratto lesionato, imbocchino distalmente tubi endonevriali diversi da quelli originali, andando quindi ad innervare organi bersaglio differenti da quelli in origine. Il recupero funzionale ne verrà compromesso.

Lesione di IV grado

È l'interruzione dell'assone, della guaina endonevriale e del perinevrio fascicolare cui segue degenerazione walleriana. La funzione e il pattern fascicolare sono persi; gli assini rigeneranti hanno scarse probabilità di raggiungere i loro organi bersaglio ed emettono gemmazioni, o *sprouts*, che circondate da tessuto fibrociatriziale costituiscono il neuroma.

Lesione di V grado

È persa anche la continuità dell'epinevrio. Ne risulta interruzione completa del tronco nervoso. Nel moncone prossimale del n. si assiste a uno *sprouting* assonale, ma a causa della discontinuità con il moncone distale gli *sprouts* danno origine alla formazione di un neuroma.

I primi quattro gradi di lesione possono coesistere nell'ambito dello stesso n. Inoltre, persistendo l'agente lesivo, una lesione inizialmente neuroaprassica può evolvere nei gradi successivi di lesione. Le lesioni di III, IV e V grado richiedono trattamento neurochirurgico ricostruttivo.

Nei tubi endonevriali del segmento nervoso distale alla lesione, dopo la degenerazione walleriana assonale, i frammenti dell'assone e della mielina sono fagocitati da cellule di Schwann totipotenti. Questo processo si completa alla fine della terza settimana; le cellule di Schwann sono pronte a riformare la mielina attorno all'eventuale assone rigenerante che abbia superato il sito lesionale imboccando un tubo endonevriale distale. Il corpo cellulare neuronale, motore o sensitivo, aumenta di volume per la sintesi di abbondante materiale strutturale proteico che viene trasportato verso il sito lesionale a formare nuovo assoplasma e assolemma.

Meccanismi di lesione dei nervi

Nel caso della *lacerazione*, le cause comuni sono le lesioni da taglio. La lesione può essere una completa transezione del

nervo o una lacerazione parziale. Nei casi di lesioni «pulite» e a margini netti (da vetro, da lame), il trattamento neurochirurgico ricostruttivo può essere eseguito immediatamente come intervento urgente (riparazione primaria). Nelle lacerazioni «sporche», con il rischio d'infezioni, o nelle lesioni associate a traumi di importanza vitale, l'intervento ricostruttivo del n. lacerato sarà rimandato ed eseguito come intervento programmato appena possibile (riparazione secondaria). Più precoce è l'intervento di ricostruzione nervosa e maggiori sono le probabilità di recupero funzionale.

Nella *contusione focale* si può avere una serie di lesioni diverse nel contesto dello stesso n. Si osserva comunemente in ferite d'arma da fuoco in cui si aggiunge anche l'azione lesiva termica. Quando si verifica una grave contusione spesso è necessario resecare la parte contusa del n., creando un moncone prossimale e uno distale al fine di eseguire una neurorrafia con tessuto vitale. Se la perdita di sostanza crea tra i monconi una distanza superiore a 2 cm è opportuno colmare tale distanza con trapianti di n. autologo.

Nella *lesione da stiramento/trazione*, il n. coinvolto può rimanere in continuità ma possono verificarsi nel suo interno i primi quattro gradi di lesione sopra enunciati; può anche verificarsi una lesione di V grado. Gravi alterazioni strutturali possono essere circoscritte all'area di lesione o, viceversa, estendersi per un lungo tratto di n. o infine, coinvolgere più tratti di n. lungo il suo decorso. Tipiche lesioni da stiramento/trazione sono quelle che si verificano a carico del plesso brachiale spessissimo secondarie a incidenti motociclistici.

In caso di *compressione*, l'entità del danno nervoso è correlata alla durata e al grado di compressione. La compressione altera anche l'apporto ematico del n. aggravando l'effetto lesivo della compressione. Una compressione di lieve entità è associata ad alterazione della mielina paranodale, invaginazione della mielina e demielinizzazione segmentale. Una compressione via via più severa determinerà i vari gradi di lesione dei n.

Le *lesioni da iniezione* in genere non sono dovute all'azione meccanica dell'ago ma all'azione chimica dei farmaci iniettati. Se iniettati in un n., tutti i farmaci sono potenzialmente neurolesivi. Istopatologicamente, spesso si evidenzia una nevrite. I n. più comunemente coinvolti sono lo sciatico e il radiale. Il reperto intraoperatorio più frequente in questi tipi di lesioni è un neuroma in continuità.

Le *lesioni da elettricità* si verificano a seguito del contatto di un determinato distretto organico con i cavi dell'alta tensione. In questi casi è di comune riscontro un danno nervoso e muscolare esteso che richiede trattamenti combinati di estese resezioni di tessuti necrotici e ampi autotrapianti nervosi.

Valutazione clinica e strumentale delle lesioni dei nervi periferici

Al fine di porre una corretta indicazione al trattamento chirurgico delle lesioni dei NP è opportuno procedere a

TAB. I. SCALA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE MOTORIA

M0: paralisi completa
M1: contrazione muscolare apprezzabile alla palpazione
M2: movimento articolare attivo con l'arto appoggiato
M3: contrazione o movimento articolare completo contro gravità
M4: come M3 + contro resistenza
M5: movimento normale

TAB. II. SCALA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE SENSITIVA

S0: assenza di sensibilità nell'area autonoma
S1: presenza di sensibilità cutanea profonda
S2: presenza di qualche grado di sensibilità cutanea superficiale
S3: presenza significativa di sensibilità ma non localizzata
S4: presenza di buona sensibilità ma con localizzazione attutita
S5: sensibilità normale

una determinazione puntuale della sede e dell'estensione del danno nervoso. Una anamnesi accurata, un esame obiettivo attento e indagini strumentali appropriate consentono di determinare correttamente l'entità della lesione nella maggioranza dei casi. L'esame obiettivo deve includere una valutazione dei muscoli e della sensibilità dipendenti dal n. lesa (tabb. I e II).

La elettromiografia (EMG) e gli studi della conduzione nervosa sono molto utili nel definire la sede e la gravità delle lesioni nervose (v. ELETTROMIOGRAFIA [v.; v.**]). Tali esami vanno eseguiti a due-tre settimane di distanza dalla lesione. Nei casi in cui si preveda la possibilità di un recupero spontaneo, l'EMG è più sensibile dell'esame obiettivo nel rilevare segni di re-innervazione e dovrebbe essere eseguita quando si ritenga trascorso il tempo necessario perché la rigenerazione assonale (1 mm/die) possa aver raggiunto il muscolo più proximale.

Nelle lesioni del plesso brachiale, è necessario determinare l'eventuale avulsione delle radici spinali dal midollo spinale. Esami come la Tomografia Computerizzata (TC) con introduzione di mezzo di contrasto nello spazio sub-aracnoideo spinale, o la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) permettono di evidenziare eventuali pseudomenin-goeli (classicamente ritenuti indicativi di avulsioni radicolari, ma in realtà non sempre associati a esse), e di rilevare la continuità delle radici nel loro tragitto intraspinale. Nei casi in cui i suddetti esami non diano un reperto certo, si può procedere a un intervento esplorativo mediante emilaminectomia delle ultime vertebre cervicali. L'avulsione radicolare, oltre a impedire un recupero spontaneo, pone dei problemi che possono essere senza soluzione o passibili di soluzioni parziali basate sulla neurochirurgia ricostruttiva. Generalmente, l'avulsione di una sola radice è responsabile di un deficit di forza parziale del muscolo coinvolto, in quanto la maggior parte dei muscoli sono innervati da più

di una radice. Il deficit sensitivo presenta una distribuzione dermatomica ed è di grave entità nell'area cutanea propria di ogni n., denominata «zona autonoma», la quale può essere molto piccola se è lesa soltanto una radice nervosa. La presenza di una sindrome di Bernard-Horner suggerisce l'avulsione della radice di T1.

Lo studio dei potenziali di conduzione nervosa sensitiva può essere usato per determinare se la lesione è prossimale o distale al ganglio della radice dorsale (GRD). Il corpo cellulare dei neuroni sensitivi periferici è localizzato nel GRD. Ogni neurone ha un assone che si divide a T in un ramo breve e uno lungo. Quello breve si dirige verso il midollo spinale e quello lungo si dirige verso la periferia e decorrendo lungo il n. raggiunge l'organo bersaglio. Una lesione prossimale al GRD, come l'avulsione radicolare dal midollo spinale, determina l'interruzione dei rami brevi dei neuroni sensitivi gangliari, mentre i rami lunghi distali rimangono vitali nel n. Pertanto, il potenziale di conduzione sensitiva del n. rimane immutato. Se, viceversa la lesione è distale al GRD con interruzione dei rami lunghi periferici, la degenerazione walleriana lungo il nervo che ne deriva determina la perdita del potenziale di conduzione nervosa sensitivo.

Il segno di Tinel è utile in fase pre-chirurgica per determinare la sede della lesione di un n. e in fase postchirurgica, per seguire l'eventuale progressione della rigenerazione delle fibre sensitive di un n. Percuotendo lungo il corso del n. in esame si evocano parestesie, descritte in genere come scosse elettriche, nel dermatomero servito dal n. testato. Il segno di Tinel, quando è evocabile distalmente al livello lesionale, indica che la rigenerazione di fibre sensitive è proceduta fino a quel punto e indirettamente può dare una indicazione sull'allungamento rigenerativo anche delle fibre motorie. Il segno di Tinel dovrebbe procedere in senso distale alla velocità di 1 mm al giorno in accordo con la velocità di crescita del cono di rigenerazione assonale. Tuttavia, la presenza del segno di Tinel distalmente alla lesione non è indicativa del grado di recupero funzionale che sarà ottenuto.

Trattamento neurochirurgico

Il trattamento neurochirurgico consiste nella decompressione di un n. compresso, nel ripristino della continuità anatomica di un n. interrotto, od infine nella conservazione dell'integrità anatomica di un n. coinvolto da un tumore intrinseco od estrinseco.

Decompressione

Gli interventi di decompressione possono comportare la sezione di un ligamento anatomico naturale o di una banda

Fig. 4. A) È indicato l'asse nel quale eseguire l'incisione cutanea di 1,5-2 cm di lunghezza nel trattamento della sindrome del tunnel carpale. B) Si osserva il n. mediano decompresso dopo sezione completa del ligamento trasverso del carpo.





A

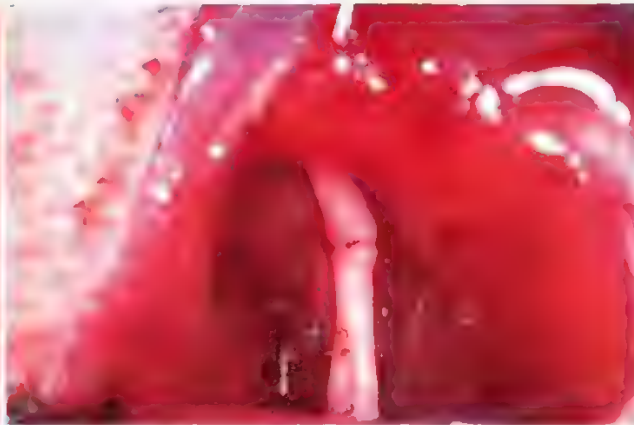


B

Fig. 5. A) Incisione cutanea lungo la superficie volare del gomito appena anteriormente all'epicondilo mediale (indicato con una V). B) Il n. ulnare decompresso pronto ad essere trapianto anteriormente (che in questa figura è verso l'alto) all'epicondilo mediale dopo aver aperto il canale cubitale.



A



B

Fig. 6. A) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio senza perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare facile. B) Anastomosi diretta dei due monconi applicando un unico punto di sutura 10-0.

aponeurotica anomala, o l'eliminazione di altre strutture anomale come muscoli, ossa, formazioni lipomatose o, infine, l'eliminazione di tessuto reattivo fibrocatriziale perineurale (neurolisi esterna) e intraneurale tra i fascicoli di

un n. (neurolisi interna). Un esempio d'intervento decompressivo è la sezione del ligamento trasverso del carpo nella *sindrome del tunnel carpale* (figg. 4, A e B) (V. CANALICOLARI SINDROMI) in cui la compressione del n. mediano è respon-



A



B



C

Fig. 7. A) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio con perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare difficile. B) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio con perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare difficile. C) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio con perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare difficile.

Fig. 7. B) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio con perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare difficile. C) N. sciatico di ratto sottoposto a lesione da taglio con perdita di sostanza. L'avvicinamento dei due monconi appare difficile.

sabile di dolori e parestesie (senso di addormentamento, formicolii) specialmente notturni, localizzati alla superficie volare della metà radiale del palmo della mano, prime tre dita e metà radiale del quarto dito. I risultati chirurgici nella sindrome del tunnel carpale sono positivi in più del 90% dei casi.

Dopo la sindrome del tunnel carpale, la compressione più frequente dell'arto superiore è quella del nervo ulnare al gomito (*sindrome del tunnel cubitale*) (figg. 5, A e 5, B) caratterizzata da dolori lungo il margine ulnare, e deficit di forza alla mano e di sensibilità nel lato ulnare della mano. Nell'arto inferiore, si ricorda la compressione del nervo peroneo al poplite che si presenta con dolori locali e deficit della flessione dorsale del piede e delle dita. I risultati della terapia decompressiva dei NP sono buoni specie nei casi in cui l'intervento sia precoce e prima dell'instaurarsi di deficit motor-sensitivi significativi.

Ricostruzione

La neurochirurgia ricostruttiva si avvale dell'uso del microscopio operatorio e delle tecniche di microchirurgia. Alcuni presidi tecnologici, come il laser, sono stati proposti senza riuscire ad imporsi in questo settore chirurgico.

Dopo aver isolato il moncone prossimale e quello distale del n. interrotto e aver ottenuto due superfici di taglio vitali, si valuta la possibilità di unire con relativa facilità i due monconi ottenendo una anastomosi diretta (figg. 6, A e 6, B); ciò è in genere possibile quando la distanza tra i monconi è inferiore a 2 cm. La riparazione può comportare l'unione dei monconi *in toto* suturando la guaina esterna di essi (sutura epinevriale), oppure l'unione di fascicoli o gruppi di fascicoli isolati nei due monconi (sutura perinevriale). Distanze tra i monconi maggiori di 2 cm (fig. 7, A) potrebbero essere risolte sfruttando l'elasticità dei nervi ma si otterrebbe un piano di unione dei monconi sotto tensione (fig. 7, B). Si è visto che la tensione al piano di sutura, facilitando la formazione di tessuto fibro-cicatriziale locale, ostacola il passaggio degli assoni rigeneranti dal moncone prossimale a quello distale. Per ottenere una riduzione della distanza tra i monconi si può procedere alla dissezione del n. stesso, il quale può essere mobilizzato per una lunghezza pari a 50 volte il suo diametro senza rischi di produrre ischemia grazie alla particolare struttura della rete vascolare. Ulteriore lunghezza può essere guadagnata mediante dissezione di fasci muscolari dal tronco nervoso principale, flessione della articolazione adiacente, trasposizione del n. (ad es. del n. ulnare al gomito), e rimozione di tessuto osseo (ad es. della testa della fibula nella ricostruzione del n. peroneo). Se anche dopo queste procedure non è possibile una anastomosi dei monconi diretta e senza tensione, si procederà a interporre tra di essi segmenti di n. prelevati dallo stesso soggetto (*autotrapianti*) (fig. 7, C).

Gli *autotrapianti* sono rivascolarizzati da piccoli vasi sanguigni del sito ricevente. Sono da preferire autotrapianti di piccolo diametro, come i n. cutanei, in quanto si rivascolarizzano prima e la velocità della rivascolarizzazione è un fattore condizionante il successo terapeutico. Il n. cutaneo più utilizzato come autotrapianto è il n. surale, il cui prelievo è ben tollerato dando una piccola area di anestesia cutanea nel dorso del piede. Nei traumi di più NP può essere necessario prelevare entrambi i n. surali e altri n. cutanei come il cutaneo mediale del braccio e dell'avambraccio, il cutaneo femorale laterale, il radiale superficiale. La riparazione con autotrapianti, pur creando due piani di passaggio per gli assoni rigeneranti, è superiore come risultati alla riparazione diretta sotto tensione. I monconi nervosi possono essere uniti utilizzando punti di sutura in nylon 8-0/10-0 od utilizzando colle di fibrina.

Un problema particolare è dato da un n. che si presenta in continuità con un neuroma nella sede lesionale. Registrazioni elettrofisiologiche intraoperatorie possono guidare la condotta chirurgica. Un potenziale d'azione nervoso che passi attraverso la lesione indica una buona prognosi circa il recupero funzionale: sarà pertanto necessaria soltanto una neurolisi esterna-interna. Una mancata conduzione del potenziale d'azione attraverso la lesione (dopo che sia intercorso un periodo sufficiente per una eventuale rigenerazione spontanea) indica la necessità di una resezione del segmento neuromatoso e la probabilità di dover ricorrere ad un autotrapianto.

Vi sono casi in cui non è possibile eseguire la ricostruzione di un n. perché il moncone prossimale non è disponibile. In questi casi si può procedere a un intervento di neurotizzazione del moncone distale del n. lesionato utilizzando un n. integro vicino. Questo viene diviso e il suo moncone prossimale viene «anastomizzato» al moncone distale del n. lesionato. Un esempio di tale tecnica è l'uso del

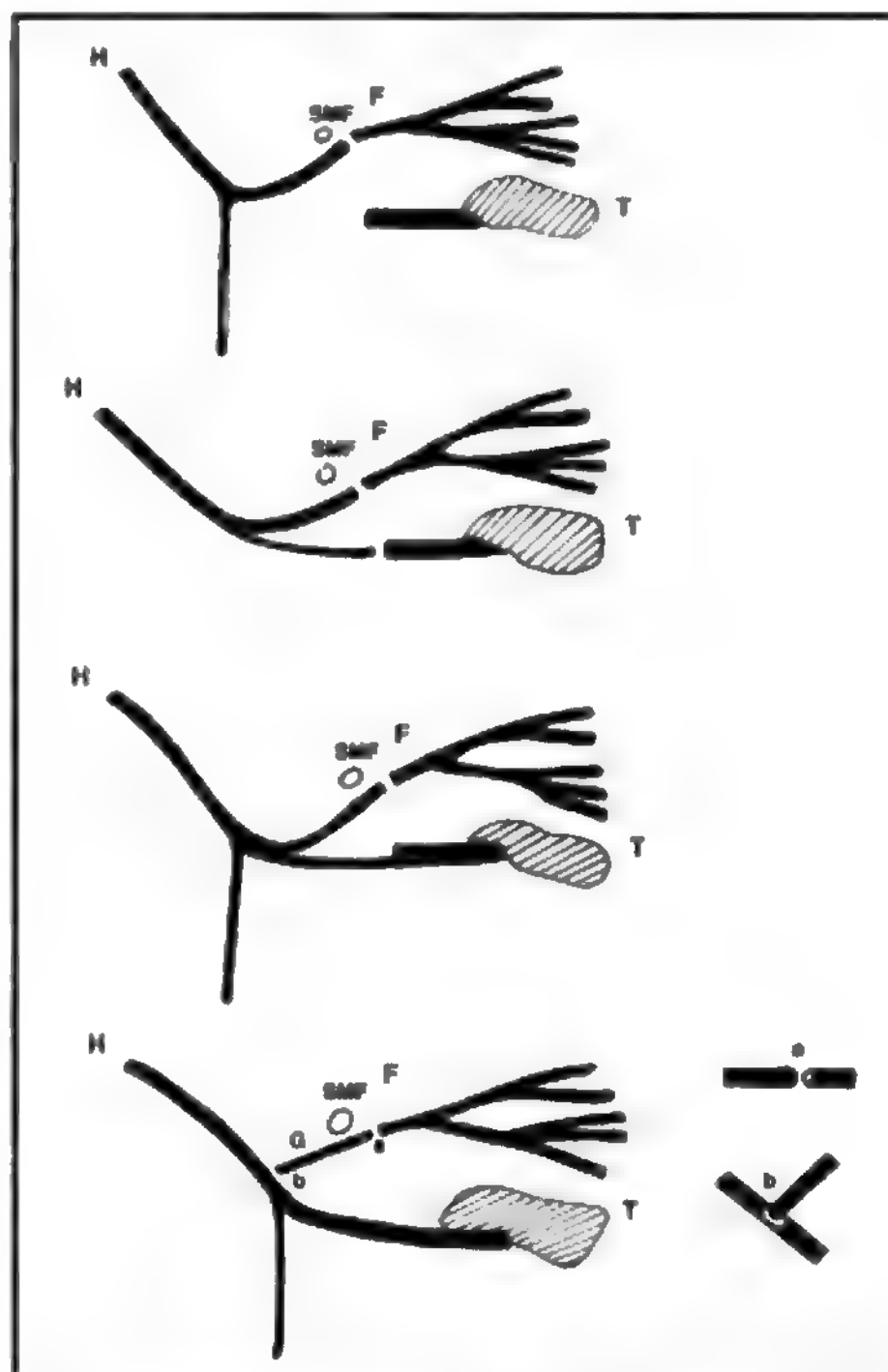


Fig. 8. Illustrazione schematica indicante varie tecniche di anastomosi ipoglosso-facciale: H) n. ipoglosso; F) n. facciale; SMF) forame stilo-mastoideo; T) lingua; G) autotrapianto. La tecnica più seguita è quella *in alto* in cui il n. ipoglosso viene completamente sezionato e la emilingua di quel lato completamente denervata. Il moncone prossimale di questo n. viene quindi anastomizzato al moncone distale del n. facciale sezionato alla sua emergenza dal forame stilo-mastoideo. Le altre tecniche mirano a limitare la denervazione dell'emilingua corrispondente.

n. accessorio spinale per reinnervare il n. muscolocutaneo nelle lesioni del plesso brachiale in cui si sia verificata avulsione radicolare dal midollo spinale; oppure l'uso del n. ipoglosso per reinnervare il n. facciale (fig. 8) quando questo n. sia stato lesionato nell'angolo ponto-cerebellare e non sia più disponibile il moncone prossimale.

La chirurgia ricostruttiva dei n. comprende in sintesi tre grandi capitoli: *a*) le lesioni dei n. delle estremità superiori (muscolo-cutaneo, ascellare, radiale, mediano e ulnare) e inferiori (sciatico con i suoi rami terminali il peroneo ed il tibiale, femorale); *b*) le lesioni del plesso brachiale (a livello radicolare, dei tronchi superiore, medio ed inferiore, e delle corde mediale, laterale e posteriore); *c*) le lesioni dei n. cranici (oculomotore, abducente, trigemino, facciale, accessorio spinale).

I risultati della chirurgia ricostruttiva sono legati a vari fattori tra cui l'età, le condizioni generali del paziente, le modalità del trauma e le lesioni associate vascolari, dei tessuti molli e ossee, la complessità anatomico-funzionale del n., il livello della lesione, l'intervallo di tempo trascorso tra l'intervento ed il trauma, e la lunghezza degli autotrapianti.

Per quanto riguarda l'età e le condizioni generali si ritiene che i risultati siano migliori nei giovani che negli anziani e che malattie metaboliche, ad es. il diabete mellito, influenzino negativamente i processi rigenerativi.

Le modalità del trauma sono importanti come elemento prognostico; lesioni nette da taglio di un n. hanno una prognosi migliore rispetto a quelle che avvengono con meccanismi di schiacciamento e/o strappamento in cui si associano lesioni vascolari, dei tessuti molli e ossee per cui si hanno estese aree reattive fibro-cicatriziali poco vascolarizzate che accolgono precariamente gli autotrapianti. In questi casi è stato proposto l'uso di autotrapianti vascolarizzati, fatto che comporta, oltre all'anastomosi nervosa, anche l'anastomosi vascolare di una arteria e di una vena. Tuttavia, l'uso di autotrapianti vascolarizzati non ha avuto diffusione. I meccanismi di stiramento e torsione possono determinare lesioni a livelli multipli di grado diverso lungo il decorso dei n.: in questi casi l'eventuale ristabilimento della

continuità di un tronco nervoso ad un certo livello può portare ad una rigenerazione assonale che viene bloccata ad un livello distale per la coesistenza, ad es., di una lesione di III grado.

Non tutti i NP hanno la stessa complessità anatomico-funzionale. Ad es. il n. muscolo-cutaneo innerva muscoli responsabili di movimenti grossolani di flessione e adduzione del braccio e di flessione e supinazione dell'avambraccio. Anche il n. radiale innerva muscoli responsabili di movimenti come l'estensione dell'avambraccio, della mano e delle dita. Al contrario, il n. ulnare innerva i muscoli intrinseci della mano implicati nei movimenti più fini e complessi dell'organismo. Pertanto, dopo riparazione chirurgica, la prognosi delle lesioni dei primi due n. è migliore rispetto a quella del n. ulnare.

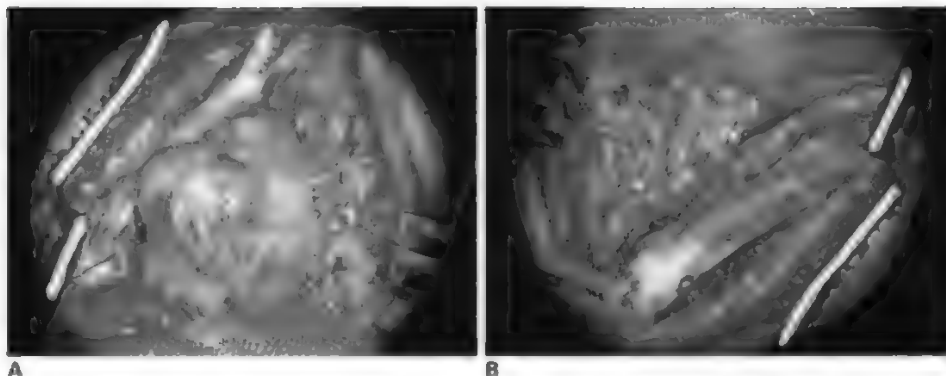
Per quanto riguarda il livello lesionale, le lesioni più prossimali hanno una prognosi peggiore rispetto a quelle distali per due ragioni. La prima è che la lesione di un n. innesca fenomeni degenerativi sia in direzione distale che prossimale. Distalmente, si verifica la degenerazione walleriana degli assoni. Prossimalmente, il corpo cellulare dei neuroni parenti degli assoni interrotti possono andare incontro a morte cellulare (figg. 9, A e 9, B). Più prossimale è la lesione e maggiore è l'entità della morte cellulare e minore quindi il numero di neuroni che possono rigenerare i loro assoni. La seconda ragione è che la lesione più è prossimale e maggiore sarà il tempo necessario perché gli assoni rigeneranti, alla velocità di 1 mm al giorno, raggiungano gli organi bersaglio periferici. D'altra parte la denervazione determina alterazioni regressive in muscoli, ossa, articolazioni, cute, alterazioni che se di lunga durata (> di 2 anni), diventano irreversibili. Da qui la ricerca sia di mezzi capaci di contribuire a mantenere il trofismo, specialmente dei muscoli denervati, in attesa della reinnervazione, sia di farmaci che accelerino la rigenerazione assonale.

Per quanto detto appena sopra, si capisce che minore è l'intervallo tra lesione e riparazione e migliori sono le probabilità di recupero. Nella pratica clinica si riparano n. le-



Fig. 9. A) Nucleo del n. sciatico di ratto normale. B) Nucleo del n. sciatico di un ratto in cui il n. sciatico è stato sezionato e non riparato 3 mesi prima. È evidente la diminuzione del numero di motoneuroni come conseguenza della morte cellulare post-axotomia. Motoneuroni marcati con HRP (Horse-Radish Peroxidase).

Fig. 10. A) Un neurinoma del n. tibiale è stato isolato dai fascicoli del n. ed è pronto per essere asportato. B) Il n. tibiale rimasto integro dopo l'asportazione del neurinoma.



sionati fino ad 1 anno prima ed oltre. Tuttavia, bisognerebbe intervenire al più presto possibile.

Per quanto riguarda la lunghezza degli autotrapianti, nei vari studi clinici effettuati si è potuto vedere che sono migliori i risultati clinici con gli autotrapianti al di sotto dei 5 cm di lunghezza.

Conservazione dell'integrità dei nervi

Infine, il trattamento neurochirurgico può avere come obiettivo quello di salvaguardare l'integrità di n. quando siano essi stessi sede di processi tumorali benigni come i neurinomi e i neurofibromi. Questi tumori possono presentarsi sia fuori che nell'ambito della malattia di Recklinghausen. Con una corretta tecnica microchirurgica è possibile ottenere una asportazione completa e selettiva dei neurinomi e anche dei neurofibromi, rispettando l'integrità e quindi la funzione della maggior parte dei n. coinvolti (fig. 10).

È importante ricordare che tumefazioni lungo il decorso di n. che si presentano come tumefazioni sottocutanee apparentemente banali devono invitare i medici non specialisti a evitare interventi improvvisati anche al livello di procedure biotiche. Non sono infrequenti lesioni iatrogene dei n. avvenute in simili circostanze. Anche l'asportazione

di tumori estrinseci rientra nei compiti del trattamento neurochirurgico. Ad es., l'asportazione dei tumori parotidei richiede la salvaguardia dell'integrità del n. facciale, oppure, in caso di lesione intraoperatoria del n. o dei suoi rami di divisione, la immediata riparazione mediante anastomosi diretta o utilizzando autotrapianti nervosi.

Nell'eseguire le biopsie di linfonodi ingrossati al collo bisogna prestare attenzione a non lesionare il nervo accessorio spinale (fig. 11), appena sottocutaneo in un punto, responsabile della funzione del muscolo trapezio.

Un capitolo collaterale della chirurgia del n. è quella riguardante il trattamento dei neuromi dolorosi che si determinano per l'interruzione del contingente sensitivo di un n. sia nell'ambito della lesione di un singolo n. sia dopo l'amputazione di un arto. Nel caso di n. plurifascicolari interrotti, il trattamento consiste nell'eseguire l'escissione del neuroma e quindi la preparazione nel moncone residuo di gruppi fascicolari in numero pari che vengono anastomizzati tra di loro interponendo tra di essi un autotrapianto. Nel caso di lesioni di n. sensitivi, come ad es. il radiale superficiale, si può far finire l'estremità prossimale del n. interrotto nella midollare di un osso vicino.

Riabilitazione postoperatoria

L'importanza della terapia fisica riabilitativa è riconosciuta. Lo specialista fisiatra è di capitale importanza e il suo lavoro è complementare a quello del neurochirurgo. La riabilitazione deve iniziare al più presto e continuare per un lungo periodo. Controlli clinici e studi elettrofisiologici devono essere eseguiti periodicamente ogni 3 mesi. I primi segni di rigenerazione sono la ricomparsa della sudorazione, della sensibilità dolorifica e di quella vibratoria. Il ripristino della funzione motor-sensitiva elementare è un processo che può durare 1-3 anni. Nei casi più favorevoli, il recupero di movimenti complessi è un processo che dura oltre i 2 anni.

Nei casi in cui non si ottiene un recupero adeguato sono possibili interventi chirurgici palliativi basati su «transfer» di muscoli tendinei ed altre procedure ortopediche, inclusa l'utilizzazione di presidi protesici.

Bibliografia

- Gelberman R. H., *Operative nerve repair*, 1991, Lippincott, Philadelphia.
- Kline D. G., Hudson A. R., *Nerve injuries*, 1995, Saunders, Philadelphia.
- Mumenthaler M., Schliack H., *Peripheral nerve lesions*, 1991, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Seddon H. J., *Peripheral nerve injuries*, 1954, H. M. Stationery Office, London.
- Sunderland S., *Nerves and nerve injuries*, 1978, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.

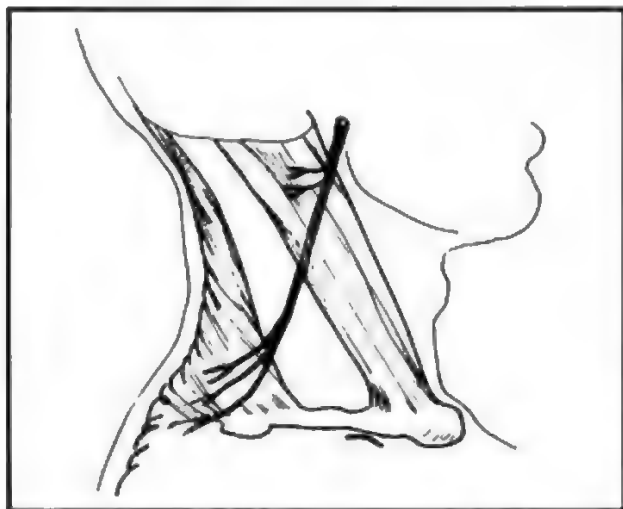


Fig. 11. Figura schematica del n. accessorio-spinale che, dopo essere uscito dal cranio attraverso il forame giugulare, dà rami al muscolo sterno-cleido-mastoideo e quindi attraversa il triangolo posteriore del collo (sede frequente di biopsie linfonodali) per andare ad innervare il muscolo trapezio.

Terzis J. K., *Microreconstruction of nerve injuries*, 1987, Saunders, Philadelphia.

EDUARDO FERNANDEZ E ANTONIO SCOGNA

NERVOSO SISTEMA [v. vol. X, coll. 570-627; Agg. I, coll. *5353-5363]

MALATTIE DEGENERATIVE

SOMMARIO

Premessa (col. 3971). - **Nosografia** (col. 3972). - **Meccanismi di neurodegenerazione** (col. 3973). - **Genetica** (col. 3974). - **Patologia comparata e sperimentale** (col. 3975). - **Associazioni morbose** (col. 3975). **Moderne acquisizioni etiopatogenetiche di alcune malattie degenerative** (col. 3975): *Demenze abiotrofiche*. - *Malattie del motoneurone*.

Premessa

In passato, vennero denominate *degenerazioni primitive neuronali* delle condizioni morbose di etiopatogenesi ignota, talora con evidente familiarità e con quadri clinici molto variabili, in cui neuroni di tipo particolare o situati in localizzazioni particolari (*sistemi*), andavano incontro ad alterazioni morfologiche più o meno peculiari (*abiotrofia*) e quindi alla morte. Attualmente molta luce è stata fatta su questo gruppo così eterogeneo di malattie ed è immaginabile che questa denominazione verrà a scomparire dalle nosografie future.

La *sistematizzazione*, che gli AA. del passato consideravano come peculiare di queste forme, deve essere considerata come un criterio d'incerto valore; se è in genere vero che esistono catene neuronali più lese di altre e che quindi possono fornire il nucleo clinico della malattia (van Bogaert, 1948), è quasi costante il fatto che il quadro anatomopatologico mostra una estensione delle lesioni ben superiore a quella deducibile dal quadro clinico. Esiste cioè una *dissociazione anatomoclinica*; d'altronde, certi neuroni sono sempre risparmiati (centro sacrale di Onuf), altri sono pressoché sempre colpiti (colonne di Clark) indipendentemente dalle forme cliniche.

Le malattie infettive, le malattie da tossici esogeni, le avitaminosi, le malattie dismetaboliche e gli effetti «patoclitici» dell'ipossia e dell'epilessia sono escluse dalla definizione di malattie degenerative.

Fu per primo Gowers (1902) ad introdurre il concetto di *abiotrofia* per indicare la morte cellulare, dovuta ad un «difetto di vitalità intrinseca»; altri AA. vollero interpretare l'atrofia neuronale come dovuta ad «esaurimento da iperfunzione» (Edinger), «senescenza precoce» (Spatz), «deficit di energia embriogenetica» (Spatz).

L'istologia mostra per lo più solamente aspetti di atrofia semplice (*atrofia degenerativa di Spatz*, Palladini *et al.*, 1984) con scomparsa focale o sistemica di neuroni e gliosi reattiva; in alcuni casi sono evidenti fenomeni di *dying-back*, in cui la degenerazione inizia a livello dell'estremità più distale dell'assone, proseguendo verso il pericarion, che è l'ultimo a degenerare; un'eccezione è costituita dall'atassia di Friedreich in cui non si ha degenerazione della cellula piramidale. I dati finora sono presenti inclusioni proteiche, come i corpi di Lewy nella malattia di Parkinson, e la degenerazione neurofibrillare della malattia di Alzheimer. Si può pensare che gli aspetti morfologici degenerativi si riportino alle alterazioni strutturali delle *strutture proteiche*. I dati finora disponibili tendono a confermare, almeno per alcune malattie, le acquisizioni del 1980, secondo le quali le malattie degenerative ad andamento cronico e strau-

tura di proteine implicate nei fenomeni di trascrizione genica.

La presenza di strutture proteiche comunque anormali si accompagna all'attivazione di sistemi di reazione, come le cosiddette *heath shock proteins* (HSP). Ad es., i corpi di Lewy sono costituiti da un *core* di neurofilamenti altamente fosforilati circondati da un alone di *ubiquitina*. Questa proteina che appartiene alle HSP, pur essendo presente anche in condizioni normali in vari compartimenti cellulari, viene legata da diversi sistemi enzimatici a proteine anormali; il complesso proteina anormale = ubiquitina è riconosciuto e demolito da grosse proteasi citosoliche (proteasi multicatalitiche) (Mayer *et al.*, 1991). La presenza di ubiquitina è stata dimostrata in altre inclusioni citoplasmatiche «degenerative», come i corpi di Pick della malattia di Pick (ubiquitina + neurofilamenti e proteine- τ), i corpi ialini della sclerosi laterale amiotrofica (ubiquitina + proteine filamentose di natura ignota), la degenerazione neurofibrillare della malattia di Alzheimer (e correlate) (ubiquitina + proteine- τ abnormemente fosforilate) (Iqbal e Iqbal, in: Calne, 1994).

Nosografia

L'aspetto nosografico è certamente il più confuso di questo capitolo. In letteratura sono state usate numerose forme eponime (Palladini, 1984), attualmente sostituite da nuove denominazioni, non sempre facilmente correlabili alle precedenti.

Appare evidente dagli ultimi dati che il vecchio concetto di *continuum* degenerativo deve essere abbandonato: le malattie degenerative geneticamente determinate sono infatti in preciso rapporto a specifiche mutazioni, mentre per le forme sporadiche appare sempre più probabile il concetto di un peculiare sottofondo genetico. Di ciò è conferma l'esistenza di forme familiari di malattie abitualmente sporadiche (forma familiare di Jacob-Creutzfeldt, di Pick, di Alzheimer).

È ormai opinione generale (Rosenberg, 1995) che la diagnosi della malattia possa essere fatta solo su basi genetiche e non anatomocliniche. Per esempio, nel vasto gruppo delle atassie spinocerebellari (v.; v.**) clinicamente caratterizzate dal sintomo atassia, anatomicamente correlato alla lesione cerebellare e delle fibre lunghe motorie e propriocet-

TAB. I. ATROFIE SISTEMICHE DEL SISTEMA NERVOSO

Demenze abiotrofiche o amiloidosi trasmissibili e non trasmissibili:
Malattia di Jacob-Creutzfeldt (e apparentate)
Malattia di Alzheimer

Abiotrofie del motoneurone e del sistema extrapiramidale:
Sclerosi laterale amiotrofica (e forme apparentate: Aran-Duchenne o atrofia muscolare progressiva spinale)
Neuropatia motoria o malattia di Charcot-Marie-Tooth (e forme apparentate)
Neuropatia bulbo-spinale o malattia di Kennedy
Malattia di Parkinson
Malattia di Huntington
Malattia di Shy-Drager

Atassie abiotrofiche:
Atassia abiotrofica autosomica dominante cerebellare (ADCA)
Subforme: atassia olivopontocerebellare (OPCA) o malattia di Henzel-Holmes-P. Marie-Alajunine
Sub/subforme: SCA1, SCA2, SCA4, SCA5, malattia di Machado-Joseph (SCA3)
Atassia dentatopallidorubroluysiana
Atassia abiotrofica recessiva (malattia di Friedreich e forme apparentate)

Abiotrofie ottiche e sensoriali

tive del midollo spinale, sono state individuate una serie di forme dominanti autosomiche, clinicamente pressoché sovrapponibili, ma con genotipi assai diversi. Nello stesso albero genealogico possono riscontrarsi diversi fenotipi clinici sostenuti dallo stesso genotipo, mentre in altre famiglie gli stessi fenotipi clinici sono sostenuti da genotipi differenti (Muller *et al.*, 1994).

Nell'attesa di una completa verifica genetica, resta ancora proponibile la classificazione topografico/semiologica di van Bogaert (1949), basata sull'ipotesi generica che le lesioni principali creano un nucleo semiologico con una certa localizzazione topografica. Pertanto, le atrofie sistemiche del sistema nervoso possono essere inquadrare ancora (Manfredi, 1994) come riportato in tab. I.

Meccanismi di neurodegenerazione

A tutt'oggi la patogenesi del fenomeno appare poco chiara. Alcuni AA. hanno ipotizzato che la morte cellulare sia collegata a meccanismi di eccitotossicità da glutammato (Meldrum e Garthwaite, 1990) (v. GLUTAMMATO, ANTAGONISTI DEL**).

L'acido glutammico è un aminoacido con elevato potere eccitotossico; fattori che attivino la sintesi od il rilascio del glutammato, o ne impediscano il catabolismo oppure stimolino l'attivazione dei recettori specifici, possono condurre ad una *iperattività primitiva del glutammato*. Nello stesso senso agirebbe il blocco di neuroni glutammato-inibitori (ad es. neuroni GABAergici), conducendo ad un'iperattività secondaria del glutammato. La prolungata attività glutammatergica è responsabile di un aumento del livello del Ca^{2+} intracellulare, a causa di una eccessiva apertura dei canali per il Ca^{2+} glutammato-dipendenti; la morte cellulare sarebbe correlata all'attivazione di proteasi (calpaina, etc.) e lipasi endocellulari Ca-dipendenti (Horowski *et al.*, in: Calne, 1994).

Un'ulteriore ipotesi patogenetica riporta la neurodegenerazione al deficit di fattori di crescita (*Growth Factors*, GF) specifici del tessuto nervoso (Palladini *et al.*, 1986). Il deficit potrebbe essere legato ad una ridotta sintesi dei GF e/o dei loro recettori.

Una possibilità interessante è quella che attribuisce la scarsa resistenza a neurotossici aspecifici contenuti nell'ambiente e specialmente nei cibi, ad una «meiopragia» neuronale geneticamente determinata. Questa ipotesi rivaluta le vecchie osservazioni degli Autori classici e tende ad unificare i dati sulla presenza di forme sporadiche e familiari di certe malattie neurodegenerative.

Oltre ai neurotossici organici, di cui alcuni sono accennati nel prosieguo, esistono diversi neurotossici ambientali inorganici, quali i sali di alluminio, implicati nella malattia di Alzheimer, i sali di manganese e di ferro, supposti coinvolti nella malattia di Parkinson, etc.

Un potente fattore «meiopragico» è certamente l'età, la quale è notoriamente un carattere specie-specifico multifattoriale geneticamente determinato (*età canonica*): è stata descritta l'esistenza di delezioni specifiche del DNA mitocondriale nel tessuto nervoso umano in rapporto alla vecchiaia (Cortopassi e Arnheim, 1990); è interessante ai nostri fini, il fatto che il metabolismo proteico rallenta in relazione all'età, e pertanto aumenta la vita media delle proteine (soprattutto enzimatiche), con un conseguente aumento del loro tasso di danneggiamento per perossidazione (Finch e Day in: Calne, 1994). Particolari genotipi sono stati fortemente indiziati di determinare una peculiare fragilità di certi sistemi neuronali: così nella sindrome di sclerosi laterale amiotrofica/parkinsonismo/demenza di Guam, si è certi del rapporto della malattia con il genotipo della popolazione Chamorro residente nelle aree colpite (Pacifico occi-

dentale, compresa Guam); tuttavia è emerso che deve esistere un componente ambientale, in quanto la malattia si sviluppa con una frequenza 100 volte superiore nei Chamorros residenti a Guam rispetto a quelli residenti negli Stati Uniti, mentre è inesistente nei bianchi dell'isola. La supposizione che tale fattore ambientale sia una neurotossina presente nell'alimento *Cycas circinalis* non ha avuto conferme certe; dati simili sono stati enunciati per le epidemie dell'Italia meridionale di latirismo da ingestione di *Latyrus sativus*, ristrette a determinate famiglie e non estese all'intera popolazione che se ne era cibata.

Un meccanismo patogenetico possibile e spesso invocato è quello autoimmune. La presenza di microglia esprime antigeni HLA-DR è stata descritta in tutte le malattie degenerative qui descritte, in rapporto alla fagocitosi dei residui cellulari; tuttavia aspetti immunologici sono stati descritti nella malattia di Alzheimer, nella sclerosi laterale amiotrofica e nella malattia di Parkinson (Eikelenboom e Stam, 1982; McGeer e Rogers, 1992; Yamada *et al.*, 1992).

Recenti ricerche hanno fatto supporre che le amiloidi, depositate in sede extracellulare in diverse malattie degenerative esercitino, come molecole intere o come frammenti, un'azione mitogenica sull'astroglia (Forloni *et al.*, 1994) e un danno diretto sui neuroni provocandone la degenerazione (Forloni *et al.*, 1993).

Genetica

Molte malattie degenerative sono geneticamente determinate (tab. II). Oltre a mutazioni puntiformi, in questi ultimi anni è stata evidenziata una nuova alterazione del codice genetico, la cosiddetta *espansione di tripletta* (v. TRINUCLEOTIDI INSTABILI, MALATTIE DA**). Essa consiste nella ripetizione di una tripletta (4-11 volte) in un gene codificante una proteina a funzione ignota (ad es. l'atassina-1 dell'*atassia olivo-ponto-cerebellare SCA1*, la hungtintina della *malattia di Huntington*). Il gene interessato è localizzato su differenti cromosomi, quali il cromosoma 4p16.3 nella *malattia di Huntington*, il cromosoma Xq11-q12 nella *atrofia muscolare spinobulbare* o *malattia di Kennedy*, il cromosoma 6p22-23 nell'*atrofia spinocerebellare SCA1*, il cromosoma 14q24.3-q32 nella *malattia di Machado-Joseph*, il cromosoma 12p12-ter nell'*atrofia dentato-rubro-pallido-lusiana* (DRPLA). La tripletta ripetuta più volte è costituita dai nucleotidi CAG (Citosina, Adenina, Guanina) e codifica per l'aminoacido glutammina. Il risultato dell'espansione di tripletta è la codificazione di una proteina a struttura secondaria anormale a causa della lunga catena interposta di poli-glutammina (Müller *et al.*, 1994).

Proteine con poli-glutammina sono note per es. in *Drosophila* ed anche nell'uomo perché interferiscono con segmenti di DNA ed intervengono in fenomeni di trascrizione genica. Si è supposto (Petrut *et al.*, 1994) che tali proteine anormali perdano le loro attività di regolazione trascrizionale oppure, più semplicemente, precipitino in forma insolubile nei neuroni. È interessante notare che nella malattia di Kennedy, ove la mutazione avviene a livello del primo esone del gene codificante i recettori degli androgeni (cromosoma Xq11-q12), è certo che il danno non deriva dall'inattivazione del gene codificante, perché individui con delezione totale del gene non presentano segni dell'atrofia spinobulbare.

Diversamente nella *malattia di Charcot-Marie-Tooth*, che è una polineuropatia periferica, genotipicamente molto eterogenea anche nello stesso albero genealogico, ma clinicamente molto uniforme, è stata descritta una forma (CMT1A) legata ad una duplicazione di una grossa regione del DNA (sul cromosoma 17p11.2), che codifica una proteina integrale di membrana, PMP-22, della mielina periferica (Lupski e Garcia, 1992). Una forma strettamente correlata,

TAB. II. MALATTIE DEGENERATIVE GENETICAMENTE DETERMINATE

(da McMillan e Harper, 1994)

	Malattie	Localizzazione cromosomica	Prodotto genico
Atassie abiotrofiche			
<i>Dominanti autosomiche</i>	Atassie olivo-ponto-cerebellari		
	SCA1	6p22-23	
	2	12q23-24.1	
	4	16q24-ter	
	5	11	
	Machado-Joseph (SCA3)	14q24.3-32	
	DRPLA	12p12-ter	
	Friedreich	9q13-21.1	
<i>Recessive</i>			
Abiotrofie motorie			
<i>X-linked</i>	Kennedy	Xq11-12	Reattori degli androgeni
	Charcot-Marie-Tooth		
	<i>X-linked</i>	Xq13	Connexin
<i>Dominanti autosomiche</i>	SLA familiare	21q22.1	SDOI
	Charcot-Marie-Tooth		
	CMT1A	17p11.2	PMP-22
	CMT1B	1q22-23	Po
	Huntington	4p16.3	Huntingtina
<i>Recessive</i>	Atrofia muscolare spinale	5q11.2-13.3	

SCA = atassie spinocerebellari (v **)

CMT1B, è invece legata ad una mutazione puntiforme del gene che codifica un'altra proteina integrale di membrana della mielina periferica, la Po (McMillan e Harper, 1994).

Patologia comparata e sperimentale

Sono note malattie abiotrofiche assai simili o completamente sovrapponibili a quelle umane nei carnivori, nei roditori e negli ungulati. Tranne che per le amiloidosi trasmissibili (*scrapie*), il contributo della patologia comparata a quella umana non è stato rilevante (Strong e Garruto, 1994). Esistono diversi modelli sperimentali che riproducono le lesioni assonali (sferoidi) ed il fenomeno del *dying-back* (IDPN, o cresilfosfato, etc.), ma la patogenesi della loro azione è ignota; più interessante è il modello di blocco della sintesi proteica dei neuroni spinali tramite trasporto retrogrado di ricina attraverso il nervo sciatico (Palladini *et al.*, 1986).

Associazioni morbose

Se la combinazione di quadri abiotrofici di diversi sistemi costituisce più la regola che l'eccezione, meno frequente è la combinazione di abiotrofie atassiche o motorie con degenerazioni di sistemi sensoriali. Più comuni sono le associazioni di atassie con lesioni visive (retinite pigmentosa), in particolare l'associazione di atassie con atrofia ottica di Leber (*sindrome di Beher*); la scuola di van Bogaert ha descritto quadri di associazione di abiotrofie varie con dismorfe, psicosi conclamate, oligofrenie e ritardi di sviluppo.

Moderne acquisizioni etio-patogenetiche di alcune malattie degenerative

Lesioni abiotrofiche

Un primo gruppo individuato è costituito dalle *amiloidosi trasmissibili* (kuru, malattia di Jacob-Creutzfeldt ed aggr. parentale) e *non trasmissibili* (malattia di Alzheimer).

1. *Amiloidosi trasmissibili*. - Si intende per *amiloide* una generica proteina la quale abbia una configurazione β -lamellare e pertanto sia: colorabile elettivamente col rosso congo e dicroica alla luce polarizzata, insolubile e resistente a certe proteasi e strutturata in microfilamenti. Le proteine amiloidi derivano da proteine normali (precursori) per una serie di fenomeni post-trascrizionali. Esistono molti dati che dimostrano come mutazioni puntiformi siano in grado di facilitare la trasformazione più o meno spontanea della proteina normale in amiloide. Le numerosissime ricerche compiute negli ultimi anni ritengono possibile che nelle cosiddette malattie da prioni (*Proteinaceous Infectious Particles*) la proteina β -amiloide possa trasformare in se stessa il precursore per un fenomeno autocatalitico (v. PRIONE; PRIONE*).

Le amiloidosi trasmissibili comprendono sia forme animali (*scrapie* delle pecore, encefalopatia dei visoni, encefalopatia spongiforme dei bovini, etc.), sia forme umane (kuru [v.], malattia di Jacob-Creutzfeldt [v. JAKOB-CREUTZFELDT, MALATTIA DI, VIII. 876; Agg. I, *4225; Agg. II, **1428], malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker [v. GERSTMANN-STRÄUSSLER, SINDROME DI, Agg. I, *3377; Agg. II, **2504], insonnia familiare fatale con disautonomia [Agg. I, *6800]). Tutte queste forme sono caratterizzate, oltre che dalla neurodegenerazione, da uno *stato spongioso* della sostanza grigia, sostanzialmente dovuto ad un rigonfiamento osmotico da blocco dell'ATPasi $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -dipendente dei terminali sinaptici e degli astrociti (entrambi ricchi di tale enzima, deputato alla pompa ionica che mantiene la differenza di potenziale; Palladini *et al.*, 1995) ed alla deposizione extracellulare di *amiloide*.

L'amiloide di queste malattie deriva da un precursore PrP^{sc} di 36 kd, codificato da un gene situato sul cromosoma 20 (nell'uomo); tale precursore è una proteina di mem-

brana prevalentemente neuronale, di funzione ignota la cui assenza sperimentalmente provocata nel topo non ha alcuna conseguenza (Safar, 1994). La forma «infettiva», PrP^{Sc}, di struttura secondaria in parte β -laminare ed in parte ad α -elica, è resistente alla proteinasi K e si trasforma *in vitro* ed *in vivo* nella amiloide PrP27-30 (kd) a tipica struttura β -laminare senza struttura α -elica (Safar *et al.*, 1993). Il meccanismo di trasformazione conformazionale resta a tutt'oggi ignoto. Esistono dati che implicano in tale trasformazione l'intervento della apolipoproteina E (l'isoforma E, codificata dal gene ϵ -4), espressa nel sistema nervoso prevalentemente negli astrociti (Amouyel *et al.*, 1994).

I dati sui casi familiari di amiloidosi trasmissibili umane dimostrano che la trasformazione PrP^C $\Rightarrow$ PrP^{Sc} $\Rightarrow$ PrP27-30 è enormemente facilitata dall'esistenza di mutazioni puntiformi nella struttura primaria del precursore: sono state descritte famiglie in cui la mutazione (leucina al posto di prolina) è al codone 102 o 105, oppure (valina al posto di alanina) è al codone 117, oppure (serina al posto di fenilalanina o arginina al posto di glutammina) è al codone 217. La più frequente è la mutazione (lisina al posto di acido glutammico) al codone 200. Sono noti anche casi di Jacob-Creutzfeldt legati a mutazioni per inserzione fra i codoni 51 e 90 di copie addizionali di una sequenza codificante un octopeptide. Sono note altre mutazioni sia per inserzione di copie di sequenze codificanti octopeptidi sia mutazioni puntiformi in altri codoni che, invece, non hanno alcun effetto patogenetico.

Si ritiene, pertanto, che le malattie da prioni siano malattie genetiche, legate ad una instabilità della molecola del precursore, instabilità ereditata o più spesso originatasi per mutazione *ex-novo* (frequenza $1 \times$ milione $\times$ anno). I casi di trasmissione (per cannibalismo nel caso del kuru, iatrogena nel caso della malattia di Jacob-Creutzfeldt) sono del tutto eccezionali (Gajdusek, 1994). Infatti, in assenza del gene che codifica il precursore dell'amiloide (come ottenuto in topi mediante ingegneria genetica, *topi knock-out*), la malattia non è trasmissibile con l'inoculazione dell'amiloide.

La presenza di mutazioni al codone 129 costituisce un fattore di rischio per la trasmissione della malattia (Brown *et al.*, 1994), come pure la presenza dell'allele ϵ -4 della apolipoproteina E.

Esiste una malattia che si eredita con modalità autosomica dominante, la *polineuropatia familiare amiloidotica*, che è stata interpretata dalla scuola di Gajdusek come un modello delle malattie da prioni. Infatti, il precursore dell'amiloide è una prealbumina solubile (*transthyretin*) formata da 4 subunità β -lamellari; le mutazioni puntiformi del gene (situato nel cromosoma 18) producono la facile trasformazione della *transthyretin* in β -amiloide. Finora però è stata ipotizzata ma non dimostrata la trasmissibilità di tale amiloidosi.

2. Amiloidosi non trasmissibili. – Tipica amiloidosi non trasmissibile è la malattia di Alzheimer (v. ALZHEIMER, MALATTIA DI [I, 1365; Agg. I, *245; Agg. II, **245]). Essa è caratterizzata dalla degenerazione neuronale, accompagnata dalla cosiddetta *degenerazione neurofibrillare* intra-neuronale e dalle placche di amiloide. Esistono casi di Alzheimer sporadico e di Alzheimer familiare.

La malattia di Alzheimer familiare è altamente eterogenea dal punto di vista genetico, il che fa supporre lo sia anche la forma sporadica. La deposizione di amiloide e le degenerazioni neurofibrillari sembrano essere la *crux commune* di mutazioni diverse, che agiscono con un meccanismo tuttora ignoto.

L'amiloide della malattia di Alzheimer deriva da un precursore che è una glicoproteina di membrana (soprattutto neuronale) di 695-770 aminoacidi, di 110/135 kd, detta

β -Amyloid-Precursor Protein (β -APP). Esistono almeno 5 tipi di APP (APP_{563 / 695 / 714 / 751 / 770}), codificati per *splicing* alternativo da uno stesso gene localizzato nel cromosoma 21,q21. L'amiloide β -A4 è un frammento di circa 40 aminoacidi, prodotto per clivaggio proteolitico del precursore. Gli studi genetici nei casi di Alzheimer familiare hanno accertato che non sempre mutazioni di questo gene sono correlate alla malattia: alcune famiglie presentano una mutazione al codone 717 della APP₇₇₀, altre al 671.

Le mutazioni al codone 693 determinano una forma di amiloidosi vascolare cerebrale, l'emorragia cerebrale ereditaria con amiloidosi di tipo olandese.

Altri casi di Alzheimer familiare non sono invece correlati con il gene della APP, ma con un gene localizzato sul cromosoma 14q24.3 (malattia di Alzheimer dominante precoce) oppure con un gene localizzato sul cromosoma 19 (malattia di Alzheimer tardiva); si è supposto che quest'ultimo sia l'allele ϵ -4 dell'apolipoproteina E, mentre un altro gene supposto implicato è quello che codifica una proteina molto simile alla APP (APLP) (Clark e Goate, 1993). La forma dominante precoce è correlata con la mutazione di un gene (S182) altamente conservato nella scala zoologica, che codifica una proteina integrale di membrana a funzione ignota (Sherrington *et al.*, 1995).

Il ruolo della apolipoproteina E nelle malattie degenerative è ancora *sub judice*. La presenza di una amiloide mista, contenente assieme alla β -A4 anche un'amiloide derivante da un frammento di apolipoproteina E, è stata dimostrata nelle placche senili (Wisniewski *et al.*, 1995). Dati di genetica di popolazione confermano che l'isoforma codificata dal gene ϵ -4 è fortemente rappresentata nei pazienti affetti da Alzheimer sporadica, mentre lo è poco nella popolazione non affetta né da questa malattia né da malattie cardiovascolari (Nalbantoglu *et al.*, 1994; Strittmatter e Roses, 1995).

Malattie del motoneurone

Si tratta di un vasto numero di situazioni morbose di incerta classificazione e a etiopatogenesi multipla (v. MOTONEURONE, MALATTIE DEL**).

Nella *sclerosi laterale amiotrofica (SLA)* familiare (v. SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**), recenti indagini hanno evidenziato, almeno nel 20% delle famiglie, una mutazione puntiforme a livello del gene codificante l'enzima Cu²⁺/Zn²⁺-superossidodismutasi (SOD1); si tratta di una metalloproteina presente nel citosol dove catalizza la trasformazione del radicale tossico superossido ad ossigeno molecolare e H₂O₂, costituendo così una difesa cellulare dalle specie radicaliche dell'ossigeno, che sono le cause probabilmente principali del danno cellulare. Topi transgenici che esprimono una delle mutazioni puntiformi della SOD1 sviluppano una malattia clinicamente e neuropatologicamente assai simile alla SLA (Volterra, 1995).

Sono stati individuati altri meccanismi che potrebbero essere alla base dei casi familiari senza mutazioni note della SOD1 e dei casi sporadici (che costituiscono la maggioranza). Alcuni dati sperimentali suggeriscono l'esistenza di un deficit del *reuptake* del glutammato a livello dei sinaptosomi della corteccia motoria e delle corna anteriori spinali, con conseguente aumento del livello di questo neurotrasmettitore e relativo effetto eccitotossico. Un legame fra questo meccanismo e il deficit di SOD1 potrebbe essere rappresentato dal fatto che lo stress ossidativo riduce il *reuptake* gliale del glutammato (Volterra, 1995).

Esistono infine dati che mostrano un coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della SLA. Infatti è stata dimostrata la presenza di infiltrati mononucleati nel midollo spinale nella grande maggioranza dei pazienti e di

NERVOSO SISTEMA

anticorpi sierici anti-gangliosidi (GM₁, asialo-GM₁), sebbene a basso titolo e con scarsa frequenza, contrariamente a quanto avviene nelle degenerazioni del solo motoneurone spinale. Inoltre è possibile indurre sperimentalmente nella cavia una malattia allergica del motoneurone mediante somministrazione di omogenati di motoneuroni spinali purificati, con comparsa di anticorpi verso subunità di canali del Ca²⁺ voltaggio-dipendenti e danno cellulare da penetrazione del Ca²⁺ nella cellula.

Bibliografia

OPERE GENERALI

- Bogaert L., *Les maladies systématisées*, in *Traité de Médecine*, vol. 16, 1949, Masson, Paris.
 Calne D. B., *Neurodegenerative Diseases*, 1994, Saunders, Philadelphia.
 Manfredi M., *Neurologia*, 1994, UTET, Torino.
 Martin J. B., *Molecular Neurology*, 1998, Scientific American, New York.

ARTICOLI

- Amouyel P. et al., *Lancet*, 1994, **344**, 1315.
 Brown P. et al., *Neurology*, 1994, **44**, 291.
 Clark R. F., Goate A. M., *Arch. Neurol.*, 1993, **50**, 1164.
 Cortopassi G. A., Arnheim N., *Nucl. Acid Res.*, 1990, **18**, 6927.
 Eikelenboom P., Stam F. C., *Acta Neuropath.*, 1982, **57**, 239.
 Forloni G. et al., *Nature*, 1993, **362**, 543.
 Forloni G. et al., *Europ. J. Neurosci.*, 1994, **6**, 1415.
 Gaydusek D. C., *Molecular Neurobiol.*, 1994, **8**, 1.
 Gowers W. R., *Lancet*, 1902, **1**, 1003.
 Lipka C. F. et al., *Neurology*, 1995, **45**, 97.
 Lopes-Cendes I. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, **54**, 774.
 Lupski J. R., Garcia C. A., *Brain Path.*, **2**, 337.
 Mann D. M. A., *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1982, **8**, 161.
 Mayer R. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **1089**, 141.
 McGeer P. L., Rogers J., *Neurology*, 1992, **42**, 447.
 McMillan J. C., Harper P. S., *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1994, **57**, 7.
 Meldrum B. S., Garthwaite J., *Trends Pharmacol. Sci.*, 1990, **11**, 379.
 Müller U. et al., *J. Neurol. Sci.*, 1994, **124**, 119.
 Nalbantoglu J. et al., *Ann. Neurol.*, 1994, **36**, 889.
 Palladini G., *Nuove acquisizioni sulle atrofie sistemiche*, in *Neurologia, Psichiatria, Neurofarmacologia*, vol. 2, 1984, Universo, Roma.
 Palladini G. et al., *Riv. Neurobiol.*, 1965, **41**, 301-325.
 Palladini G. et al., *Path. Biol.*, 1986, **34**, 1047.
 Palladini G. et al., *Med. Hypoth.*, 1995, **44**, 173.
 Perutz M. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 5355.
 Poirier J. et al., *Lancet*, 1993, **342**, 697.
 Rannum L. P. W. et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, **55**, 244.
 Rosenberg R. N., *Arch. Neurol.*, 1993, **50**, 1123.
 Rosenberg R. N., *Neurology*, 1995, **45**, 1.
 Rothstein J. D. et al., *N. Eng. J. Med.*, 1992, **326**, 1464.
 Safar J., *Neurobiol. Aging*, 1994, **15**, 279.
 Safar J. et al., *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 20276.
 Sherrington R. et al., *Nature*, 1995, **375**, 754.
 Strittmatter W. J., Roses A. D., *Proc. Natl. Acad. USA*, 1995, 4725.
 Strong M. J., Garruto R. M., *Experimental paradigms of motor neuron degeneration*, in Woodruff M. L., Nonnemann A. J. eds., *Toxin-induced models of Neurological Disorders*, 1994, Plenum Press, New York.
 Volterra A., *Boll. Agg. Neuropsicofarmacol.*, 1995, **11**, 55.
 Wisniewski T. et al., *Lancet*, 1995, **345**, 956.
 Yamada T. et al., *Acta Neuropath.*, 1992, **84**, 100.

GUIDO PALLADINI E LUIGI CALANDRIELLO

NERVOSO TESSUTO [v. vol. X, coll. 627-740]

ISTOPATOLOGIA [v. vol. X, coll. 685-713]

SOMMARIO

ISCEMIA CEREBRALE col. 3980
 Meccanismi del danno neuronale causato dall'anossia (col. 3980). -
 La risposta del sistema nervoso centrale all'anossia (col. 3981). - La bio-
 chimica dell'ischemia cerebrale: il danno neuronale mediato dal glu-
 tammato (col. 3982). - La sensibilità alla vulnerabilità all'anossia (col.
 3983). - La piovra ischemica: il ruolo dell'ossido
 nitrico (col. 3984). - La risposta del gene alla ischemia (col. 3985).
APC col. 3986

PATOLOGIA DEL CITOSCHELETRO NEURO- NALE

col. 3986

Premessa (col. 3986). - Degenerazione neurofibrillare (DNF) (col. 3986). - Degenerazione granulo-vacuolare (col. 3988). - Corpi di Lewy (col. 3988). - Corpi di Pick (col. 3989). - Inclusioni filamentose neuronali a composizione non definita (col. 3990).

AMILOIDOSI CEREBRALI

col. 3991

Introduzione (col. 3991). - Demenza di Alzheimer (col. 3991). - Angiopatia cerebrale congofila (ACC) (col. 3992). - Malattie da prioni (col. 3994).

L'INFIAMMAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

col. 3995

La barriera ematoencefalica (BEE) (col. 3995). - Immunocompe-
 tenza della microglia (col. 3995). - Mediatori dell'infiammazione:
 molecole di adesione e citochine (col. 3996). - L'infiammazione nella
 patologia disimmune (col. 3997). - L'infiammazione nella patologia
 virale (col. 3999).

ENCEFALOMIOPATIE MITOCONDRIALI

col. 4001

Introduzione (col. 4001). - Malattia di Leigh (col. 4003). - NARP
 (Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa) (col. 4003). - MELAS
 (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and
 Stroke-like episodes) (col. 4004). - MERRF (Myoclonus Epilepsy
 and Ragged Red Fibers) (col. 4005). - Sindrome di Kearns-Sayre
 (KSS) (col. 4005).

MALATTIE DA PRIONI

col. 4006

Introduzione (col. 4006). - Malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ)
 (col. 4006). - Nuova variante della MCJ (col. 4008). - Insonnia fa-
 miliare fatale (IFF) (col. 4009). - Sindrome di Gerstmann-Sträus-
 sler-Scheinker (GSS) (col. 4009). - Kuru (col. 4010).

Negli ultimi anni, con l'introduzione nella pratica diagno-
 stica di tecniche di biologia cellulare e molecolare e con
 l'enorme sviluppo della ricerca sperimentale, le conoscenze
 sui processi patologici di base e sui meccanismi patogenetici
 che li sottendono sono enormemente avanzate. Pertanto lo
 studio delle alterazioni istologiche oggi non può prescin-
 dere dai progressi consentiti da biochimica, genetica e im-
 munologia. Per questo si è reso necessario integrare la trat-
 tazione della neuropatologia della precedente edizione con
 alcune nuove acquisizioni che hanno permesso una più mo-
 derna sistematizzazione della patologia del sistema nervoso
 e una comprensione più approfondita dei meccanismi lesio-
 nali. In considerazione dell'elevata complessità dei compo-
 nenti del sistema nervoso e della loro dinamicità, in questa
 presentazione abbiamo preferito trattare non tanto la pa-
 tologia generale del neurone, della macro- e microglia, ma
 la patofisiologia dei singoli processi, selezionando quegli
 argomenti che a nostra opinione hanno maggiormente be-
 neficiato delle recenti acquisizioni.

ISCHEMIA CEREBRALE

Meccanismi del danno neuronale causato dall'anossia

Una delle aggressioni più frequenti all'integrità del neurone è
 quella anossico-ischemica. L'energia necessaria a garantire le fun-
 zioni del S.N.C., ovvero sintesi e trasporto di molecole, manteni-
 mento del potenziale di membrana, funzionamento delle pompe
 per il trasporto degli elettroliti, metabolismo dei neurotrasmetti-
 tori, etc., è fornita dall'ossidazione del glucosio con produzione di
 fosfati ad alta energia. L'adenosintrifosfato (ATP), il più impor-
 tante prodotto del metabolismo ossidativo del glucosio, viene sin-
 tetizzato nella quantità di 38 molecole per ogni molecola di gluco-
 sio. In condizioni di anaerobiosi, la fosforilazione ossidativa del
 glucosio è sostituita dalla glicolisi, con produzione di acido lattico e
 solo il 5% di energia potenziale. La riduzione di substrati ad alto
 contenuto energetico da una parte e la produzione di acido lattico
 dall'altra innescano importanti modificazioni del metabolismo cel-
 lulare con alterazioni dell'omeostasi ionica: il blocco della pompa
 del sodio provoca l'ingresso e l'accumulo di sodio nel compartimento
 intracellulare e di potassio in quello extracellulare; il calcio,
 rilasciato dai mitocondri e dal reticolo endoplasmico liscio (REL),

attiva le fosfolipasi che aggrediscono i componenti fosfolipidici delle membrane cellulari e liberano acidi grassi che, a loro volta, vengono metabolizzati a prostaglandine, trombossani e leucotrieni, con effetti lesivi sulle cellule nervose. I metaboliti tossici dell'ossigeno peggiorano il danno cellulare, completando così il processo di necrosi neuronale.

Alterazioni strutturali conseguenti all'anossia

La presenza pressoché costante di artefatti istologici, dovuti a fenomeni autolitici postmortali, al tempo di penetrazione del fissativo nel parenchima nervoso e ai vari metodi di inclusione, sezione e colorazione dei preparati istologici, ha per molti anni ostacolato la conoscenza delle autentiche alterazioni strutturali del neurone dovute a ipossia, soprattutto di quelle più precoci. La disponibilità di modelli sperimentali di ischemia ha permesso di colmare questa lacuna con la fissazione immediata del tessuto con la perfusione *in vivo* e di studiare i quadri lesionali prodotti da un insulto ischemico di diversa durata. Si è così potuto stabilire che il danno anossico-ischemico procede per stadi differenti di evoluzione (Kreutzberg *et al.*, 1997).

La *microvacuolizzazione* rappresenta la lesione più precoce ed è difficilmente identificabile nel tessuto autotipico. La cellula nervosa mantiene in genere forma e dimensioni normali, più raramente il nucleo ed il citoplasma possono apparire lievemente raggrinziti. Il corpo cellulare contiene vacuoli di circa 2 µm di diametro, costituiti da mitocondri e cisterne di REL rigonfi e dilatati (fig. 1). Il fenomeno della vacuolizzazione è riscontrabile più precocemente nell'ippocampo e nei neuroni della corteccia cerebrale.

La *lesione cellulare ischemica* si manifesta con un raggrinzimento globale della cellula. Il nucleo è intensamente colorato, coartato, talora di forma triangolare; il citoplasma assume una colorazione scura con il cresil-violetto e nettamente eosinofila con la ematossilina-eosina. Le caratteristiche tintoriali del citoplasma correlano, all'indagine ultrastrutturale, con la dispersione del materiale ribosomiale dei corpi di Nissl. Alla periferia del soma neuronale e dei den-

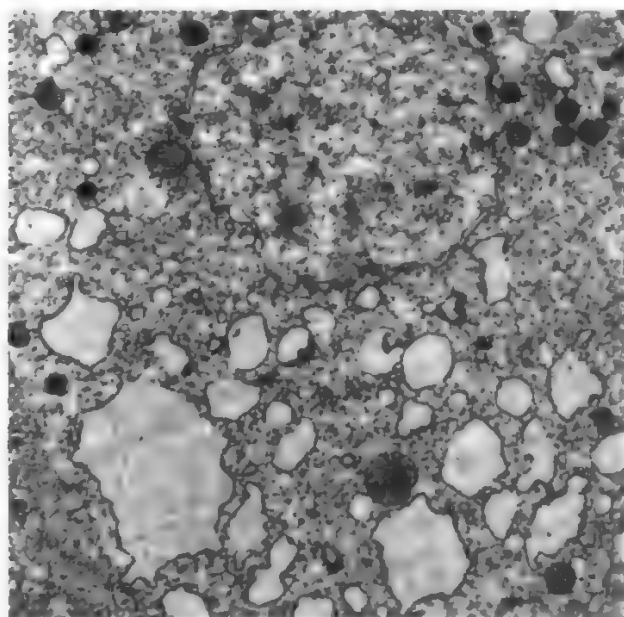


Fig. 1. Micrografia elettronica di un neurone in fase precoce di sofferenza ischemica: la vacuolizzazione citoplasmatica è legata al rigonfiamento degli organuli intracitoplasmatici.

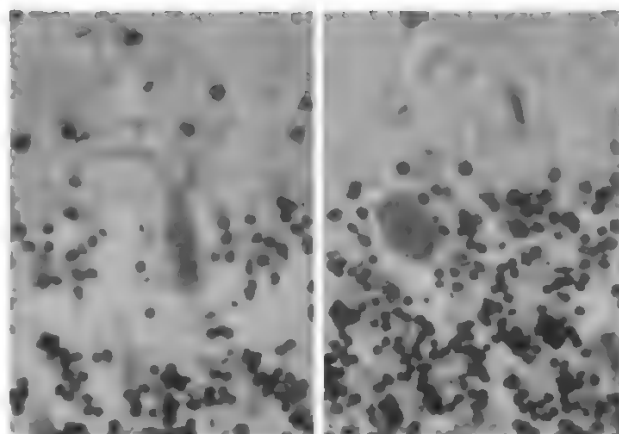


Fig. 2. Focolaio anossico nel cervelletto (a sinistra) e sezione di controllo (a destra): i segni della lesione omogeneizzante sono ben evidenti nella cellula di Purkinje. (Ematossilina-eosina).

driti, compaiono strutture dense e scure, che conferiscono al neurone l'aspetto «incrostato». Esse sono costituite da porzioni del pericario e dei dendriti compresse e distorte da processi astrocitari rigonfi. La distribuzione di tali alterazioni è casuale ed è riscontrabile su tutte le aree della corteccia.

La *lesione omogeneizzante*, descritta da Spielmeyer, è certamente l'alterazione strutturale più nota e rappresenta la fase più avanzata della lesione ischemica del neurone. Essa è caratterizzata, da un punto di vista istologico, da perdita della struttura del citoplasma neuronale che appare uniformemente eosinofilo e da estremo raggrinzimento del nucleo, picnotico o frammentato. Questa lesione può persistere per diversi giorni dopo l'insulto ischemico ed è riscontrabile più frequentemente a carico delle cellule di Purkinje (fig. 2).

La biochimica dell'ischemia cerebrale: il danno neuronale mediato dal glutammato

La ricerca sperimentale sull'ischemia *in vivo* ed *in vitro*, in analogia con studi condotti su alcuni modelli di epilessia, ha dimostrato che parte del danno ischemico è dovuto alla liberazione di mediatori eccito-tossici (Olney, 1986). L'ischemia induce una depolarizzazione delle membrane e un innalzamento della concentrazione del glutammato nello spazio extracellulare. Nell'area ischemica questo innalzamento ha una evoluzione temporale bifasica, con un picco immediato dovuto al rilascio del glutammato dalle sinapsi e uno più tardivo legato al rilascio del glutammato citosolico e al suo ritardato *re-uptake* (Meldrum, 1989).

Il glutammato agisce a livello di diversi tipi di recettori: NMDA (n-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolo acido propionico), cainato e quisqualato. I recettori attivati inducono influsso di sodio e di calcio nella cellula; quest'ultimo, insieme a quello rilasciato dai mitocondri e dal REL, incrementa l'attivazione di enzimi proteinchinasi e la liberazione di acidi grassi e susseguente morte cellulare (Siesjo e Bengtsson, 1989).

Le modificazioni strutturali della cellula nervosa indotte dal glutammato sembrano essere di due tipi:

1. un rigonfiamento immediato dei prolungamenti dendritici e dei processi spinosi, al quale fanno seguito condensazione del citoplasma e picnosi nucleare;
2. la cosiddetta morte neuronale ritardata che compare 3

giorni dopo l'insulto ischemico, caratterizzata da alterazioni del citoplasma che ricordano la cromatolisi centrale (e che per questo hanno fatto pensare a un danno primitivo assonale), le quali evolvono verso il raggrinzamento citoplasmatico, la picnosi nucleare e la lisi cellulare.

La caratterizzazione dei meccanismi molecolari della degenerazione eccito-tossica causata dal glutammato ha costituito il punto di partenza per possibili nuovi approcci farmacologici alla terapia delle malattie ischemiche, la cosiddetta terapia neuroprotettiva. Sono attualmente in atto numerosi studi per la valutazione degli effetti terapeutici di molecole antagoniste dei recettori glutammatergici, sia NMDA che non NMDA, alcune delle quali sembrano efficaci nel ridurre le dimensioni dell'infarto.

La selettiva vulnerabilità all'anossia

Dagli albori della neuropatologia è noto che il neurone è la cellula del sistema nervoso più vulnerabile all'anossia, seguita dagli oligodendrociti e dall'astroglia e che per contro le cellule endoteliali e la microglia sono relativamente più resistenti. È altresì noto che esiste un gradiente di vulnerabilità all'anossia anche tra neuroni e neuroni. L'interpretazione classica del meccanismo della selettiva sensibilità si basava su due ipotesi contrapposte che facevano capo ai grandi maestri della neuropatologia. La teoria vascolare, detta anche di Spielmeyer, invocava fattori anatomici e fisiopatologici per spiegare la vulnerabilità di alcune strutture, mentre la teoria della cosiddetta patoclisi, proposta dai Vogt, attribuiva alle caratteristiche biochimiche e fisico-chimiche delle cellule nervose la particolare sensibilità alla ipossia. L'identificazione del meccanismo della eccito-tossicità oggi permette di spiegare il fenomeno in termini molecolari: i recettori NMDA, cainato e quisqualato hanno una distribuzione cellulare non uniforme ed è stato ipotizzato che la vulnerabilità selettiva di alcune strutture possa essere legata all'espressione differenziata di proteine leganti il calcio e di recettori per il glutammato.

La penombra ischemica

L'espressione «penombra ischemica» indica la zona peri-infartuale del tessuto cerebrale ischemizzato funzionalmente alterata che non è evoluta verso la necrosi. Il meccanismo patogenetico che sottende l'evoluzione della penombra ischemica vede nelle depolarizzazioni ripetute che diffondono dal nucleo infartuale alla zona peri-infartuale il fattore più rilevante (Hossmann, 1994). Nel tessuto in penombra, che non gode di un iperafflusso compensatorio, le depolarizzazioni esauriscono il margine già ridotto di riserve energetiche, aggravano il danno ipossico, con un deterioramento del metabolismo energetico e una soppressione della sintesi proteica che può sfociare nella necrosi. Ancora una volta il glutammato è il mediatore di questo danno e gli antagonisti NMDA e non-NMDA possono preservare dalla necrosi le zone di penombra.

Il ruolo dell'ossido nitrico

Recenti ricerche sperimentali sulla fisiopatologia dell'infarto ischemico hanno assegnato all'ossido nitrico (NO) (v. MONOSSIDO D'AZOTO**) un ruolo patogenetico importante che si svolge probabilmente attraverso un'attività modulatrice del glutammato. Il blocco della sintesi di questo radicale libero ha dimostrato una spiccata capacità a ridurre le dimensioni dell'infarto. Neuroni, astrociti e cellule endoteliali possono produrre NO durante l'ischemia. Il NO prodotto dai neuroni sembra avere una funzione neuroprotettiva in virtù delle sue proprietà vasodilatatorie

(Dalkara, Moskowitz, 1994). Il ruolo del NO quindi è assolutamente complesso e la conoscenza di questi fenomeni appare importante per l'identificazione di eventuali strategie terapeutiche.

La risposta del genoma all'ischemia

Le condizioni di stress cellulare, tra le quali l'ischemia, determinano l'attivazione di diversi geni, fondamentalmente raggruppabili in due famiglie:

1. i geni precoci (*immediate early genes*) che codificano per proteine regolatrici della trascrizione di altri geni. Appartengono a questa classe i protooncogeni *c-fos* e *c-jun*;

2. i geni che codificano per le molecole *chaperon*, quali le *heat shock proteins* (HSPs), che intervengono nel limitare la degradazione di proteine funzionanti esposte a stress. La HSP-72 è espressa nelle cellule endoteliali delle aree gravemente infartuate e nei neuroni delle aree in penombra ischemica; in quest'ultima sede, la HSP-72 è prodotta da cellule nervose metabolicamente compromesse ma comunque destinate a sopravvivere, suggerendo che essa è un componente importante della difesa cellulare e che la sua presenza è indispensabile alla sopravvivenza del neurone dopo un insulto ischemico (Nowack e Jacewicz, 1994).

APOPTOSI

La morte cellulare del neurone può realizzarsi secondo il modello morfologico-biochimico dell'apoptosi (v.**) o quello, ben più conosciuto, della necrosi.

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata che avviene come evento fisiologico durante lo sviluppo e la morfogenesi, che contribuisce al mantenimento dell'omeostasi operando la rimozione di cellule potenzialmente pericolose e che può, per un'inappropriata attivazione, rivestire un ruolo patogenetico in malattie degenerative, neoplastiche ed infettive.

L'apoptosi è un evento cellulare controllato da un programma genetico: comporta l'espressione *de novo* di specifici geni, che attivano (*ced-3*, *ced-4*; *ced* significa *cell death defective*) od inibiscono (*ced-9/BCL-2*) l'innescò del complesso molecolare effettore della morte cellulare, costitutivamente espresso in tutte le cellule animali (Steller, 1995).

Molti segnali, di origine extracellulare e cellulare, concorrono nel determinare l'avvio del programma di apoptosi: interazioni cellulari, fattori di crescita, ormoni, citochine, virus, agenti chimici e fisici.

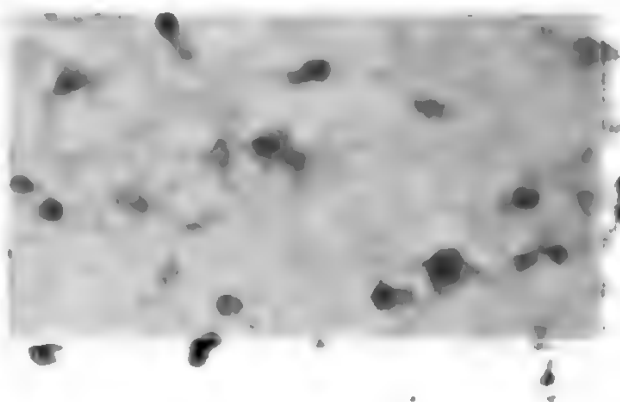


Fig. 3. Neurone con corpi apoptotici multipli. (Ematossilina-eosina).

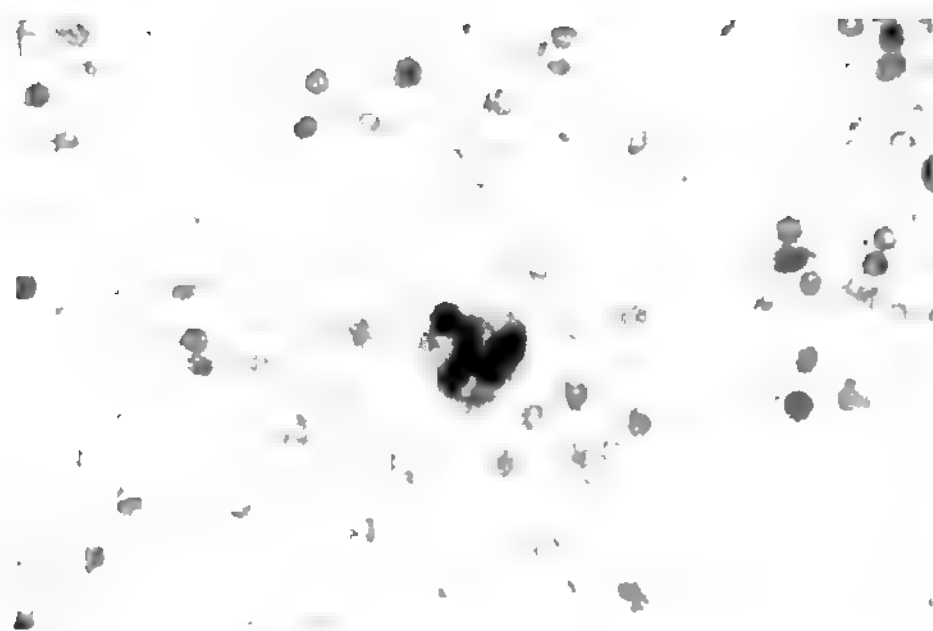


Fig. 4. Corpi apoptotici, evidenziati con la tecnica TUNEL, sono presenti in una cellula di tipo macrofagico.

La caratteristica biochimica essenziale dell'apoptosi è il clivaggio del DNA nucleare a opera di endonucleasi dapprima in grossi frammenti (50-300 Kb) e successivamente in frammenti molto piccoli, oligonucleosomiali.

Morfologicamente è caratterizzata da vescicolazione della membrana nucleare e aggregazione della cromatina in forme diverse man mano procede la degradazione del DNA. L'attivazione di proteasi endogene determina destrutturazione del citoscheletro e una sua disconnessione dalla membrana cellulare con raggrinzimento citoplasmatico e nucleare; gli organelli intracitoplasmatici sono relativamente preservati, così come la membrana cellulare. La cellula apoptotica si frammenta quindi in uno o più corpi apoptotici, delimitati da membrana (fig. 3), che vengono rapidamente fagocitati da cellule macrofagiche (Kerr *et al.*, 1972). Lo sviluppo recente di tecniche di biologia molecolare ha permesso di identificare su sezioni di tessuto le cellule apoptotiche, incorporando code di nucleotidi biotinilati o digossigenati in posizione 3' terminale del DNA frammentato, secondo la metodica TUNEL (*terminal transferase mediate nick end labelling*) o ISEL (*in situ end labelling*) (fig. 4).

Il processo di apoptosi si differenzia da quello della necrosi per diversi aspetti. In primo luogo, i mitocondri appaiono scarsamente coinvolti e non presentano segni evidenti di rigonfiamento. Inoltre, l'integrità della membrana cellulare previene il rilascio di componenti cellulari tossiche e la conseguente risposta infiammatoria. Singole cellule vanno incontro all'apoptosi e non gruppi cellulari. Infine, l'apoptosi è un processo cellulare geneticamente programmato, che richiede l'espressione *de novo* di geni in un delicato bilanciamento tra geni attivatori ed inibitori.

Nella patologia neurodegenerativa, la perdita graduale e selettiva di popolazioni neuronali, in assenza di un'evidente risposta infiammatoria, sembra avvenire, innescata da segnali diversi, secondo la sequenza finale comune dell'apoptosi (Thompson, 1995). Nella malattia di Alzheimer, è la proteina β -amiloide, con la sua conformazione a β -pleated sheet, che determina un danno ossidativo e degenerazione neuronale attraverso l'apoptosi (Loo *et al.*, 1993). Nella forma familiare di sclerosi laterale amiotrofica, legata ad alterazioni del gene che codifica per la superossido-dismutasi Cu-Zn, sembra essere l'accumulo di radicali liberi ad innescare la sequenza apoptotica. Nelle amiotrofie spinali è stato identificato recentemente un gene codificante per una proteina inibitrice dell'apoptosi neuronale (NAIP) che presenta un'elevata omologia con la ben caratterizzata pro-

teina inibitrice dell'apoptosi (IAP) nel *baculovirus*. Nelle malattie da prioni, i frammenti neurotossici della proteina prionica si sono dimostrati sia *in vitro* che in modelli sperimentali, topi infettati dallo scrapie (Giese *et al.*, 1995), esercitare il loro effetto tramite l'apoptosi. Tra la patologia infettiva, l'encefalite da HIV presenta apoptosi nei neuroni, astrociti e occasionalmente nelle cellule giganti multinucleate (Petito, Roberts, 1995); la cascata apoptotica sarebbe attivata dalla proteina virale gp 120. Nella sclerosi multipla, aspetti di apoptosi sono stati osservati nei linfociti T e negli oligodendrociti, ai margini delle lesioni demielinizzanti floride. Nei tumori cerebrali, i gliomi a elevata aggressività e i neuroblastomi presentano un'intensa espressione di BCL-2, molecola che conferisce alla cellula la resistenza ad entrare in apoptosi; tale dato sembra suggerire che l'elevata cellularità neoplastica è sostenuta sia da un marcato indice replicativo che da un ridotto tasso di morte cellulare. Infine, persino nei processi ischemici, in una fase tardiva ed alla periferia della lesione, i neuroni sembrano morire con l'aspetto morfologico dell'apoptosi (Kabelitz *et al.*, 1993).

PATOLOGIA DEL CITOSCHELETRO NEURONALE

Premessa

Il citoscheletro (v.**) è una struttura altamente organizzata, costituita da una rete di interconnessioni tra proteine strutturali (microtubuli e filamenti) che costituiscono la struttura neuronale e forniscono la trama per il trasporto intracellulare ai processi dendritici ed assonali. Essendo la sintesi proteica limitata al soma cellulare, il trasporto assicura il trofismo e l'apporto energetico degli assoni ed è indispensabile per la trasmissione sinaptica. Il citoscheletro è altamente dinamico e gli adattamenti strutturali e funzionali si realizzano attraverso un rimaneggiamento della struttura proteica a opera di enzimi fosforilasi e fosfatasi che regolano lo stato di fosforilazione delle proteine strutturali (Sotelo, Triller, 1997).

I *microtubuli* hanno un diametro di 25 nm e sono costituiti da dimeri di due polipeptidi, α e β tubulina; le «proteine associate ai microtubuli (MAP)» promuovono l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli e provvedono all'interazione dei dimeri di tubulina con gli altri componenti del citoscheletro. La proteina tau è la MAP specifica del compartimento assonale; il suo legame ai microtubuli è controllato da una fosforilazione post-traslazionale. L'immunocistochemica riconosce solo la forma fosforilata della proteina che è il costituente principale dei cosiddetti *paired helical filaments* (PHF).

I *neurofilamenti* sono filamenti intermedi, di 8-10 nm di diametro, responsabili della modulazione del calibro assonale. Essi sono costituiti da tre subunità peptidiche (leggera-NFL 68 kDa, media-NFM 160 kDa e pesante-NFH 220 kDa); i trimeri sono assemblati nel soma e trasportati quindi in questa forma lungo l'assone dove interagiscono con le altre proteine del citoscheletro.

I *microfilamenti* sono segregati alla periferia dell'assoplasma a stretto contatto con l'assolemma. Le dimensioni sono comprese tra i 6 e gli 8 nm. L'actina è il costituente principale; altre proteine sono necessarie per il *cross-linking* dei singoli filamenti di actina (spectrina, fodrina) e di questi con la membrana plasmatica (talina, vinculina), così come per l'assemblaggio (profilina, gelsolina, villina, etc.) e la stabilizzazione della forma polimerizzata (tropomiosina) (Bamburg, Bernstein, 1991).

In alcune malattie degenerative a evoluzione cronica del sistema nervoso si realizzano alterazioni nella struttura del citoscheletro con formazione di lesioni istologicamente caratteristiche che sono indicative di specifiche alterazioni.

Degenerazione neurofibrillare (DNF)

La DNF è descritta come *neurofibrillary tangle* (NFT) nel pericario, come *neuropil threads* (NTs) nei dendriti (Barrak H. e Barrak E., 1988), come «neuriti distrofiche associate alle placche» negli assoni. È definitivamente accertato che la DNF è causata dalla deposizione di proteina tau abnorme-



Fig. 5. Demenza di Alzheimer: DNF a fiamma in una cellula piramidale dell'ippocampo, intensamente positiva con anti-NFH fosforilati. (PAP).

mente fosforilata: tutte le sei isoforme presenti nell'uomo contribuiscono alla formazione dei PHF (Goedert *et al.*, 1992). È possibile comunque che frammenti dei neurofilamenti concorrano alla composizione delle DNF (Perry *et al.*, 1985). Allo studio istologico classico appare come un accumulo di materiale argentofilo che si organizza in grossi e tortuosi tralci intracellulari. A seconda della localizzazione, dello stadio evolutivo e del tipo di neurone affetto, presenta una morfologia estremamente eterogenea: a fiamma (fig. 5), globoide, a matassa di lana, etc. All'ultrastruttura i tralci sono costituiti da strutture filamentose appaiate, a decorso elicoidale con un diametro di 220 nm e una torsione con restringimento di calibro ogni 800 nm; per questo vengono denominati PHF (*paired helical filaments*) (fig. 6). Occupando la maggior parte del citoplasma neuronale, essi dislocano il nucleo e gli organelli alla periferia. Frammisti ai PHF si osservano filamenti rettilinei e materiale amorfo.

La DNF, insieme con le placche senili, è la principale lesione della demenza di Alzheimer, dove interessa particolarmente nelle prime fasi l'allocorteccia e la neocorteccia temporo-parietale con una predilizione per le cellule piramidali. La DNF si osserva tuttavia anche nel-

l'invecchiamento fisiologico, nella malattia *Parkinson-dementia complex*, nella demenza dei pugili, nella demenza a corpi di Lewy e nella paralisi sopranucleare progressiva.

Degenerazione granulo-vacuolare

Selettivamente localizzata nel corno di Ammone, è così denominata per la presenza nel citoplasma delle cellule piramidali di vacuoli di 3-5 μm di diametro contenenti una o più inclusioni argentofile di 1 o 2 μm . Coesiste spesso con i *tangles* neurofibrillari. Lo studio immunostochimico ha evidenziato che neurofilamenti fosforilati, proteina tau, tubulina e ubiquitina concorrono alla composizione della lesione. La copresenza di più componenti del citoscheletro con l'ubiquitina, all'interno di inclusioni delimitate da membrana, suggerisce che si tratti di strutture lisosomiali autofagiche, atte alla degradazione dei componenti del citoscheletro (Okamoto *et al.*, 1991).

Corpi di Lewy

I corpi di Lewy a morfologia classica, come si osservano nei nuclei pigmentati del tronco encefalico, sono inclusioni intranucleari sferiche, di 8-30 μm di diametro, costituite da un nucleo centrale ialino ed eosinofilo e da un sottile alone periferico pallido (fig. 7). I corpi corticali appaiono come una struttura eosinofila omogenea di forma talora bilobata o angolare, spesso priva della corona periferica. Strutture allungate o serpiginose, spesso a morfologia bizzarra, di analogo significato sono inoltre descritte a livello dei processi neuronali o alla periferia del soma cellulare. All'indagine ultrastrutturale i corpi di Lewy appaiono costituiti da una densa rete di neurofilamenti, variamente associati a mitocondri, profili membranosi, lipofuscina, neuromelanina e materiale amorfo. Dal punto di vista molecolare, le tre subunità proteiche dei neurofilamenti, sia in forma nativa che fosforilata, rappresentano la componente principale di tutte le varianti dei corpi di Lewy (Trojanowski *et al.*, 1993). Si ritiene che la formazione di queste inclusioni avvenga attraverso una serie di modificazioni post-traslazionali dei neurofilamenti, quali l'assemblaggio e la fosforilazione, l'ubiquitinizzazione (fig. 8) e la proteolisi. È stato suggerito che i corpi di Lewy svolgano un ruolo citoprotettivo, rappresentando la controparte strutturale di tentativi di salvare la cellula esposta a *noxae* croniche subletali, attraverso una riorganizzazione del citoscheletro che faciliti la proteolisi (Lowe *et al.*, 1990).

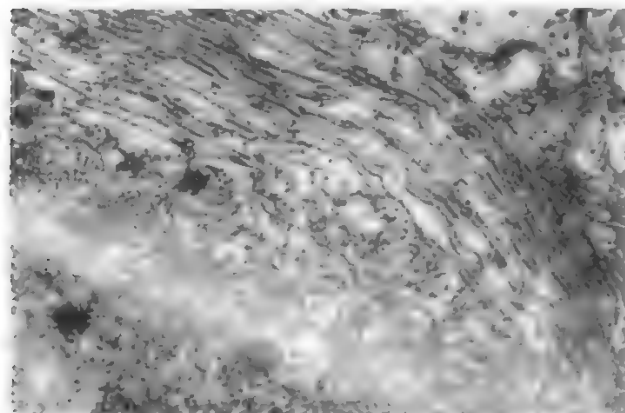


Fig. 6. Demenza di Alzheimer: micrografia elettronica di strutture fibrillari di tipo PHF in una DNF.

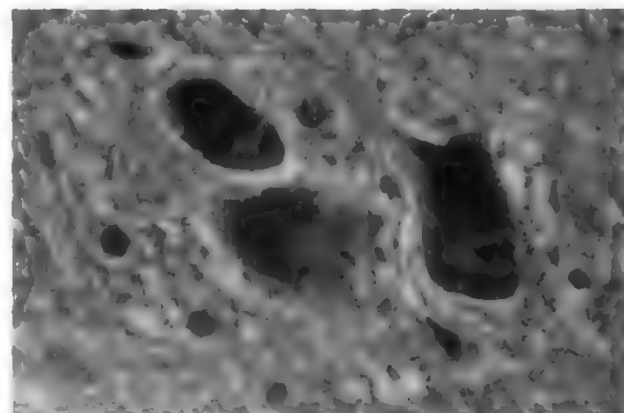


Fig. 7. Malattia di Parkinson: corpi di Lewy in un neurone pigmentato, colorato con metilalumina-cosina.

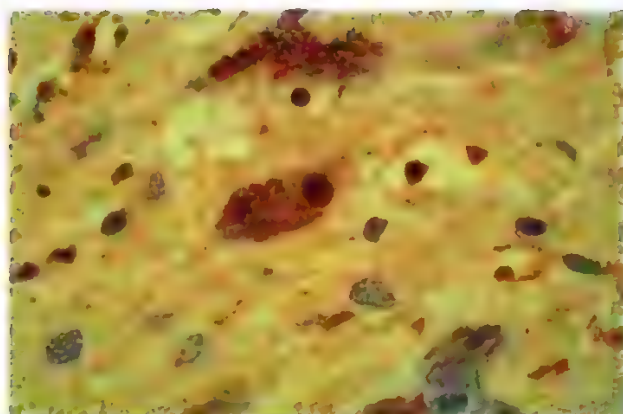


Fig. 8. Malattia di Parkinson: corpo di Lewy intensamente immunoreattivo per ubiquitina. (PAP).

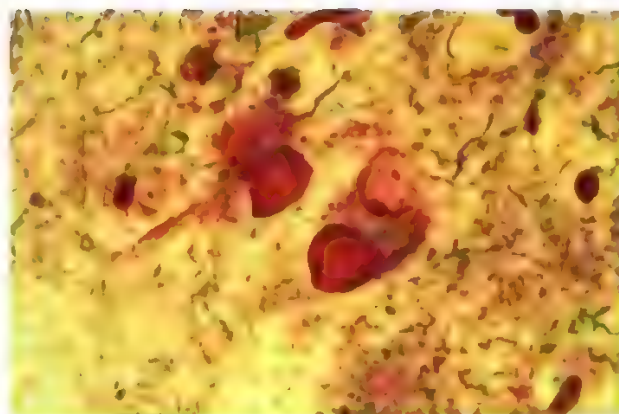


Fig. 10. Demenza di Pick: corpi di Pick in neuroni della corteccia frontale (impregnazione argéntica).

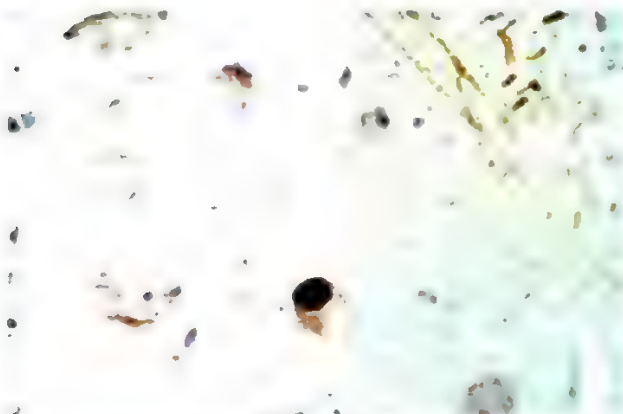


Fig. 9. Atassia-teleangiectasia: corpo di Lewy immunoreattivo per antiNF in neurone pigmentato del locus coeruleus. (PAP).

I corpi di Lewy furono descritti per la prima volta agli inizi del secolo in associazione alla malattia di Parkinson e da allora rappresentano, accanto alla perdita di neuroni dopaminergici della sostanza nera, il *marker* della malattia. In seguito, sono stati osservati in numerose altre patologie degenerative, quali la paralisi sopranucleare progressiva, le malattie del motoneurone, l'atassia-teleangiectasia (fig. 9), la malattia di Hallervorden-Spatz e la demenza di Alzheimer sporadica e familiare. In anni recenti (Gibb *et al.*, 1987; Kosaka *et al.*, 1994), la diffusa presenza di corpi di Lewy a livello della corteccia cerebrale e dei gangli della base è stata associata a una nuova entità sindromica, denominata «demenza senile a corpi di Lewy». La frequente coesistenza in questa patologia di lesioni tipiche della malattia di Alzheimer, quali *tangles* e placche neuritiche, ha indotto a coniare il termine di «variante a corpi di Lewy della malattia di Alzheimer».

Corpi di Pick

Sono inclusioni intracitoplasmatiche, di forma rotonda od ovalare, di diametro compreso tra 10 e 15 μm , eosinofile e intensamente argirofile che si osservano solo nelle cellule piramidali della corteccia temporale e, in minor grado, frontale (fig. 10). All'indagine ultrastrutturale appaiono privi di

una membrana e formati da accumuli di filamenti lineari e PHF, frammenti a corpi multivescicolari, mitocondri, frammenti di reticolo endoplasmico e ribosomi (Murayama *et al.*, 1990). Dal punto di vista biochimico, sono costituiti da neurofilamenti fosforilati, proteina tau, tubulina, ubiquitina ed αB cristallina, una molecola *chaperon* che stabilizza i componenti del citoscheletro. Deposizione di materiale con analoga composizione e proprietà morfologiche e ultrastrutturali caratterizza le cellule di Pick, nelle quali l'accumulo citoplasmatico determina la scomparsa della sostanza di Nissl e lo spostamento eccentrico del nucleo, così da conferire alla cellula un aspetto «ballonato».

I corpi di Pick e le cellule di Pick rappresentano il *marker* istologico della demenza fronto-temporale descritta da Pick alla fine del secolo scorso. Tuttavia, sia i corpi che le cellule di Pick non sono un reperto costante negli encefali con malattia di Pick; i primi occorrono con una frequenza del 20%, i secondi nella metà dei casi: entrambi non correlano con la gravità della perdita neuronale e della gliosi, né con il grado di atrofia macroscopicamente rilevabile. Occasionalmente, inoltre, possono essere osservati in corso di malattia di Alzheimer, degenerazione cortico-basale, paralisi sopranucleare progressiva e malattia di Creutzfeldt-Jakob. Si tende attualmente a considerarli uno stadio non obbligatorio del processo neurodegenerativo.

Inclusioni filamentose neuronali a composizione non definita

Inclusioni costituite da filamenti ancora non ben caratterizzati ed associati a deposizione di ubiquitina sono presenti nella sclerosi laterale amiotrofica (v. **; SLA).

La malattia colpisce selettivamente i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale, dei nuclei dei nervi cranici, e, in minor misura, della corteccia motoria. È caratterizzata da perdita neuronale, gliosi e dalla presenza di tre tipi di inclusioni. Quella a «matassa», la più comune, è costituita da ciuffi di materiale filamentoso (Leigh *et al.*, 1988). Le inclusioni reminiscenti dei corpi di Lewy sono ialine, voluminose, rotondeggianti e a margine sfrangiato. All'esame ultrastrutturale appaiono come un aggregato composto da filamenti lineari distribuiti in modo caotico e da granuli. I corpi di Bunina infine sono piccole inclusioni eosinofile, rotonde, allungate o nastriformi, presenti isolatamente od organizzate a catena di rosario.

Le inclusioni sono presenti sia nelle forme sporadiche che familiari di SLA e si osservano già nelle fasi precoci della

malattia. È tuttora controversa la loro genesi. Recentemente, in alcuni casi di malattia sporadica, sono state identificate mutazioni nel gene codificante per la subunità pesante dei neurofilamenti. Inoltre, nella forma familiare, associata a mutazioni dell'enzima superossido-dismutasi Cu-Zn (SOD-1), sono state evidenziate degenerazioni neurofibrillari a composizione chimica e caratteristiche ultrastrutturali distinte dalle DNF tipiche della malattia di Alzheimer (Orrell *et al.*, 1995). Un tentativo di formulare un'ipotesi unitaria ha trovato supporto nei modelli sperimentali con animali transgenici: l'alterazione molecolare dei neurofilamenti, derivante da un cambiamento della sequenza aminoacidica primaria o da un'azione dei metaboliti tossici normalmente smaltiti da SOD-1, determinerebbe una destrutturazione del trasporto assonale (Bruijn e Cleveland, 1996).

AMILOIDOSI CEREBRALI

Introduzione

Amiloidosi (v.*; v. anche AMILOIDE DEGENERAZIONE*) è il termine che descrive un accumulo patologico di materiale con determinate proprietà tintoriali. L'amiloide ha un aspetto amorfo, intensamente eosinofilo con l'istologia classica; presenta una birifrangenza verde-mela alla luce polarizzata dopo colorazione con Rosso Congo o giallo-verde alla fluorescenza dopo colorazione con Tioflavina-S. Dal punto di vista chimico-fisico, l'amiloide ha un'elevata insolubilità. Le proteine che la compongono hanno una configurazione β -sheet e una struttura fibrillare, non ramificata, di 70-100 nm di diametro. La composizione chimica dell'amiloide è estremamente varia e attualmente sono state identificate 18 proteine con peso molecolare, cariche elettrostatiche, composizione e sequenza aminoacidica differenti ma con la capacità di formare una struttura stabile β -cross. L'amiloidosi caratterizza differenti stati patologici del sistema nervoso centrale.

Demenza di Alzheimer

È la causa più frequente di demenza e la forma più comune di amiloidosi cerebrale (v. ALZHEIMER, MALATTIA DI [v.; v.*; v.**]). Nel cervello, particolarmente nell'ippocampo, l'amiloide si accumula in sede extracellulare, a livello delle pareti di capillari e arteriole, configurando il quadro dell'angiopatia amiloidotica cerebrale (AAC) e, a livello del neuropilo, sottoforma di placche parenchimali.

Le placche assumono forme diverse: la placca senile, o placca neuritica classica, è costituita da un nucleo di fibrille amiloidotiche delimitato alla periferia da dendriti distrofici, neuriti rigonfi e destrutturati con accumuli di mitocondri degeneranti, lisosomi e PHF, processi astrocitari e microgliali (fig. 11). La placca non neuritica, o diffusa, è detta anche placca benigna poiché non altera le strutture e le funzioni del neuropilo circostante. È formata da amiloide in assenza di neuriti patologici. La placca diffusa potrebbe essere uno stadio che precede quello della placca neuritica. Alternativamente, l'amiloide della placca diffusa sarebbe prodotta dai neuroni, mentre le fibrille di amiloide della placca neuritica proverrebbero da microglia, cellule perivascolari e cellule muscolari lisse, nelle quali la coproduzione di proteine *chaperons* determinerebbe la fibrillogenesi dell'amiloide stessa (Kosikowski *et al.*, 1996). La placca *burnt-out* è costituita esclusivamente dal nucleo compatto della placca neuritica.

Il materiale «proteico» che si accumula nell'Alzheimer è in gran parte costituito da un peptide idrofobico di circa 40 aminoacidi, di 4 kDa, denominato peptide β -amiloide o β A4. Esso è costitutivamente prodotto da cellule del S.N.C., come neuroni, astrociti e microglia, e deriva dal clivaggio proteolitico endosomiale/lisosomiale di una pro-

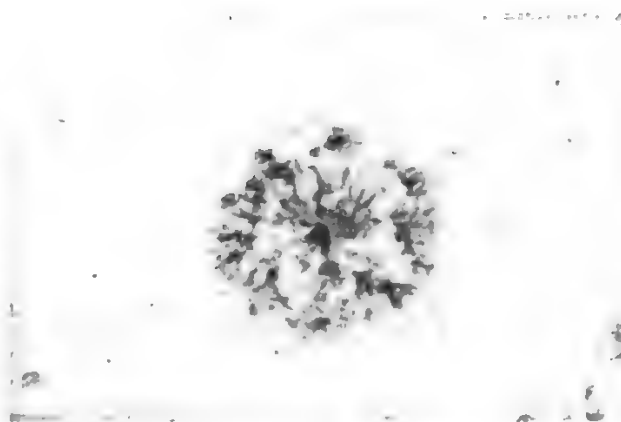


Fig. 11. Demenza di Alzheimer: voluminosa placca neuritica maturata immunopositiva con β -amiloide. (PAP).

teina più grande, di 100-140 kDa, detta proteina precursore della β -amiloide (β -APP). Trattandosi di una glicoproteina transmembrana, è stata ipotizzata per essa una funzione di comunicazione cellula-cellula o cellula-matrice. Il gene codificante è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 e, per *splicing alternativo* (v.**), dà origine a numerose isoforme di varia lunghezza (695, 750, 771 aminoacidi). L'amiloide vascolare è un frammento di 39-40 aminoacidi, mentre l'amiloide delle placche è composta da 42 aminoacidi e presenta un'eterogeneità aminoterminale elevata. Ciò riflette una processazione differenziata di APP a opera di endopeptidasi tessuto-specifiche. L'ipotesi attualmente più accreditata per spiegare l'accumulo patologico di β amiloide è che più geni concorrano a un metabolismo alterato della β APP, intervenendo a livello di espressione, processazione, aggregazione e degradazione della proteina e inducendo così un cronico squilibrio tra produzione ed eliminazione (Selkoe, 1994).

Angiopatia cerebrale congofila (ACC)

Il processo di deposizione di amiloide nelle pareti vasali coinvolge selettivamente le arteriole corticali dell'encefalo e del cervelletto e le arterie meninge (fig. 12). Se ne distinguono varie forme etiologiche.

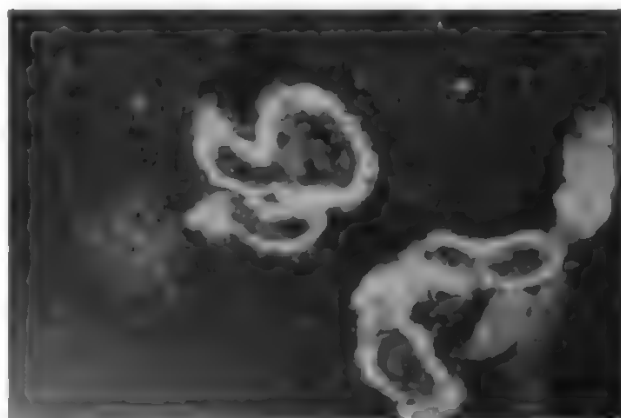


Fig. 12. ACC: fluorescenza dei depositi di amiloide nelle pareti dei vasi (colorazione Tioflavina-S).

L'emorragia cerebrale ereditaria con amiloidosi tipo islandese è una rara malattia autosomica dominante che provoca emorragie cerebrali fatali in giovani adulti normotesi; la proteina amiloidogenica è la cistatina C, di 120 aminoacidi, appartenente alla famiglia delle proteasi inibitrici cisteiniche ed è espressa prevalentemente dagli astrociti. La proteina mutata, il cui gene è localizzato sul cromosoma 20, è priva dei primi 10 residui aminoacidici rispetto alla proteina nativa e contiene una sostituzione non conservativa al codone 68. Recentemente questa forma è stata inserita nelle amiloidosi primarie sistemiche, essendo coinvolti altri organi, quali linfonodi e milza.

L'emorragia cerebrale ereditaria con amiloidosi tipo olandese si associa a una mutazione puntiforme al codone 693 del gene che codifica per la β -APP, e determina una sostituzione aminoacidica in posizione 22 nella sequenza della β -amiloide.

L'angiopatia cerebrale amiloidotica sporadica è caratterizzata da deposizione di β -amiloide identica a quella isolata nell'Alzheimer e non è associata a mutazioni della cistatina C o β -APP. In analogia con alcune forme di demenza di Alzheimer familiare, i geni candidati sono quelli per l'apolipoproteina E (ApoE) sul cromosoma 19 e per le preseniline (PS-1 e 2) sui cromosomi 14 ed 1.

L'amiloidosi oculoleptomeningea (Goren *et al.*, 1980), a ereditarietà autosomica dominante, è caratterizzata da deposizione di amiloide limitatamente ai vasi meningeali e retinici. Si osserva un grave e diffuso depauperamento neuronale in assenza di amiloide parenchimale o vascolare intracerebrale. La collocazione nosografica di questo raro fenotipo è controversa; viene considerato o una forma sistemica con un insolito selettivo coinvolgimento cerebrale o una variante delle neuropatie familiari amiloidotiche, con deposizione di amiloide nel corpo vitreo e nel nervo ottico.

Nelle ACC, l'amiloide si accumula sotto forma di piccoli depositi a livello della giunzione tra la tunica media e l'avventizia, progressivamente avvolge e separa le singole cellule muscolari lisce che vanno incontro a processi degenerativi. Negli stadi avanzati la tunica media è sostituita da materiale fibrillare e le cellule muscolari lisce non sono più riconoscibili; intorno ad essa vi è un anello di amiloide disposta radialmente. Le cellule endoteliali con la loro membrana basale permangono integre (Coria *et al.*, 1996). L'infiltrazione della parete vasale conduce ad alterazioni strutturali con microaneurismi, obliterazioni parziali o complete del lume vasale ed infine necrosi fibrinoide della parete. Si

osservano inoltre modificazioni reattive nel neuropilo perivascolare con ipertrofia astrocitaria e formazione di densi plessi fibrosi attorno alle arteriole affette, proliferazione microgliale e accumulo di cellule della serie monocito-macrofagica.

Nella variante olandese e in quella sporadica l'amiloidosi vascolare si associa alla presenza di placche amiloidotiche (fig. 13) e *tangles* neurofibrillari. L'amiloide vascolare e delle placche potrebbe avere un'origine diversa, rispettivamente dalle cellule muscolari lisce e dai neuroni (Lippa *et al.*, 1993). Alternativamente è possibile che l'accumulo parenchimale sia secondario all'invasione del neuropilo da parte delle fibrille di amiloide vascolare (Peers *et al.*, 1988).

Malattie da prioni

È un gruppo di malattie causate dalla deposizione di un'isoforma anomala (PrP^{Sc}) della proteina prionica cellulare (PrP^{C}), che presenta una transizione della struttura secondaria da α -elica a β -sheet e un *core* ($\text{PrP}27-30$), resistente alla proteinasi K.

La PrP^{C} è codificata da un gene (*PRNP*) localizzato sul braccio corto del cromosoma 20 ed è costitutivamente espressa in molti tessuti con un livello particolarmente elevato nei neuroni. La PrP^{Sc} si forma per alterazioni geniche (mutazioni puntiformi o inserzioni) nelle forme ereditarie, autosomiche dominanti, o in seguito al contatto con proteine prioniche alterate che provengono da tessuto cerebrale umano affetto (forme trasmissibili iatrogene) o, come recentemente suggerito, da animali affetti con Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE; forme trasmissibili alimentari) (v. ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI**). Nella maggior parte dei casi, tuttavia, le malattie da prioni sono sporadiche, con meccanismi patogenetici non ancora chiariti.

Nella *malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)*, autosomica dominante, la deposizione di amiloide avviene sotto forma di placche amiloidotiche multicentriche, costituite da un nucleo centrale voluminoso di amiloide, circondato da aggregati più piccoli. Le placche prevalgono nello strato molecolare del cervelletto ed in minor misura nella corteccia e nei gangli della base (Ghetti *et al.*, 1996). In realtà, la distribuzione topografica e l'entità dei depositi di amiloide varia a seconda della mutazione presente. Costituenti principali dell'amiloide nella GSS sono due peptidi, di 11 e 7 kDa, corrispondenti rispettivamente agli aminoacidi 58-150 e 81-150 della PrP mutata. Contribuiscono alla composizione delle placche altre molecole, per esempio fattori del complemento, apolipoproteina E, eparansolfato e componente P. Nei pazienti più anziani, inoltre, si osserva una colocalizzazione di PrP e β -amiloide.

L'angiopatia amiloidotica cerebrale associata a PrP è un fenotipo clinico-patologico recentemente descritto in un paziente giapponese con demenza. La mutazione *PNRP* interessa il codone 145 ed è una mutazione stop che comporta una proteina troncata in C terminale. La deposizione di amiloide avviene a livello dei vasi leptomeningeali e parenchimali. Coesistono perdita neuronale, gliosi e degenerazioni neurofibrillari; queste ultime, presenti in larga quantità, sono del tutto sovrapponibili a quelle riscontrate nella demenza di Alzheimer e come tali appaiono costituite da PHF e immunoreattive con anticorpi anti-proteina *tau* abnormemente fosforilata.

Nella demenza mioclonica di Creutzfeldt-Jakob le placche di amiloide sono presenti soltanto nel 5-10% dei casi. Esse sono fortemente reminiscenti delle placche caratteristiche del Kuru: di aspetto rotondeggiante, presentano un nucleo centrale omogeneo circondato da fibrille orientate radialmente, eosinofile e PAS positive, immunoreattive con

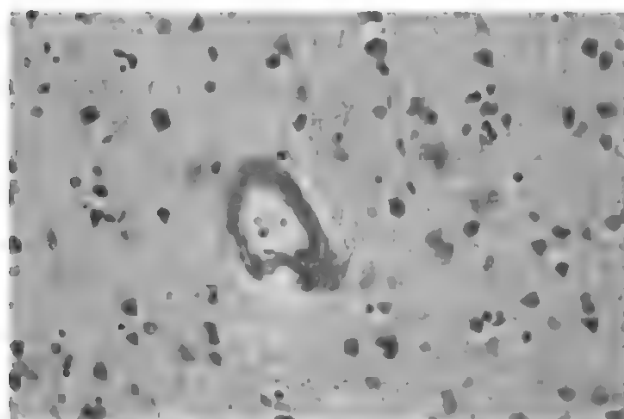


Fig. 13. ACC sporadica: deposizione di amiloide perivascolare e placca diffusa intraparenchimale (colorazione Rosso Congo).

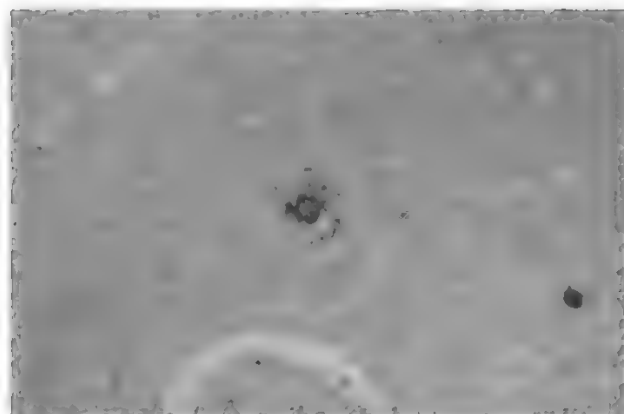


Fig. 14. MDJ: placche di amiloide PrP immunopositive distribuite in corteccia occipitale. (PAP).

anticorpi antiPrP e areattive con anticorpi anti β -amiloide (fig. 14). Sono localizzate prevalentemente nello strato dei granuli della corteccia cerebellare e occasionalmente nella corteccia, talamo e nuclei grigi centrali. La caratterizzazione chimica-fisica della subunità proteica non è ancora nota. Possono coesistere i segni di un'angiopatia amiloidotica, legata alla deposizione di β -amiloide.

Per più ampi particolari, v. sotto col. **4006-4010.

L'INFIAMMAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

La barriera ematoencefalica (BEE)

La barriera ematoencefalica (v. LIQUOR, VIII, 2177-2183; NERVOSO SISTEMA, X, 617-621) rappresenta un'unità anatomo-funzionale che protegge il S.N.C. dall'accumulo di sostanze tossiche provenienti dal circolo. In condizioni fisiologiche, la BEE è praticamente impermeabile alle molecole voluminose e agli elementi corpuscolati, permettendo il passaggio selettivo di acqua, ioni e alcuni metaboliti. Istologicamente è composta da cellule endoteliali strettamente giustapposte per la presenza di *tight junctions* e *zonula occludens*, da una membrana basale e da processi astrocitari, denominati podociti. L'endotelio dei vasi nervosi normali appare privo di attività di trasporto vescicolare (Rapoport, 1976).

In condizioni patologiche, l'alterata permeabilità della BEE permette il passaggio di macromolecole sia per l'apertura delle *tight junctions* endoteliali che per un incremento del trasporto vescicolare.

Il passaggio di cellule infiammatorie appare più complesso e richiede l'intervento di molecole di recente identificazione. La marginazione e la diapedesi delle cellule ematiche, a livello della rete venosa, sono gli eventi iniziali. L'interazione tra cellule infiammatorie e cellule endoteliali è resa possibile da una riduzione delle cariche elettrostatiche sulla superficie luminale delle cellule vasali così da permettere l'ancoraggio dei filopodia linfocitari e dei lamellipodia granulocitari al plasmalemma endoteliale. Le molecole di adesione cellulare, presenti sull'endotelio, forniscono il sito di legame per le integrine distribuite sulla superficie delle cellule infiammatorie. La migrazione delle cellule sembra avvenire attraverso aperture intercellulari o endoteliali prossime alle regioni giunzionali endoteliali (Wisniewski e Losinsky, 1991).

Immunocompetenza della microglia

Le cellule microgliali rappresentano i macrofagi residenti del S.N.C. e costituiscono il 20% della popolazione gliale. L'origine della microglia è stata argomento di numerose controversie e sembra accertato che deriva da cellule precursori del midollo osseo e da una linea monocito-macrofagica che popolano il sistema nervoso dopo

che è stato vascularizzato. Le cellule microgliali presentano un turnover estremamente lento.

La morfologia della cellula varia in funzione della fase di sviluppo, della localizzazione anatomica, dello stato funzionale e di fattori del microambiente nervoso. La cellula ramificata, caratterizzata da prolungamenti citoplasmatici di considerevole lunghezza e complessità, è la forma più frequente di microglia e corrisponde a uno stato funzionale di quiescenza, con un immunofenotipo non attivato. La cellula ameboide, con citoplasma rigonfio e corti processi citoplasmatici, è presente durante lo sviluppo perinatale e nella vita adulta. Orientata in senso fagocitario, rappresenta una forma di transizione tra la cellula ramificata e la cellula macrofagica.

La cellula a bastoncello, così denominata per la forma allungata del nucleo, costituisce la cosiddetta microglia attivata e come tale non presente in condizioni fisiologiche. È una forma di transizione tra la cellula ramificata e la cellula ameboide. Esprime marcatori di superficie immunologici, quali Fc e recettore per il complemento CR3, CD4 e l'antigene comune leucocitario, CD 45, MHC classe I e II; produce inoltre molecole di adesione (Perry e Gordon, 1988). La microglia rappresenta la cellula immunocompetente del S.N.C.:

- ha capacità di presentare l'antigene, esprimendo molecole di classe II del sistema di istocompatibilità (HLA): tale espressione avviene costitutivamente a livelli bassi solo nella microglia della sostanza bianca; a livelli alti avviene induttivamente in corrispondenza sia della sostanza bianca che grigia, così da stimolare i linfociti T antigene-specifici;

- ha proprietà fagocitarie, possedendo molecole recettoriali specifiche per tale funzione, quali Fc, recettori per le immunoglobuline e CR3, che permettono di interagire sia con i complessi immuni che con gli antigeni opsonizzati e lisare le cellule target rivestite dall'anticorpo;

- ha proprietà citotossiche prevalentemente legate al rilascio di citochine proinfiammatorie (IL-1 α e IL-1 β , IL-6, TNF α e TNF β) che stimolano i macrofagi e altre cellule a produrre enzimi proteolitici e idrolitici; a sua volta l'attività citotossica della microglia appare regolata sia da citochine (IL-4 e TGF β 1) che da neurotrasmettitori.

Mediatori dell'infiammazione: molecole di adesione e citochine

Il S.N.C. è stato considerato storicamente un sito immunologico privilegiato, inaccessibile ai linfociti circolanti. Tale presupposto poggiava sull'assenza di un sistema linfatico di drenaggio, sulla bassa espressione di molecole di istocompatibilità, critiche per la presentazione dell'antigene, e sulla rigida selettività della barriera ematoencefalica. In realtà, cellule T attivate, indipendentemente dalla loro specificità antigenica, attraversano la BEE, immunosorvegliano costantemente il S.N.C. e ritornano in circolo. Solo linfociti T specifici per antigeni nervosi permangono nel parenchima cerebrale (Hickey *et al.*, 1991), scatenando una serie di eventi che includono da un lato le molecole di adesione per il reclutamento di altre cellule infiammatorie e dall'altra il rilascio di citochine proinfiammatorie che attivano la microglia, gli astrociti e i macrofagi a livello della sede di lesione.

Le molecole di adesione (v. ADESIONE, MOLECOLE DI**), un insieme eterogeneo di famiglie di ligandi e dei loro recettori, sono presenti prevalentemente sulla superficie delle cellule infiammatorie e sono coinvolte nell'interazione delle cellule infiammatorie tra di loro, di queste con altre cellule, tipo endoteliali, e con componenti della matrice extracellulare (Lassmann *et al.*, 1991). Sulla base della struttura chimica queste molecole vengono classificate in tre gruppi: le integrine, i membri della superfamiglia delle immunoglobuline e le selectine. In condizioni fisiologiche, solo poche molecole di adesione sono costitutivamente espresse, quali le addressine vascolari sull'endotelio venulare, atte a permettere la migrazione transendoteliale delle cellule T aspecificamente attivate; negli stati infiammatori, si instaura un'iperespressione di tali molecole sotto il controllo delle citochine, soprattutto IL-1, IFN- γ e TNF- α , rilasciate dai linfociti T attivati, dai monociti residenti e dalla microglia (Bevilacqua *et al.*, 1985; Bo *et al.*, 1996).

Le citochine (v.**) sono ormoni polipeptidici a funzione immunomodulatrice, che agiscono non enzimaticamente nel regolare numerose funzioni cellulari. Nel S.N.C. vengono espresse non solo dalle cellule infiammatorie attivate, sia linfociti T che macrofagi, ma anche da cellule endogene, quali neuroni, astrociti, oligodendro-

drociti e microglia. Le citochine coinvolte nella patologia nervosa comprendono:

- interleuchine (IL): IL-1 α e 1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10;
- interferoni (IFN): alfa, beta e gamma;
- fattori di crescita e fattori di inibizione: TGF- β (fattore di crescita trasformante), CSF (fattore stimolante le colonie), CNTF (fattore neurotrofico ciliare), LT (linfo-tossina), LIF (fattore inibente leucemia), TNF- α (fattore di necrosi tumorale);
- chemochine: chemochine α ad azione chemiotattica specifica per neutrofili e linfociti T e chemochine β per la linea monocito-macrofagica.

Le citochine intervengono nel danno della BEE, nel reclutamento di cellule ematiche infiammatorie e di cellule nervose, come astrociti e microglia, creando un milieu infiammatorio-gliotico (Guillemin *et al.*, 1996). Il rilascio di radicali liberi, frazioni del complemento, amine vasoattive e eicosanoidi amplifica la reazione infiammatoria. Le stesse citochine, in relazione allo stadio evolutivo della flogosi, della localizzazione topografica della lesione e dello stato di attivazione delle cellule bersaglio, possono inibire l'azione citotossica delle cellule coinvolte ed esplicare azione riparativa, stimolando l'astroglia o inducendo gli oligodendrociti alla rimielinizzazione (Merril e Benveniste, 1996).

L'infiammazione nella patologia disimmune

Sclerosi multipla. – È considerata un esempio di malattia umana cronica demielinizzante immuno-mediata che colpisce il S.N.C. (v. SCLEROSI A PLACCHE DISSEMINATE [v.; v.**]). Ricerche estensive condotte su un modello animale, l'encefalite allergica sperimentale (EAE), hanno stabilito definitivamente che il S.N.C. può essere il *target* di un processo autoimmune e sono state utili nel chiarire i meccanismi patogenetici coinvolti in questa patologia umana.

L'esame neuropatologico ha permesso di caratterizzare l'evoluzione delle lesioni che, per la loro netta delimitazione rispetto il parenchima circostante, sono denominate placche. Lo studio immunohistochimico ha contribuito a definire gli assetti di immunoattivazione associati alle diverse fasi.

Placche floride precoci. – Rappresentano l'esordio morfologico del processo di demielinizzazione; hanno margini indistinti e un tipico aspetto infiammatorio. Vi si osserva, da un lato, frammentazione della mielina con risparmio assonale, dall'altro accumulo di numerose cellule mononucleari nel parenchima e a manicotto intorno ai vasi (fig. 15). L'elevata cellularità è determinata sia dai linfociti T CD4⁺/helper che dai macrofagi MHC classe II⁺; vi contribuisce un'intensa proliferazione microgliale con aspetto reattivo, so-

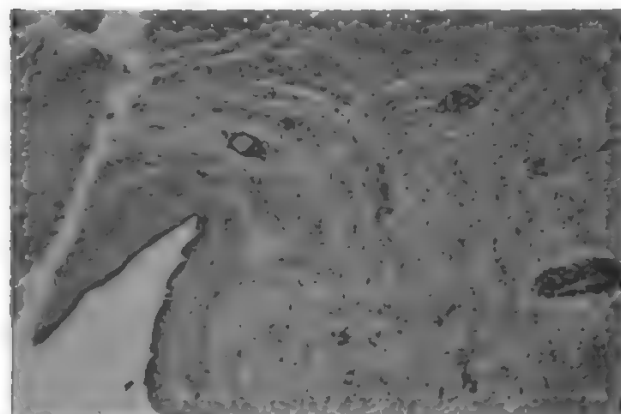


Fig. 15. Sclerosi multipla: ipercellularità ed infiltrazione di cellule ematogene parenchimali e perivascolari in una placca di demielinizzazione florida. (Ematossilina-eosina).

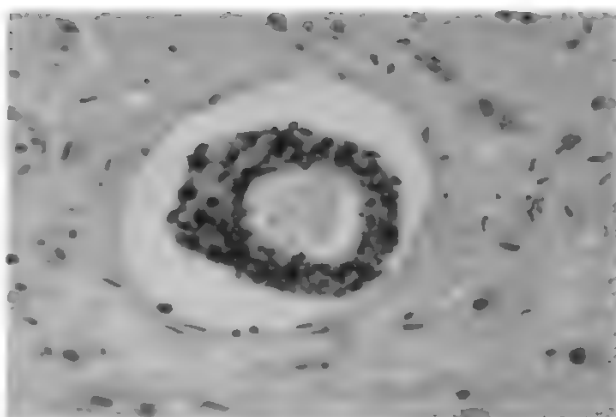


Fig. 16. Sclerosi multipla: infiltrato perivascolare di cellule CD45 positive, marcatore immunologico dei linfociti T. (PAP).

prattutto concentrata ai margini della lesione (Li *et al.*, 1996). I macrofagi/microglia esprimono alti livelli di HLA-DR, di CD45, di ICAM-1, Fc Receptor, CR 1, 3 e 4. Gli oligodendrociti in questa fase sono ancora riconoscibili: infatti, è definitivamente accertato che il bersaglio della attivazione autoimmune è primariamente la mielina e non la cellula produttrice.

Placche floride avanzate. – Il processo di demielinizzazione attiva è terminato e mielina e oligodendrociti non sono più riconoscibili. Predominano i macrofagi sudanofili, ripieni di grassi, vi è marcata proliferazione di astrociti ipertrofici e l'infiammazione è limitata agli spazi perivascolari (fig. 16). La copresenza di macrofagi schiumosi e di linfociti T indica comunque che la lesione è ancora in progressione.

Placche croniche inattive. – Sono aree nettamente demarcate, relativamente ipocellulari, formate da isolati astrociti fibrosi ipertrofici e assoni atrofici immersi in un denso feltro gliale. I macrofagi, se presenti, sono scarsi e dislocati prevalentemente alla periferia. Gli infiltrati linfomonocitari sono assenti e l'unico indice di immunoattivazione è l'espressione di MHC classe II, sia su macrofagi che su microglia ameboidi (Raine, 1994). La presenza di tale molecola, in una placca quiescente, può indicare uno stato di sorveglianza immunologica, sostenuto da citochine proinfiammatorie (IL-1, TNF- α e IFN- γ). I margini della placca sono talora ipercellulari con oligodendrociti, astrociti voluminosi e microglia.

Placche croniche attive. – Alla periferia di una lesione cronica e stabilizzata, si può instaurare un focolaio florido di demielinizzazione, che appare come un'area di infiammazione perivascolare e parenchimale associata a demielinizzazione in atto. Coesistono intensa attività macrofagica, ipertrofia gliale ed edema (fig. 17). I macrofagi appaiono voluminosi e ripieni di materiale sudanofilo, formato dai detriti mielini, e partecipano attivamente al processo di demielinizzazione in atto. Il meccanismo della frammentazione della mielina appare coinvolgere le IgG e i recettori Fc localizzati sulla superficie di vescicole, estensione della membrana cellulare, dei macrofagi. I frammenti mielini vengono endocitati in fagosomi e processati in lisosomi terziari. Tale processo di demielinizzazione macrofago-mediata è preceduto dall'accumulo di cellule infiammatorie nel parenchima. La popolazione immunocompetente della placca attiva è costituita al centro della lesione da scarsi linfociti T, molte cellule B e macrofagi MHC-classe II⁺. Al margine della lesione si osservano sparsi nel parenchima

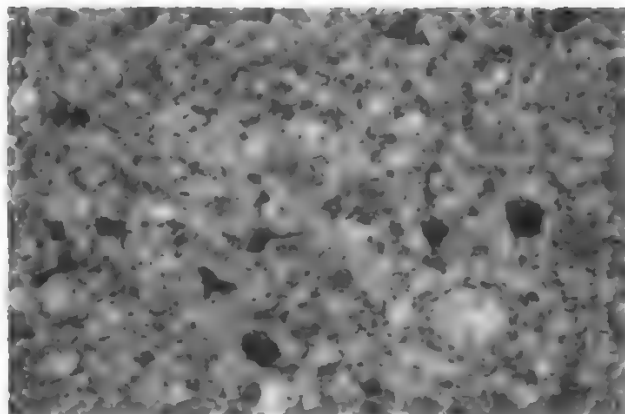


Fig. 17. Sclerosi multipla: focolai di demielinizzazione, ricco di cellule HAM56 positive, marcatore dei macrofagi e di astrociti reattivi GFAP positivi. (PAP e fosfatasi alcalina).

linfociti CD4⁺, talora associati a cellule che presentano l'antigene; i CD8⁺ appaiono sia distribuiti nel parenchima che localizzati intorno ai vasi (Prineas, 1985; Raine, 1997).

Placche ombra. - La genesi di queste placche è stata dibattuta a lungo e attualmente si ritiene che siano la controparte morfologica di tentativi di rimielinizzazione: contengono assoni, anche di grosso calibro, avvolti da guaine mieliniche abnormemente sottili e con internodi corti, immersi in una matrice con segni di gliosi e proliferazione oligodendrocitaria (Prineas e Connell, 1979).

L'infiammazione nella patologia virale

L'encefalopatia da HIV è caratterizzata da pallore diffuso della sostanza bianca e da focolai multipli di infiammazione cronica. Sono presenti attivazione microgliale, astrocitosi reattiva e, analogamente ad altre encefaliti virali, noduli microgliali costituiti da aggregati di cellule a bastoncino. Gli infiltrati linfocitari sono modesti, verisimilmente in relazione alla linfopenia che caratterizza gli stati avanzati della malattia. Nel 30% dei casi sono presenti cellule giganti multinucleate (Kato *et al.*, 1987); localizzate prevalentemente nella sostanza bianca degli emisferi cerebrali e

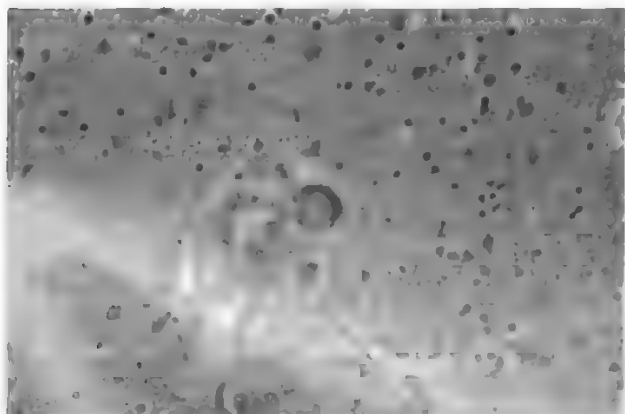


Fig. 18. Encefalite da HIV: cellula gigante multinucleata in posizione perivascolare. (Ematossilina-eosina)

nella sostanza grigia dei nuclei centrali, a distribuzione perivascolare o isolate nel parenchima, sono cellule con un abbondante citoplasma eosinofilo che presentano dislocati alla periferia un numero di nuclei compreso tra 2 e 20 (fig. 18). Insieme alla dimostrazione nei macrofagi/microglia di trascritti o di traslati dell'HIV, tali cellule sono considerate indispensabili per porre diagnosi di encefalopatia HIV correlata. Le cellule giganti traggono origine dalla fusione di cellule della serie monocito-macrofagica, probabilmente per azione della proteina virale di superficie gp 120. È stato ipotizzato che il virus penetri nel S.N.C. attraverso i monociti circolanti, i quali si differenziano in macrofagi nel parenchima cerebrale (ipotesi del cavallo di Troia); la differenziazione stessa promuoverebbe la replicazione virale e le cellule giganti, macrofagi e microglia costituirebbero un reservoir virale.

Le cellule infettate possono trasmettere il virus ad altre cellule microgliali ed anche agli astrociti; l'interazione macrofagi-astrociti produce citochine, in particolare TNF- α e IL-1 β , e metaboliti arachidonici. Il rilascio di queste molecole comporta proliferazione gliale e danno neuronale, mediato da aminoacidi eccitatori e dall'attivazione dei loro recettori (Lipton, 1992; Dickson *et al.*, 1993; Epstein e Gentelman, 1993).

Bibliografia

- ISCHEMIA CEREBRALE - APOPTOSI - PATOLOGIA DEL CITOSCHELETRO NEURONALE - AMILOIDOSI CEREBRALI - L'INFIAMMAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE
- Bamburg J. R., Bernstein B. W., *Actin and actin-binding proteins in neurons*, in Burgoyne R. D. ed., *The neuronal cytoskeleton*, 1991, Wiley-Liss, New York.
- Bevilacqua M. P., Pober J. S., Wheeler M. E. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1985, **121**, 394.
- Bo L., Peterson J. W., Mork S. *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, **55**, 1060.
- Braak H., Braak E., *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 1988, **14**, 39.
- Brujin L. L., Cleveland D. W., *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 1996, **22**, 373.
- Coria F., Rubio L., *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 1996, **22**, 216.
- Dalkara T., Moskowitz M. A., *Brain Pathol.*, 1994, **4**, 49.
- Dickson D. W., Lee S. C., Mattiace L. A., Yen S.-H. C., Brosnan C., *Glia*, 1993, **7**, 75.
- Epstein L. G., Gentelman H. E., *Ann. Neurol.*, 1993, **33**, 429.
- Ghetti B., Piccardo P., Frangione B. *et al.*, *Brain Pathol.*, 1996, **6**, 127.
- Gibb W. R. G., Esiri M. M., Lees A. J., *Brain*, 1987, **110**, 1131.
- Giese A., Groschup M. H., Hess B., Kretschmar H. A., *Brain Pathol.*, 1995, **5**, 213.
- Goedert M., Spillantini M. G., Cairns N. J., Crowther R. A., *Neuron*, 1992, **8**, 159.
- Goren H., Steinberg M. C., Farboody G. H., *Brain*, 1980, **103**, 473.
- Guillemin G., Boussin F. D., Le Grand R. *et al.*, *Glia*, 1996, **16**, 71.
- Hickey W. F., Hsu B. L., Kimura H., *J. Neurosci. Res.*, 1991, **28**, 254.
- Hossmann K. A., *Brain Pathol.*, 1994, **4**, 23.
- Kabelitz D., Pohl T., Pechhold K., *Immunol. Today*, 1993, **14**, 338.
- Kato T., Hirano A., Liem J. F., Dembitzer H. M., *Acta Neuropathol.*, 1987, **73**, 287.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R., *Br. J. Cancer*, 1972, **26**, 239.
- Kosaka K., Yoshimura M., Ikeda K., Budka H., *Clin. Neuropathol.*, 1994, **5**, 185.
- Kreutzberg G. W., Blakemore W. F., Graeber M. B., *Cellular pathology of the central nervous system*, in Graham D. I. and Lantos P. L. eds., *Greenfield's neuropathology*, 1997, Arnold, London.
- Lassmann H., Rossler K., Zimprich F., Vass K., *Brain Pathol.*, 1991, **1**, 115.
- Leigh P. N., Anderton B. H., Dodson A. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 1988, **93**, 197.
- Li H., Cuzner L., Newcombe J., *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 1996, **22**, 207.
- Lippa C. F., Hamos J. E., Smith T. W. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1993, **50**, 1555.
- Lipton S., *Trends Neurosci.*, 1992, **15**, 75.
- Lo D. T., Copani A., Pike C. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 7081.
- Loos J., McDermott H., Landon M. *et al.*, *J. Pathol.*, 1990, **161**, 153.
- Medermott B. J., *Neurosci. Biomed. Res.*, 1993, **29**, 1.

- M. D., Dietrich W. D. eds., *Cerebrovascular diseases*, 1989, Raven Press, New York.
- Merril J. E., Benveniste E. N., *Trends Neurosci.*, 1986, **19**, 331.
- Murayama S., Mori H., Ihara Y., Tomonaga M., *Ann. Neurol.*, 1990, **27**, 394.
- Nowak Jr. T. S., Jacewicz M., *Brain Pathol.*, 1994, **4**, 67.
- Okamoto K., Hirai S., Iizuka T. et al., *Acta Neuropathol.*, 1991, **82**, 340.
- Olney J. W., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986, **203**, 631.
- Orrell R. W., King A. W., Hilton D. A. et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1995, **59**, 266.
- Peers M. C., Lenders M. B., Defossez A. et al., *Virch. Arch. A. Pathol. Anat.*, 1988, **414**, 15.
- Perry G., Rizzuto N., Autilio-Gambetti L., Gambetti P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 3916.
- Perry V. H., Gordon S., *Trends Neurosci.*, 1988, **11**, 273.
- Petito C. K., Roberts B., *Am. J. Pathol.*, 1995, **146**, 1121.
- Princeas J. W., Connell F., *Ann. Neurol.*, 1979, **5**, 22.
- Princeas J. W., *The neuropathology of multiple sclerosis*, in Vinken P. J., Bruyn G. W., Klawans H. L. eds., *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 47, 1985, North Holland, Amsterdam.
- Raine C. S., *Demyelinating diseases*, in Davis R. L., Robertson D. M. eds., *Textbook of Neuropathology*, 1997, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Raine C. S., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, **53**, 328.
- Rapoport S. I., *Blood-Brain Barrier in Physiology Medicine*, 1976, Raven Press, New York.
- Selkoe D. J., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1994, **5**, 438.
- Siesjö B. K., Bengtsson F., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1989, **9**, 127.
- Sotelo C., Triller A., *The central neuron*, in Graham D. I. and Lantos P. L. eds., *Greenfield's neuropathology*, 1997, Arnold, London.
- Steller H., *Science*, 1995, **267**, 1445.
- Thompson C. B., *Science*, 1995, **267**, 1456.
- Trojanowski J. Q., Schmidt M. L., Shin R.-W. et al., *Brain Pathol.*, 1993, **3**, 45.
- Wisniewski H. M., Lossinsky A. S., *Brain Pathol.*, 1991, **1**, 89.
- Wisniewski H. M., Wegiel J., Kotula L., *Neuropathol. applied Neurobiol.*, 1996, **22**, 3.

NICOLÒ RIZZUTO E TIZIANA CAVALLARO

ENCEFALOMIOPATIE MITOCONDRIALI

Introduzione

Le encefalomiopatie mitocondriali (v. MITOCONDRI*; MITOCONDRI**; MITOCONDRIALI ENCEFALOPATIE ED ENCEFALOMIOPATIE**) comprendono un gruppo clinicamente eterogeneo di malattie legate ad un'alterazione primitiva dei sistemi enzimatici deputati al metabolismo ossidativo e alla respirazione cellulare. Biochimicamente possono essere suddivise in: difetti del trasporto di substrati (deficit di carnitina-palmitoil transferasi); difetti dell'utilizzazione dei substrati (deficit di piruvico carbossilasi, piruvico deidrogenasi, e della beta-ossidazione); difetti del ciclo di Krebs (deficit di fumarasi); difetti dell'accoppiamento ossidazione-fosforilazione (malattia di Luft) e difetti della catena respiratoria (Di Mauro e Wallace, 1993).

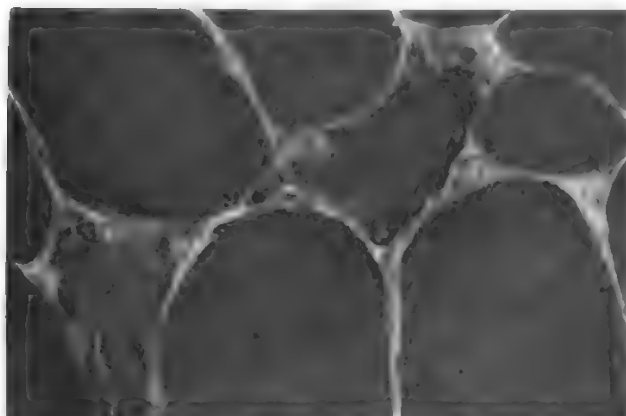


Fig. 19. Sindrome di Kearns-Sayre: presenza di fibre rosse stracciate (RRF) nel muscolo. (Reazione tricomica modificata di Gomori).

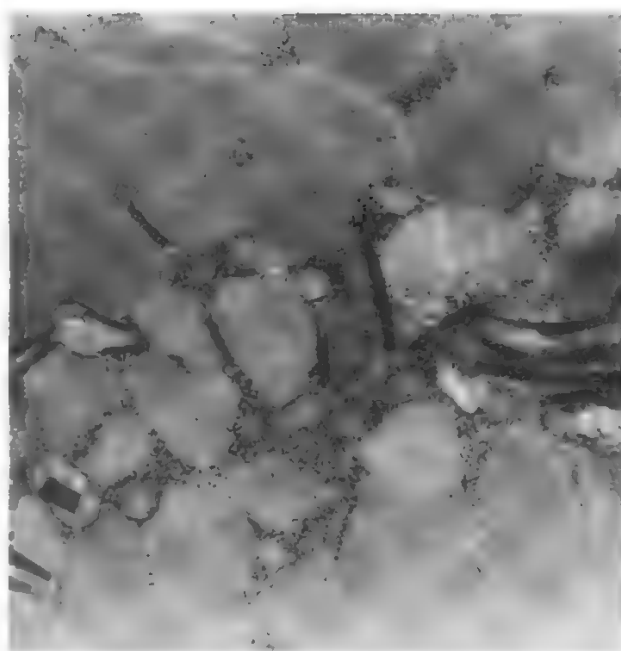


Fig. 20. MERRF: micrografia elettronica di proliferazione di mitocondri con inclusioni paracrystalline.

I difetti della catena respiratoria sono i più frequenti e fenotipicamente eterogenei, in rapporto alla complessità genetica della catena respiratoria. I complessi che la compongono (NADH-deidrogenasi-complesso I, succinato ubiquinone-reduttasi-complesso II, ubiquinol citocromo c reduttasi-complesso III, citocromo c ossidasi-complesso IV, ATP sintetasi-complesso V) derivano dalla complementazione genetica del genoma nucleare e del genoma mitocondriale. L'ereditarietà può essere quindi mendeliana, autosomica, recessiva o dominante, o matrilineare legata al DNA mitocondriale. Nonostante la buona correlazione tra genotipo e fenotipo, fenotipi simili sono stati associati a classi di alterazioni genetiche diverse. È il caso, per esempio, della sindrome di Leigh che può essere causata da mutazioni del DNA mitocondriale (ATPase 6, tRNA^{Leu(UUR)} o tRNA^{Val}), del gene della piruvico deidrogenasi (forma X-legata) o a geni nucleari della citocromo c ossidasi (forma autosomica recessiva).

Per questo tratteremo le encefalo-miopatie mitocondriali seguendo una classificazione sindromica e non etiologica. D'altra parte, oltre alle entità nosologiche più eclatanti e facilmente riconoscibili, esiste un *continuum* fenotipico pleomorfo con sintomi e segni a carico degli organi e tessuti a maggiore richiesta energetica e quindi più vulnerabili ad alterazioni del metabolismo ossidativo. Sono più colpiti il muscolo scheletrico (oftalmoplegia ed ipostenia prossimale degli arti), il cervello (atassia, retinopatia, atrofia ottica, ipoacusia, ritardo mentale, epilessia, mioclono, episodi tipo stroke), il cuore (blocco di conduzione, cardiomiopatia ipertrofica) e il sistema endocrino (diabete, ipoparatiroidismo, ritardo staturale, gozzo). La compromissione muscolare può essere subclinica e la biopsia muscolare è spesso informativa nonostante la normalità elettromiografica. Il reperto significativo, anche se non specifico, è rappresentato dalle fibre muscolari «stracciate rosse» (ragged-red fibers - RRF) alla reazione tricromica modificata di Gomori (fig. 19). Queste sono associate sempre a mutazioni che colpiscono il DNA mitocondriale alterando le sequenze geniche coinvolte nella sintesi proteica intramitocondriale (delezioni o mutazioni puntiformi dei tRNA o degli rRNA). Viceversa, le RRF sono assenti quando le mutazioni colpiscono i geni strutturali delle subunità della catena respiratoria. Il corrispettivo ultrastrutturale delle RRF è un'abnorme proliferazione di mitocondri, che presentano alterazioni delle *cristae* e inclusioni paracrystalline (fig. 20).

Malattia di Leigh

È una malattia degenerativa dell'infanzia, caratterizzata da fenotipi estremamente variabili. Sono state descritte forme a esordio neonatale con grave acidosi lattica, ritardo delle acquisizioni motorie e dello sviluppo psichico, a evoluzione rapidamente fatale e forme con un decorso più cronico, progressivo, a insorgenza più tardiva, caratterizzate da atassia, oftalmoplegia, ipotonia e debolezza muscolare, disturbi respiratori e ritardo psico-motorio. Il quadro neuropatologico è quello di un'encefalomielopatia subacuta necrotizzante con distribuzione delle lesioni, a carattere simmetrico, in distinte sedi anatomiche. Nel midollo spinale sono interessate le colonne posteriori e i fasci piramidali; nel ponte e nel bulbo il tegmento, i nuclei dei nervi cranici e i nuclei olivari inferiori; nel mesencefalo il grigio periacqueduttale e la sostanza nera; nel cervelletto il nucleo dentato e le connessioni cerebellari; nei gangli basali e nel talamo sia la sostanza bianca che la sostanza grigia. Inoltre vi è un coinvolgimento dei nervi periferici e frequentemente del nervo ottico. Negli stadi più precoci della malattia, il quadro istologico è caratterizzato dalla spongiosi del neuropilo; seguono lesioni simil-infartuali con astrocitosi e proliferazione capillare (fig. 21).

La presenza di demielinizzazione con relativo risparmio dei neuroni e degli assoni differenzia queste lesioni da quelle secondarie a ipossia/ischemia. Lo studio morfologico del muscolo è normale con l'eccezione del sottotipo legato ad alterazioni del complesso IV della catena respiratoria, nel quale l'analisi istoenzimatica rivela un deficit di espressione della COX (fig. 22).

La diagnosi può essere sospettata in presenza di atassia, di iperlattacidemia e di lesioni talamiche e tronco-encefaliche alla RMN; tuttavia non può prescindere dallo studio biochimico, genetico ed eventualmente patologico.

NARP (Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa)

Questa sindrome, a trasmissione matrilineare, è caratterizzata da neuropatia sensitiva, atassia e retinite pigmentosa. Il difetto genico è stato identificato in una mutazione al nucleotide 8993, sul gene dell'ATPase 6. In seguito, è stato visto che la stessa mutazione può essere responsabile di un fenotipo clinico-patologico di malattia di Leigh (Santorelli *et al.*, 1993). Vi è correlazione diretta tra gravità clinica e percentuale di DNA mutato.

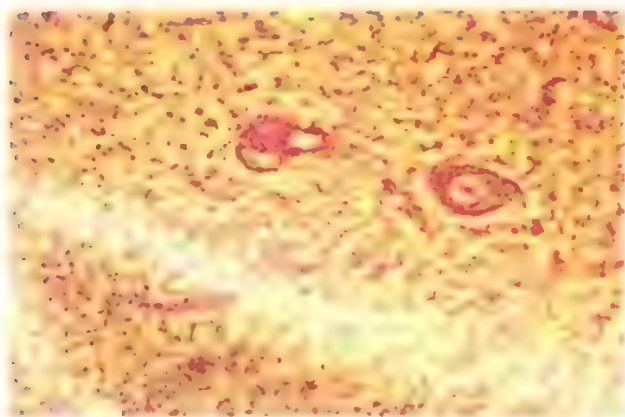


Fig. 21 Malattia di Leigh: focolaio necrotico con proliferazione capillare nel tronco encefalico. (Ematossilina-eosina).



Fig. 22 Malattia di Leigh: assenza di espressione della citocromo C ossidasi in numerose fibre muscolari. (Reazione istoenzimatica per COX).

MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes)

È un acronimo che indica un'encefalomielopatia mitocondriale associata ad acidosi lattica ed episodi tipo stroke. Esordisce in età giovane adulta, prima dei 40 anni, con intolleranza all'esercizio fisico, crisi epilettiche ed episodi tipo stroke, che residuano spesso in emiparesi, emianopsia, cecità corticale, e un progressivo decadimento mentale; la cardiomiopatia è una caratteristica non costante. Il quadro patologico presenta tre tipi di lesioni peculiari (Sparaco *et al.*, 1993):

- focolai multipli di necrosi, in assenza di aspetti di microembolismo e di una distribuzione per territori vasali (fig. 23);

- vasculopatia delle arteriole e dei capillari piali e intraparenchimali con accumulo di mitocondri morfologicamente alterati a livello dei miociti lisci, dei periciti e delle cellule endoteliali; tale alterazione è ben evidente anche con la reazione istoenzimatica per la succinico-deidrogenasi (SDH) nella biopsia muscolare (fig. 24) (Tokunaga *et al.*, 1994);

- calcificazioni dei gangli della base.

Il difetto biochimico è stato individuato nel complesso I della catena respiratoria ed è legato a mutazioni puntiformi del tRNA^{leu} ai nucleotidi 3243 e 3271.

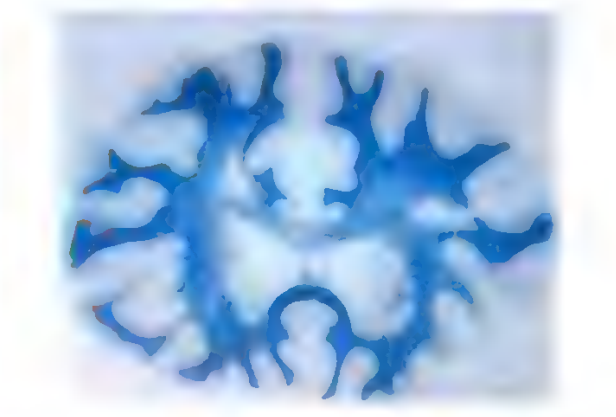


Fig. 23 MELAS: focolai multipli di necrosi. (Colorazione di Weigert modificata).

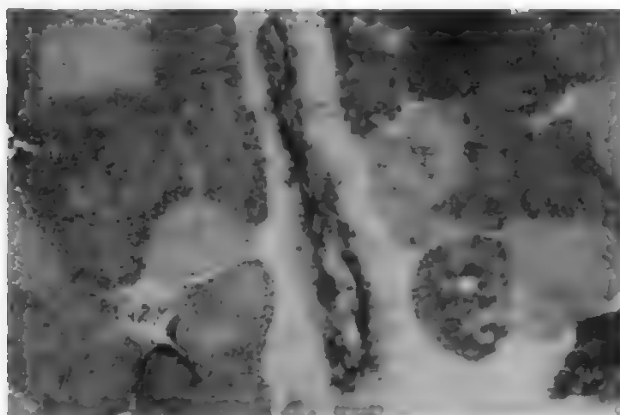


Fig. 24. MELAS: intensa reazione a zolle per la succinico-deidrogenasi in un vaso muscolare. (Reazione istoenzimatica per SDH).

MERRF (Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers)

L'epilessia mioclonica associata a *ragged-red fibers* è una malattia trasmessa per via matrilineare, legata a mutazioni del tRNA^{Leu} al nucleotide 8344 e, più raramente, 8356. La presenza di mutazioni in un gene RNA transfer e di difetti multipli nella catena respiratoria suggerisce un'alterazione nella traduzione del DNA mitocondriale (Zeviani, 1991).

Il fenotipo clinico caratteristico include epilessia mioclonica, atassia cerebellare e miopatia mitocondriale con RRF: demenza, sordità, cardiomiopatia, atrofia ottica e neuropatia sono stati riportati in alcune famiglie. Il quadro morfologico si caratterizza per una selettiva perdita di neuroni a livello del nucleo dentato e del nucleo olivare inferiore. Demielinizzazione e gliosi astrocitaria si osservano inoltre a livello cerebellare, soprattutto nei peduncoli cerebellari superiori, e a livello midollare nei cordoni posteriori.

Sindrome di Kearns-Sayre (KSS)

È una malattia sporadica, colpisce entrambi i sessi ed è legata a riarrangiamenti del DNA mitocondriale, sottoforma di delezioni di larghe porzioni del genoma o, più raramente, di inserzioni. Esordio sotto i 20 anni, retinite pigmentosa e oftalmoparesi progressiva rappresentano la triade caratteristica; a questi sintomi si possono associare segni cerebellari, disturbi del ritmo cardiaco con predisposizione a blocchi cardiaci letali ed un contenuto liquorale di proteine superiore a 100 mg/dl. La possibilità di una diagnosi molecolare ha permesso di individuare numerose forme spurie di malattia, invariabilmente associate ad oftalmoparesi esterna progressiva. Sul piano morfologico si osserva il quadro di un'encefalopatia spongiforme, con vacuolizzazione della sostanza bianca cerebrale e cerebellare; la sostanza grigia è prevalentemente affetta in corrispondenza del tronco encefalico. A livello del midollo spinale sono interessati sia le corna che i cordoni. La degenerazione neuronale colpisce preferenzialmente i neuroni del tronco encefalico e in particolare quelli della sostanza nera, dei nuclei rossi, vestibolari e oculomotori, e i neuroni del cervelletto.

Bibliografia

- Di Mauro S., Wallace D. C., *Mitochondrial DNA in human pathology*, 1993, Raven Press, New York.
Santorelli F. M., Shanske S., Macaya A., DeVivo D. C., Di Mauro S., *Ann. Neurol.*, 1993, **34**, 827.
Sparaco M., Bonilla E., Di Mauro S., Powers J. M., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1993, **52**, 1.

- Tokunaga M., Mita S., Murakami T. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 1994, **35**, 413.
Zeviani M., Amati M., Bresolin N. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, **48**, 203.

NICOLÒ RIZZUTO E TIZIANA CAVALLARO

MALATTIE DA PRIONI

Introduzione

Sono un gruppo di malattie neurodegenerative, denominate encefalopatie spongiformi trasmissibili (v.***) (EST) per la presenza di microvacuolizzazione dei corpi neuronali e del neuropilo e per la possibilità di trasmissione della malattia sia all'uomo che all'animale. La prima forma a essere identificata fu lo *scrapie* nella pecora; recentemente, è stata caratterizzata nei bovini l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE: *Bovine Spongiform Encephalopathy*). La patologia umana comprende: il kuru, la malattia di Creutzfeldt-Jakob, la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker, l'insonnia fatale familiare e l'angiopatia cerebrale amiloidotica correlata alla proteina prionica (PrP-CAA: v. sopra *amiloidosi cerebrali*).

La natura dell'agente trasmissibile è tuttora oggetto di ricerche. Il termine prione, che significa particella infettiva proteinacea, fu coniato per distinguere l'agente infettivo delle EST dai virus convenzionali e per sottolineare che è privo di acidi nucleici (Prusiner, 1982). Secondo tale ipotesi, il prione è la forma modificata di una proteina normalmente espressa nell'uomo e codificata dal gene *PRNP*, posto sul cromosoma 20. Nessuna differenza nella sequenza primaria è stata identificata tra la normale isoforma cellulare della PrP, denominata PrP^C e l'isoforma presente nella malattia, detta PrP^{Sc}. La differenza tra le due proteine risiede in una modificazione post traduzionale, con *shift* dalla struttura ad α elica a quella a β sheet: è stato ipotizzato che l'alterazione conformazionale determini ridotta solubilità della proteina, resistenza alla proteasi, tendenza all'accumulo e le conferisca proprietà di amiloidogenesi. La PrP^{Sc} potrebbe catalizzare il cambiamento conformazionale nella PrP^C agendo come template, così da innescare una reazione a catena che di per sé rappresenterebbe il processo infettivo (Prusiner, 1991). Non è ancora noto se la malattia è legata a una perdita di funzione della PrP o all'acquisizione di una funzione verisimilmente neurotossica.

Nelle forme ereditarie, la molecola di PrP con una delle mutazioni patogene conosciute, va spontaneamente incontro alla trasformazione in PrP^{Sc}.

Le forme sporadiche, le più frequenti, potrebbero essere dovute a mutazioni somatiche e conseguente formazione di una PrP^C mutata in una cellula e nella linea cellulare derivante oppure essere legate all'esposizione a una proteina patogena.

Per più ampi particolari sull'argomento v. ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI** (coll. **1862-1880).

Malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ)

È il sottotipo clinico-patologico più comune delle ESTs; in genere è sporadica, raramente autosomica dominante (10% dei casi), eccezionalmente iatrogena (casi trasmessi con iniezione di ormoni ipofisari estratti da cadaveri affetti, con impianto di cornea o di dura madre).

Nelle forme tipiche di MCJ l'età media di insorgenza è 60+/-9 anni. La durata media della malattia è di 8 mesi: l'80% di pazienti decede entro 12 mesi dall'esordio; il 20% presenta un decorso cronico, con una sopravvivenza di diversi anni. Queste ultime forme possono rappresentare un problema diagnostico sia dal punto di vista clinico che patologico. Classicamente si presenta con un quadro di demenza rapidamente evolutiva e di mioclono, associato ad alterazioni elettroencefalografiche con attività pseudoperiodica patognomica. Possono far parte della sintomatologia atassia cerebellare, disordini extrapiramidali, cecità e disturbi delle vie piramidali. Sulla base del prevalere dell'interessamento di alcuni sistemi neuroassonali, vengono riconosciute alcune varianti:

- variante con prevalente alterazione delle vie visive (sindrome di Heidenhaim);
- variante striatale;

NERVOSO TESSUTO

— variante talamica: attualmente, nella forma familiare, è un'entità a sé stante, denominata Insonnia Familiare Fatale (IFF; v. coll. *6800-6802; v. anche sotto, col. **4009);

— variante cerebellare: comprende molte delle forme jatrogene: in era premolecolare, rientrava in questo gruppo anche la GSS;

— variante panencefalica: si caratterizza per un marcato coinvolgimento della sostanza bianca degli emisferi cerebrali e del tronco encefalico;

— variante con paralisi spastica associata a demenza (sindrome di Worster-Drought);

— variante amiotrofica con debolezza ed atrofia muscolare legate a depauperamento dei motoneuroni delle corna anteriori;

— variante con disturbi dell'oculo-mozione nella quale vi è un marcato coinvolgimento delle vie sovranucleari, reminiscente della paralisi sopranucleare progressiva.

Il quadro neuropatologico è caratterizzato dalla classica triade di degenerazione spongiosa del neuropilo, proliferazione e ipertrofia astrocitaria e depauperamento neuronale.

La degenerazione spongiforme, prevalente nella sostanza grigia corticale e dei gangli della base e nello strato molecolare del cervelletto, è legata a rigonfiamenti dei processi neuronali con formazione di espansioni membranose tipo vescicole e septi multipli, che al microscopio ottico appaiono come vacuoli di 1-5 µm nel neuropilo (fig. 25) e riducono la morfologia neuronale ad un nucleo circondato da un filo di citoplasma. Le alterazioni spongiformi risultano essere strettamente associate alle cellule e si differenziano sia dallo stato spongiotico legato al danno ipossico/ischemico e all'edema, sia dalla vacuolizzazione perineuronale provocata da artefatti di fissazione del tessuto. L'astrogliosi è un reperto costante e si manifesta con proliferazione di astrociti fibrosi (fig. 26), ripieni di filamenti gliali, intensamente immunoreattivi con GFAP (*glial fibrillar acid protein*), che formano un denso feltro gliale. Caratteristicamente manca qualunque forma di risposta infiammatoria. Placche di amiloide simil-kuru sono presenti nel 10% dei casi (v. sopra *amiloidosi cerebrali*).

Il 10-15% dei casi di MCJ sono familiari, con un tratto autosomico dominante, legato a mutazioni puntiformi o inserzioni sul gene PRNP. Più del 60% di questi casi presentano la sostituzione di una singola base al codone 200; questa mutazione, e quelle al codone 178 e 210 sono associate al fenotipo clinico-patologico classico. In realtà, vi sono evi-

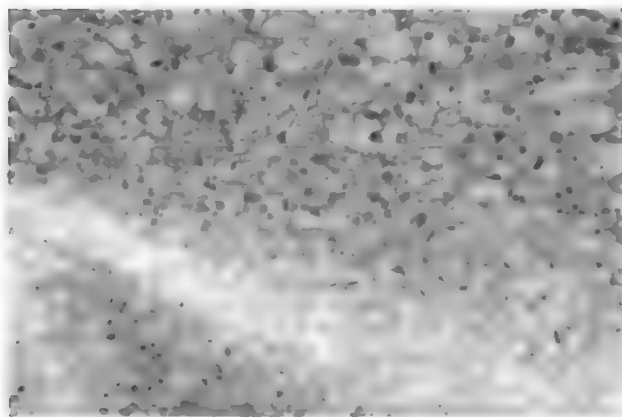


Fig. 25. MCJ: marcata spongiosi del neuropilo e il prominente astrocytico a livello della corteccia occipitale. (Ematossilina-eosina).

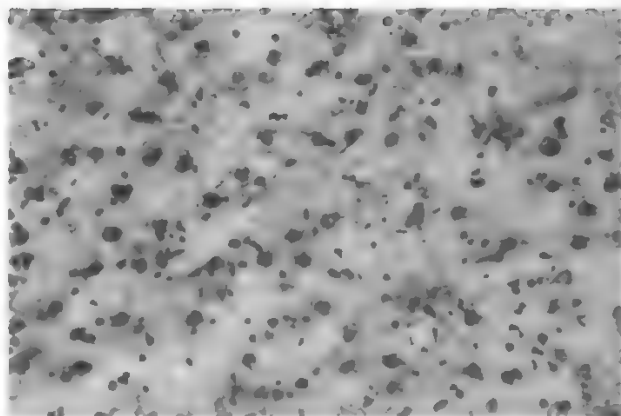


Fig. 26. MCJ: astrocitosi reattiva a livello dei nuclei della base. (Colorazione di Holzer).

denze che il fenotipo è il risultato di complesse interazioni tra le mutazioni patogene e le varianti alleliche al codone 129. La condizione di omozigosi od eterozigosi su questo codone sembra incidere sull'età di esordio e sulla durata della MCJ. Inoltre, è stata riportata una significativa associazione tra la condizione di omozigosi per questo polimorfismo e la suscettibilità a sviluppare la forma jatrogena o sporadica della malattia. Anche il fenotipo patologico risulta condizionato dal codone 129: l'omozigosi per la valina favorisce l'estrinsecarsi delle lesioni prevalentemente a livello dei nuclei grigi centrali, mentre l'omozigosi per la metionina si associa ad alterazioni corticali (MacDonald *et al.*, 1996).

V. CREUTZFELDT-JAKOB, MALATTIA DI** (coll. **1428-1436).

Nuova variante della MCJ

Nel 1995, in concomitanza con il dilagare di un'epidemia di encefalopatia bovina spongiforme (v. ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI**) sono stati segnalati, inizialmente nei Regni Uniti ed in seguito in Francia, alcuni casi di malattia di Creutzfeldt-Jakob con caratteristiche cliniche e patologiche peculiari (Will *et al.*, 1996):

— insorgenza in età giovanile, tra 16 e 41 anni (media: 29 anni) con disturbi prevalentemente di tipo comportamentale e/o psichiatrico. L'ataxia è un segno costante e precoce;

— durata della malattia relativamente prolungata (14,5 mesi);

— elettroencefalogramma anormale ma non caratteristico di CJD;

— quadro neuropatologico dominato dalla presenza massiva di placche simil-kuru, delimitate da un'area di spongiosi, distribuite in tutto il cervello e cervelletto (placche floride); spongiosi, perdita neuronale e astrocitosi colpiscono in modo più grave il talamo ed i gangli della base;

— immunoreattività per PrP atipica: le placche, in quantità ancora maggiore di quanto appaia con l'ematossilina-eosina, sono intensamente positive. Deposizione di PrP si osserva nella corteccia e nello strato molecolare cerebellare con distribuzione perineuronale ed a livello dei gangli della base e del talamo con pattern perivacuolare e sinaptico;

— omozigosi in posizione 129 per metionina.

Sono in corso numerosi studi volti a verificare l'ipotesi che questa forma sia conseguenza della trasmissione dall'animale all'uomo.

Insonnia familiare fatale (IFF)

È una malattia di recente descrizione (Lugaresi *et al.*, 1986), caratterizzata da disturbi del sonno, segni di disautonomia, coinvolgimento del sistema endocrino, secondario all'alterato ritmo sonno-veglia e disturbi del movimento; le funzioni corticali superiori rimangono preservate. Il marker patologico è il depauperamento neuronale associato ad astrocitosi che colpisce selettivamente i nuclei talamici, prevalentemente i medio-dorsali e gli antero-ventrali. Nelle forme di lunga durata, focolai di spongiosi e gliosi sono presenti nella corteccia fronto-parieto-temporale.

La IFF rappresenta la prima malattia nota, nella quale il fenotipo clinico-patologico legato ad una mutazione del gene *PRNP* può essere determinato da un polimorfismo non patogenetico localizzato ad un altro codone dello stesso gene. La mutazione al codone 178, acido aspartico/asparagina, è presente sia in una variante di MCJ familiare che nella FFI; in posizione 129, l'allele valina segrega con la MCJ, mentre l'allele metionina segrega con la IFF. La sostituzione di un aminoacido in tale posizione comporta che le due isoforme di PrP resistente alla proteasi hanno diversa dimensione e glicosilazione (Gambetti *et al.*, 1995).

V. anche SONNO*, *insonnia familiare fatale* (coll. *6800-6802).

Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

È una malattia autosomica dominante, con ampia variabilità fenotipica anche intrafamiliare; esordisce tra la quarta e la sesta decade e ha una durata di 5 anni (*range*: 1-11 anni). Il quadro clinico è caratterizzato nella forma classica da una sindrome cerebello-atassica cronica; questo pattern è legato alla mutazione in posizione 102, che fu la prima evidenziata e che è la più frequente. Il sintomo predominante nelle famiglie con mutazione al codone 105 è la paraparesi spastica mentre i disturbi extrapiramidali segregano con le mutazioni al codone 117 e 198. La demenza si instaura solitamente negli stadi più avanzati della malattia, ma rappresenta il sintomo di esordio nella variante associata a mutazione al codone 145, che dà origine a una proteina troncata; la mutazione al codone 217 si manifesta con disturbi psichiatrici. Dal punto di vista patologico, il reperto morfologico preminente è rappresentato dai depositi di amiloide, immunoreattivi con la PrP (fig. 27), unicentrici o multicentrici (v. sopra *amiloidosi cerebrali*). Coesistono proliferazione gliale e perdita di cellule nervose, responsabile dell'atrofia delle aree affette. La distribuzione topografica e

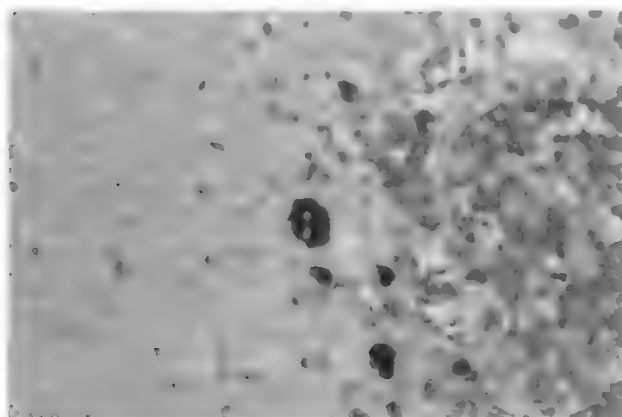


Fig. 27. GSS: placche multicentriche intensamente immunoreattive per PrP nello strato molecolare del cervelletto. (PAP).

l'estensione delle placche varia ampiamente tra le famiglie. La degenerazione spongiforme è di particolare gravità solo nelle forme associate alla mutazione P102. Le famiglie con mutazione ai codoni 198, 217 e 145 sono caratterizzate dalla presenza, accanto alle placche prioniche, di degenerazioni neurofibrillari morfologicamente e biochimicamente simili a quelle della malattia di Alzheimer, a livello della corteccia e dei nuclei sottocorticali (Ghetti *et al.*, 1995).

V. GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHINKER, SINDROME DI** (coll. **2504-2506).

Kuru

Il Kuru (v.) è una malattia descritta in una popolazione tribale della Nuova Guinea (Fore), che colpisce l'1% della popolazione, prevalentemente donne e bambini, legata a pratiche rituali di cannibalismo. Il quadro clinico è quello di una sindrome cerebello-extrapiramidale. Le lesioni, particolarmente evidenti a livello del cervelletto e in minor grado nel tronco encefalico e nella corteccia, consistono nella vacuolizzazione del neuropilo, nella gliosi astrocitaria e nella presenza di placche amiloidotiche, dette placche Kuru.

Bibliografia

- Gambetti P., Parchi P., Petersen R. B., Chen S. G., Lugaresi E., *Brain Pathol.*, 1995, 5, 43.
 Ghetti B., Dlouhy S. R., Giaccone G. *et al.*, *Brain Pathol.*, 1995, 5, 61.
 Lugaresi E., Medori R., Montagna P. *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 1986, 315, 997.
 MacDonald S. T., Sutherland K., Ironside J. W., *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 1996, 22, 285.
 Prusiner S. B., *Science*, 1982, 216, 136.
 Prusiner S. B., *Science*, 1991, 251, 1515.
 Will R. G., Ironside J. W., Zeidler M., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., *Lancet*, 1996, 347, 921.

NICOLÒ RIZZUTO E TIZIANA CAVALLARO

NEUROBLASTOMA [v. Agg. I, coll. *5375-5388]**Biologia e genetica**

Il neuroblastoma [NB], tumore del sistema nervoso periferico, si propone attualmente come una delle neoplasie più affascinanti dal punto di vista genetico e biomolecolare e per la sua capacità espressiva assolutamente eterogenea.

Tipico dell'età pediatrica, il NB può infatti regredire completamente, può maturare fino ad esprimere una neoplasia completamente benigna, quale il ganglioneuroma, oppure, come accade nel 50% dei casi, tendere ad una progressione infausta con disseminazione sistemica a dispetto di terapie anche molto avanzate. Queste differenti modalità di evoluzione hanno determinato l'intensificarsi di studi genetici e biologici, per comprendere se sotto un'unica denominazione fossero in realtà comprese differenti patologie, anche se tutte uniformate sotto il termine di NB. Ciò che oggi emerge è la presenza di diversi tipi di NB, caratterizzati da quadri genetici e caratteristiche biologiche separate, associate in ultima analisi a comportamenti clinici ben distinti e con prognosi diversa.

Alcuni bambini mostrano una predisposizione a sviluppare un NB, che segue modalità ereditarie di tipo autosomico dominante, come evidenziato da Knudson e Meadows (1976) e poi da Kushner *et al.* (1986) successivamente. Ciò suggerisce che alcuni fattori ereditari possono essere importanti nella patogenesi tumorale; anche se una sindrome genetica non è mai stata con certezza correlata con il NB, uno studio di Biegel *et al.* (1993) dimostra che alcuni pazienti presentano una delezione o un riarrangiamento del tratto distale del braccio corto del cromosoma 1 (1p36) e quindi un gene predisponente potrebbe risiedere in questo locus. In particolare, si sospetta che questa regione ospiti

un gene soppressore tumorale, la cui perdita potrebbe conferire o una predisposizione genetica a sviluppare il NB oppure condizionare il carattere progressivo della malattia. Caron *et al.* (1995) hanno individuato due *loci* soppressori contigui deleti, 1p35-36, probabilmente associati con un'amplificazione dell'*N-myc* e quindi con una prognosi sfavorevole. Questa delezione, che rappresenta a tutt'oggi la più frequente caratteristica citogenetica del NB, si riscontra nel 30-50% dei pazienti e nel 90% circa delle linee cellulari derivate e coltivate in laboratorio (dati di Brodeur e Seeger, 1984).

Diversi AA. hanno cercato di identificare il o i geni coinvolti nella delezione dell'1p ed il risultato è stato che attualmente se ne sono mappati circa 15, di cui i principali sono: il gene di controllo del ciclo cellulare, *CDC2L1*, il gene dello zinco, *HKR3*, il recettore per il fattore di necrosi tumorale, *TNFR2*, un gene soppressore tumorale analogo a quello riscontrato nel topo, *DAN*, il gene familiare cosiddetto «paired box», *PAX7*, il gene elongina-A, *TCEB3*, ed il fattore di trascrizione, *E2F2*.

Anomalie di altri *loci* cromosomici sono descritte, ma senza il riscontro delle caratteristiche biologiche o cliniche associate. Si tratta di delezioni del 14q e del 17q. Il riscontro di anomalie genetiche diverse potrebbe quindi avere il significato di una tumorigenesi per stadi multipli.

L'evidenza citogenetica di un'amplificazione genica nel NB è stata riportata già fin dal 1970, ma l'esatta sequenza amplificata è stata descritta solo 10 anni più tardi da Schwab *et al.* (1983). Quest'ultima, denominata *N-myc*, è sita sul tratto distale del braccio corto del cromosoma 2. In una prima analisi, circa il 38% dei tumori primitivi presentano un'amplificazione dell'*N-myc*, strettamente associata, come osservato da Brodeur e Fong (1989), sia agli stadi più avanzati di malattia, sia a tumori capaci di rapida progressione e con cattiva prognosi, indipendentemente dallo stadio dell'NB e dall'età del paziente. A questo proposito si è osservato, che anche se esiste solo un numero ristretto di bambini con stadio favorevole (I, II, IVS) ma *N-myc* amplificato, la loro prognosi diventa sfavorevole. Questi risultati, tratti da *trial* americani che hanno reclutato oltre 3000 pa-

zienti, dimostrano chiaramente che l'amplificazione dell'*N-myc* è un carattere biologico intrinseco di un sottotipo di NB aggressivo, presente già alla diagnosi nel genoma tumorale: in altre parole, tumori senza amplificazione alla diagnosi raramente sviluppano in seguito quest'anomalia.

Sia l'*N-myc* che la delezione dell'1p sono quindi caratterizzati da cattiva prognosi; ciò che resta da definire è se si tratti o meno di variabili prognostiche indipendenti o affini. Poiché la maggior parte dei casi amplificati presentano delezione, mentre non tutti i casi con delezione hanno amplificazione, sembrerebbe che la delezione debba precedere l'amplificazione. In sostanza, o ci si trova di fronte ad un meccanismo di delezione del gene che regola l'espressione dell'*N-myc*, oppure un'anomalia genetica di base determina un'instabilità del genoma, predisponente sia alla delezione dell'1p che all'amplificazione dell'*N-myc*.

Circa il 25% dei bambini affetti da NB ha un'amplificazione e virtualmente tutti questi casi hanno un'espressione molto alta dell'*N-myc* a livello sia delle proteine che dell'RNA. Tuttavia, un alto livello di espressione dell'*N-myc* in tumori non amplificati non appare correlato ad una prognosi sfavorevole. Attualmente, non si hanno prove convincenti che esista la possibilità di attivazione di un altro oncogene differente dall'*N-myc*.

Per quanto concerne la familiarità, gli studi di Maris *et al.* (1997), condotti nel 1996 e 1997 su famiglie con due o più membri affetti da NB, hanno osservato la presenza contemporanea di tale tumore e di malattia di Hirschsprung, entrambe considerate come *neurocristopatie* sia dal punto di vista embriologico che evolutivo. Per tale motivo, sia i fattori neurotrofici che i recettori ad essi associati sono stati studiati a fondo nel NB. Tra di essi, i recettori per la tirosin-chinasi (TRK) sono stati clonati. Il significato clinico delle diverse forme di TRK nel NB ha evidenziato che i pazienti con alti livelli di TRK-A hanno prognosi favorevole (sopravvivenza a 5 anni pari all'86%) al contrario di quelli con bassi livelli (14%). Se si considerano le correlazioni tra TRK-A e *N-myc*, le sopravvivenze a 5 anni sono le seguenti: alta TRK-A e non amplificazione, 87%; amplificazione e bassa TRK-A, 90%. Ma è soprattutto interessante

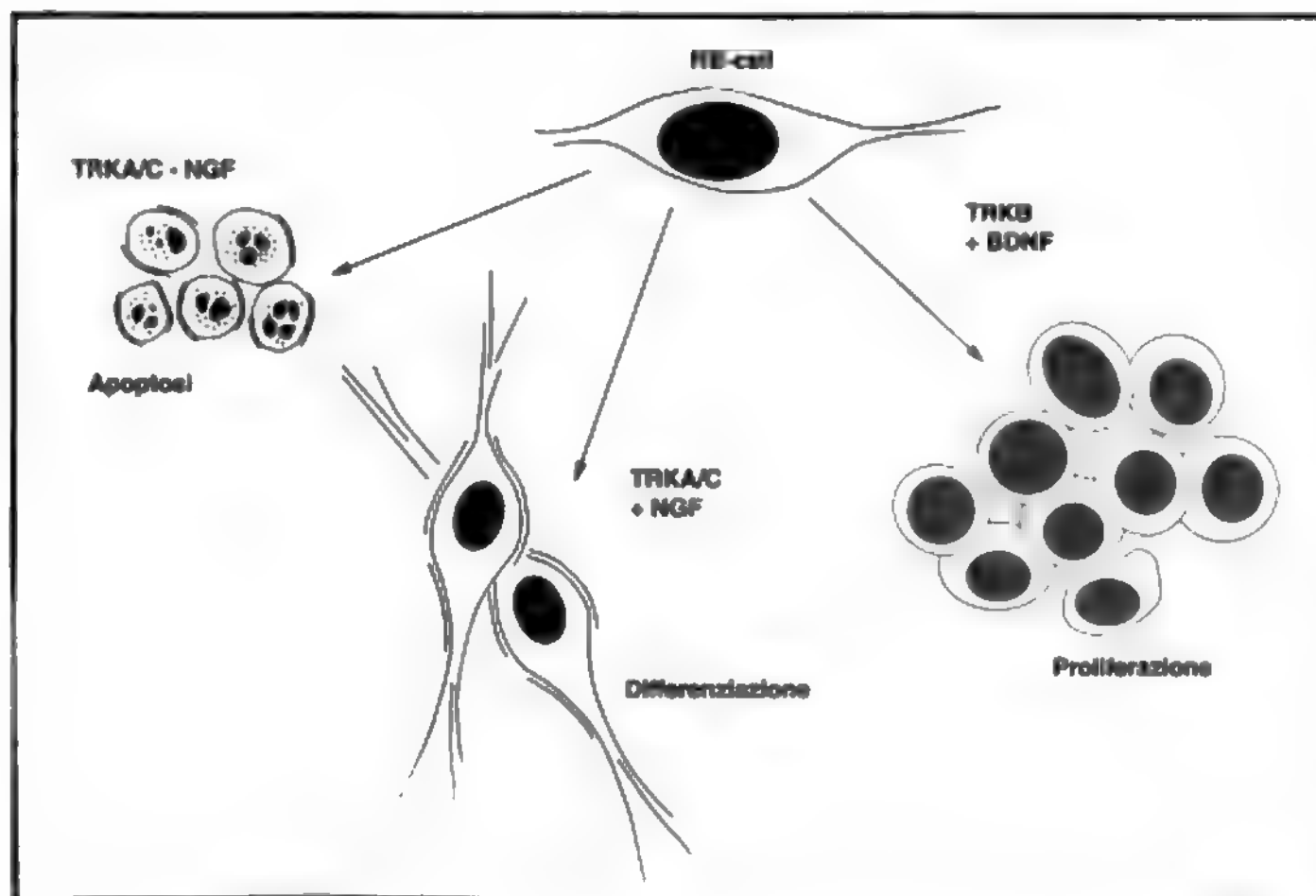


Fig. 1. Evoluzione/involuzione del NB: interazione tra i recettori per la tirosin-chinasi (TRK) ed alcuni fattori di crescita neuronale (NGF, BDNF). Il destino della cellula tumorale *in vitro* muta a seconda dell'espressività di TRK in presenza od assenza di fattori neurotrofici (NGF, BDNF). In particolare, mentre TRK-B esprime un'attiva capacità proliferativa cellulare, massima in presenza di BDNF, i recettori TRK-A/C esprimono un atteggiamento clinico favorevole ed una prognosi migliore: in presenza di NGF le cellule tumorali manifestano *in vitro* una capacità maturativa (evoluzione verso il ganglioneuroma), in sua assenza si ha il massimo grado di apoptosi.

osservare che esiste una correlazione molto forte tra alti livelli di TRK-B ed amplificazione. Al contrario e come per la forma TRK-A, TRK-C si riscontra in prevalenza nelle neoplasie di stadio favorevole ed in NB non amplificati. Potenzialmente, quindi, il destino delle cellule-NB potrebbe dipendere dal quadro di espressione dei recettori per talune neurotrofine (TRK-A, B, C). Gli studi di Yamashiro *et al.* (1996), Tanaka *et al.* (1995) e Nakagawara *et al.* (1994) hanno esaminato proprio tale comportamento: se cellule di NB che esprimono TRK-A/C vengono private *in vitro* di *nerve growth factor* (NGF), vanno incontro a morte cellulare programmata; cellule di NB che esprimono TRK-B in presenza di *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) vanno incontro *in vitro* ad intensa proliferazione; cellule di NB che esprimono TRK-A/C in presenza di NGF o non rispondono oppure si differenziano (maturazione) (fig. 1).

Dal punto di vista cellulare, anche se la maggior parte dei NB ha un corredo cariotipico diploide, non mancano le osservazioni di iperdiploidia: questi bambini, hanno una evoluzione clinica particolarmente favorevole. In contrasto, l'iperdiploidia di un NB che si manifesta in età adulta ha prognosi sfavorevole, così come accade per i NB diploidi di qualsiasi età. La prognosi sfavorevole di questi due gruppi sarebbe legata ad un'alta percentuale di delezioni o traslocazioni.

La citofluorimetria molecolare applicata alle cellule neoplastiche di NB ha dimostrato contenuti assai variabili di DNA senza tuttavia poter attribuire alcun significato clinico a queste diversità.

In conclusione, in base alle caratteristiche biologiche suddette, emergono tre diversi tipi di NB, con le conseguenti implicazioni cliniche, descritte nella tab. I. Il I tipo di NB comprende *N-myc* normale, cariotipo iperdiploide, pressoché assenti anomalie cromosomiche ed alta espressione di TRK-A/C: ad esso corrispondono bambini di età inferiore all'anno, stadio favorevole (I, II) e prognosi fausta. Il II tipo di NB comprende *N-myc* normale, corredo diploide, discreta percentuale di delezioni cromosomiche, bassa espressione di TRK-A/C: ad esso corrispondono bambini di età superiore all'anno, di stadio non inferiore al III, con prognosi intermedia. Il III tipo di NB, amplificato, diploide, con delezione 1p ed alta espressività TRK-B ha una prognosi chiaramente sfavorevole. Il III tipo di NB, diversamente dal II risponde ai protocolli terapeutici solo in modo transitorio, manifestando una progressione rapida ed *exitus* a breve termine.

TAB. I CLASSIFICAZIONE CLINICO-BIOLOGICA DEL NEUROBLASTOMA

Caratteristiche	I tipo	II tipo	III tipo
<i>N-myc</i>	normale	normale	amplificato
Ploidia	iperdiploide	diploide/tetraploide	diploide
1p	< 5%	25-50%	80-90%
TRK-A	alta	bassa	quasi assente
TRK-B	bassa	bassa	alta
TRK-C	alta	bassa	bassa
Età	< 1 anno	> 1 anno	1-5 anni
Stadio	I, II, IVS	III, IV	III, IV
Sopravvivenza a 3 anni	95%	25-50%	< 5%

Bibliografia

- Biegel J. A., White P. S., Marshall H. N. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 52, 176-182.
 Brodeur G. M., Seeger R. C., *Science*, 1984, 224, 1121-1124.
 Brodeur G. M., Fong C. T., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1989, 41, 153-174.
 Caron H., Peter M., van Sluis P. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4, 535-539.
 Kaplan D. R., Matsumoto K., Lucarelli E. *et al.*, *Neuron.*, 1993, 11, 321-331.
 Klein R., Jing S., Nanduri V. *et al.*, *Cell*, 1991, 65, 189-197.
 Knudson A. G. J., Meadows A. T., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1976, 57, 675-682.
 Kogner P., Barbany G., Dominici C. *et al.*, *Cancer Res.*, 1993, 53, 2044-2050.
 Kushner B. H., Gilbert F., Helson L., *Cancer*, 1986, 57, 1887-1893.
 Maris J. M., Chatten J., Meadows A. T. *et al.*, *Med. Pediatr. Oncol.*, 1997, 28, 1-5.
 Nakagawara A., Azar C. G., Scavarda N. J. *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14, 759-767.
 Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K. H. *et al.*, *Nature*, 1983, 305, 245-248.
 Tanaka T., Hiyama E., Sugimoto T. *et al.*, *Cancer*, 1995, 76, 1086-1095.
 Yamashiro D. J., Nakagawara A., Ikegaki N. *et al.*, *Oncogene*, 1996, 12, 37-41.

GUIDO CIPRANDI,
ALESSANDRO INSERRA E CAMILLO BOGLINO

NEUROFIBROMATOSI [v. vol. X, 767-774; Agg. I, coll. *5388-5390]

Nosografia

Le neurofibromatosi (NF: NF1 ed NF2) sono attualmente nosograficamente inserite nel capitolo delle *sindromi neurotumorali ereditarie* (*Hereditary Tumor Syndromes of the Nervous System, HTSNS*) insieme con la sclerosi tuberosa, la malattia di von Hippel-Lindau, il retinoblastoma, la sindrome di Li-Fraumeni, il glioma familiare, la sindrome di Turcot, di Gorlin e di Cowden e le sindromi di neoplasia endocrina multipla (*Multiple Endocrine Neoplasia, MEN*; v. NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE**) (Louis e von Deimling, 1995).

In passato, invece, esse, insieme alla sclerosi tuberosa, l'ataxia-teleangiectasia di Louis-Bar e la malattia di Sturge-Weber, erano state inquadrare come *facomatosi* (v.; André *et al.*, 1987), sulla base di vaghe somiglianze anatomiche e della comune esistenza di un tumore retinico, il *facoma* (tuttavia eccezionale nelle NF e mai descritto nella malattia di Sturge-Weber).

È ormai abbandonata anche la denominazione di *neurocristopatie* secondo la scuola di van Bogaert perché troppo estensiva, in quanto essa verrebbe a comprendere anche una varietà di malformazioni ed errori di sviluppo, attualmente ritenuti non patogeneticamente pertinenti alle HTSNS.

Patogenesi

Le HTNS trovano la loro patogenesi in una alterazione di un proto-oncogene o più frequentemente nell'alterazione di un gene tumore-soppressore (*Tumor Suppressor Gene, TSG*). I TSG sono geni che, in condizioni fisiologiche, inibiscono la proliferazione e la crescita cellulare; la loro inattivazione, causata da particolari mutazioni, può dunque essere responsabile dell'insorgenza o della progressione di neoplasie. Questo meccanismo si verifica anche nella NF1 e nella NF2 (Levine, 1993).

In generale, entrambi gli alleli del TSG devono essere inattivati per potersi verificare uno stimolo oncogenetico: nelle HTSNF, uno degli alleli è inattivato a causa di una mutazione germinale, mentre l'altro viene inattivato in seguito a mutazioni somatiche. Questo meccanismo rende ragione dell'apparente eredità dominante delle HTSNF, benché i TSG mutati si comportino come caratteri ad eredità recessiva. Quindi gli stessi geni la cui mutazione nella linea germinale predispone i pazienti all'insorgenza di par-

NEUROFIBROMATOSI

ticolari tumori sono coinvolti come mutazioni somatiche nei corrispondenti casi sporadici tumorali. Nel caso delle n., i pazienti con mutazioni ereditarie del gene *NF* sono predisposti a meningiomi, schwannomi e gliomi, e il gene *NF* è inattivato anche negli stessi tumori in casi sporadici.

Il gene *NF1* normale (*wild*), di 350 kb con 59 esoni, localizzato sul cromosoma 17p11.2, codifica una proteina di 28118 aminoacidi, detta *neurofibromina*, presente in due isoforme (von Deimling *et al.*, 1995).

Questa proteina, immunostochimicamente associata ai microtubuli, è espressa in tutti i tessuti ed in particolare abbondanza nei tessuti neoplastici nella n. (neuroni e cellule di Schwann).

È stata dimostrata l'esistenza sul cromosoma 21q di uno pseudogene simile a quello *NF1* del cromosoma 17p, ma che non codifica proteine; si è supposto che l'esistenza di simili pseudogeni possa costituire una riserva di mutazioni per il gene specifico e render conto dell'alto tasso di nuove mutazioni di questa malattia (Suzuki *et al.*, 1994).

Un'altra possibilità in questo senso (Bernards e Gusella, 1994) è l'esistenza di mosaicismi genetici a livello germinale, alcuni cloni spermatici essendo mutati ed altri no.

I dati attualmente disponibili dimostrano che il gene (normale) *NF1* agisce come un classico *tumor suppressor*, analogamente per esempio al gene *RB* (v. ANTIONCOGENI**, col. **464) del neuroblastoma. Si ritiene che la neurofibromina agisca come regolatore negativo dell'oncogene cellulare *ras* (o come modulatore dell'attività dello stesso nello sviluppo normale). La funzione regolatrice della neurofibromina sembra risiedere in un proprio dominio fortemente analogo per struttura con il dominio catalitico della proteina attivante la guanosintrifosfatasi (*GTPase-activating protein*, *GAP*) per la proteina p21 codificata dall'oncogene (Hattori *et al.*, 1992). Attraverso la propria attività *GAP*, la neurofibromina blocca l'attività oncogena della proteina p21 controllandone l'azione sull'attività mitotica e sulla differenziazione cellulare, e svolge verosimilmente anche altre attività non correlate alle funzioni della proteina p21, per esempio attraverso l'interazione con i microtubuli.

Il gene (normale) *NF1* può mutarsi attraverso molti meccanismi (mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni, etc.) ed in tal caso (quando entrambi gli alleli siano mutati) la neurofibromina trascritta è incapace di svolgere le suddette funzioni di *tumor suppressor*.

Non vi sono dati sicuri sul modo in cui il genotipo *NF1* produce il fenotipo malato; ai dati della letteratura si aggiunge l'identificazione da parte del nostro gruppo di ricerca di un *growth factor* gliale, sierico, diverso dal *nerve growth factor* (NGF) (Palladini *et al.*, 1994).

Il gene normale (*wild*) della *NF2* è situato sul cromosoma 22q.12 di 110 kb e 17 esoni, di cui uno a *splicing alternativo* (v.**), dando luogo quindi a 2 isoforme della proteina. Il gene *NF2* è espresso praticamente in tutti i tessuti, con espressività particolarmente alta nel cervello fetale (come dimostrato nel topo).

Il prodotto codificato dal gene *NF2* è una proteina della famiglia della proteina 4.1 associata al citoscheletro (4.1, talina, moesina, ezrina, radixin e le due tirosinfosfatasi PTP-MEG e PTP-H1), cui è stato dato nome di *merlina* (*Moesin-Ezrin-Radixin-Like-Protein*). Questa proteina è stata evidenziata istocitologicamente nel citoplasma di neuroni, cellule di Schwann, fibroblasti ed istiociti (Louis *et al.*, 1995).

La funzione della merlina è tuttora sconosciuta; si sa che molte proteine di vario peso molecolare (70-165 kD) possono legarsi alla merlina, e stato supposto che la merlina, o

più probabilmente il complesso merlina-proteine di *binding*, agiscano come segnale inibitorio di crescita.

Le mutazioni che colpiscono il gene *NF2* e che sono quindi causa della malattia (neurofibromatosi 2 [*NF2*] o *neurofibromatosi centrale* o *neurofibromatosi bilaterale dell'acustico*) sono svariate (generalmente mutazioni puntiformi), ma diverse da quelle (che sono per lo più piccole delezioni od inserzioni) riscontrate nei tumori sporadici dell'oncotipo caratteristico della malattia.

Bibliografia

- André J. M. *et al.*, *J. Génét. Hum.*, 1975, **23**, 187.
Bernards A., Gusella J. F., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 1447.
von Deimling A. *et al.*, *Brain Path.*, 1995, **5**, 153.
Hattori S. *et al.*, *Oncogene*, 1992, **7**, 481.
Levine A. J., *Ann. Rev. Biochem.*, 1993, **62**, 623.
Louis D. N., v. Deimling A., *Brain Path.*, 1995, **5**, 145.
Louis D. N. *et al.*, *Brain Path.*, 1995, **5**, 163.
Palladini G. *et al.*, *Clin. Neuropath.*, 1994, **13**, 161.
Suzuki H. *et al.*, *Gene*, 1994, **147**, 277.

GUIDO PALLADINI E LUIGI CALANDRIELLO

NEUROIMMUNITÀ: v. PSICONEUROIMMUNOLOGIA**.

NEUROLETTICI FARMACI [v. vol. X, coll. 779-787; Agg. I, coll. *5393-5399]

SOMMARIO

Introduzione (col. 4016). - **Nuovi neurolettici** (col. 4017): *Risperidone*. - *Olanzapina*. - *Quetiapina*. - *Sertindolo*.

Introduzione

I neurolettici [n.] riducono o sopprimono i sintomi psicotici e prevengono le ricadute nella schizofrenia. Tuttavia una serie di fattori ne riduce l'utilità (Serra e Gessa, 1990): a) non sono efficaci nel 30% circa delle psicosi acute; b) non sono spesso efficaci contro i sintomi negativi della schizofrenia (apatia, isolamento, anaffettività, bradifrenia); c) producono effetti collaterali non tollerabili in una buona percentuale di pazienti.

Si ritiene che l'effetto antipsicotico dei n. sia dovuto al blocco dei recettori D_2 della dopamina. Poiché questi recettori controllano anche funzioni motorie e il rilascio di ormoni ipofisari, sembrava inevitabile che l'effetto antipsicotico fosse inseparabile dai disturbi extrapiramidali e ormonali. Tuttavia l'esperienza clinica con la clozapina (v.***) ha dimostrato che tale separazione è possibile: infatti la clozapina non produce effetti extrapiramidali né iperprolattinemia in condizioni in cui esplica un chiaro effetto antipsicotico. Inoltre la clozapina è efficace anche su pazienti resistenti ad altri farmaci neurolettici e sui sintomi negativi della schizofrenia. A differenza dei classici n., la clozapina, mentre blocca debolmente i recettori D_2 , blocca tutta una serie di altri recettori della dopamina: D_1 , D_3 e D_4 (per questi ultimi la clozapina ha una alta affinità), i recettori $5HT_2$ della serotonina e differenti sottotipi di recettori muscarinici. Per più ampi particolari, v. CLOZAPINA** (coll. **1284-1288).

Il profilo farmacologico e clinico della clozapina ha stimolato la ricerca di molecole con affinità per combinazioni di recettori, anziché selettive per un solo recettore D_2 , mirata ad ottenere composti che abbiano le seguenti caratteristiche:

- ridotta capacità di produrre effetti extrapiramidali;
- maggiore attività antipsicotica (nei *non-responders* e nei sintomi negativi);
- mancanza di effetti ormonali (disfunzioni sessuali e aumento di peso corporeo);

- minori effetti sedativi;
- ridotti effetti cardiovascolari e autonomici.

Tali caratteristiche sono presenti solo in parte nei n. di nuova generazione.

Nuovi neurolettici

Sono stati definiti n. atipici perché a differenza dei classici non producono effetti extrapiramidali e ormonali alle dosi attive in senso antipsicotico (Waddington e O'Callaghan, 1997; Kane, 1997).

I composti introdotti in clinica sono: clozapina (v.**); risperidone; olanzapina; quetiapina; sertindolo.

Risperidone

Il risperidone (Kane, 1997; Marder e Meilbach, 1994; Peuskens, 1995) è un derivato benzisossazolinico. Blocca entrambi i recettori D_2 e $5HT_2$. Si ritiene che il blocco dei recettori $5HT_2$ della serotonina si opponga nell'animale da esperimento alla catalessia. La presenza di catalessia è predittiva della capacità di un composto di produrre effetti extrapiramidali in clinica. Il risperidone alle dosi consigliate di 6-8 mg al dì produce un effetto antipsicotico non associato a disturbi extrapiramidali e ormonali. La sedazione è l'effetto collaterale più frequente. Non è stata ancora dimostrata una maggiore efficacia sui sintomi negativi e sui *non-responders* rispetto ai n. tradizionali.

Olanzapina

L'olanzapina (Kerwin e Taylor, 1996; Harrison *et al.*, 1994) è un derivato tienobenzodiazepinico. Come la clozapina blocca contemporaneamente i recettori D_1 , D_2 e D_4 della dopamina, i recettori $5HT_2$ della serotonina, i recettori α_1 -adrenergici, quelli H_1 -istaminergici e differenti sottotipi di recettori muscarinici. Ha un profilo farmacologico nell'animale simile a quello della clozapina. Alle dosi raccomandate 5-10 mg al dì esplica un effetto antipsicotico con minori effetti extrapiramidali ed ormonali rispetto all'alo-peridolo. Sembra più efficace di questo nei sintomi negativi. Non è stata ancora fatta una valutazione comparata nei confronti della clozapina e del risperidone. L'effetto collaterale più frequente è la sonnolenza. Alle dosi più alte (12-17 mg al dì) gli effetti dell'olanzapina sono simili a quelli prodotti dall'alo-peridolo alle dosi di 10-20 mg.

Quetiapina

La quetiapina (Kerwin e Taylor, 1996) è un derivato dibenzotiazepinico. Ha una bassa affinità per differenti recettori D_1 e D_2 , $5HT_2$, α_1 e α_2 . Non ha affinità per i recettori muscarinici. Non produce catalessia alle dosi efficaci nei modelli animali predittivi per un effetto antipsicotico. Alle dosi raccomandate di 300-750 mg al dì produce scarsi disturbi extrapiramidali. I suoi effetti collaterali più frequenti sono la sonnolenza e l'aumento di peso. Non ci sono ancora studi di confronto con clozapina e risperidone.

Sertindolo

Il sertindolo (Kerwin e Taylor, 1996; Dunn e Fitton, 1996) è un derivato imidazolinico; come il risperidone ha una grande affinità per i recettori $5HT_2$ e D_2 . A differenza della clozapina non blocca i recettori muscarinici. Blocca i recettori α_1 -adrenergici. Non produce catalessia negli animali. È attivo quanto l'alo-peridolo sui sintomi positivi della schizofrenia ed è più attivo di questo sui sintomi negativi. Non produce effetti extrapiramidali né iperprolattinemia alle dosi consigliate di 12-24 mg al dì. Può produrre aritmie cardiache. Non ci sono ancora studi di confronto con la clozapina o il risperidone.

Bibliografia

- Dunn C. J., Fitton A., *CNS Drugs*, 1996, 5, 224-230.
 Harrison D. A., Satterlee W., Tran P. *et al.*, *Schizophr. Res.*, 1994, 11 (2), 107-108.
 Kane J. M., *CNS Drugs*, 1997, 7 (5), 347-348.
 Kerwin R., Taylor D., *CNS Drugs*, 1996, 6 (1), 71-82.
 Marder S. R., Meilbach R. C., *Am. J. Psychiat.*, 1994, 151, 825-835.
 Peuskens J., *Br. J. Psychiat.*, 1995, 166, 712-726.
 Seroquel: a putative atypical antipsychotic drug with serotonin- and dopamine-receptor antagonist properties, *J. Clin. Psychiatry*, 1995, 56 (9), 438-445.
 Serra G. e Gessa G. L., *Manuale di psicofarmacologia*, 1990, Masson, Milano.
 Trabucchi M., *Gli antipsicotici*, in Govoni S. *et al.*, eds., *Neuropsicofarmacologia*, 1998, UTET, Torino.
 Waddington J. L., O'Callaghan E., *CNS Drugs*, 1997, 7 (5), 341-346.

GIAN LUIGI GESSA E GINO SERRA

NEUROMODULATORI

F. *neuromodulateurs*. - I. *neuromodulators*.

Sono sostanze che rilasciate a livello delle sinapsi hanno l'effetto di modulare la trasmissione del segnale nervoso potenziandola o deprimendola. La loro azione può esplicarsi a livello presinaptico, influenzando sulla liberazione del neurotrasmettitore da parte del terminale nervoso, oppure a livello postsinaptico, modificando la risposta al neurotrasmettitore.

Esercitano il loro effetto interagendo con specifici recettori di membrana. Sono di struttura varia; in molti casi si tratta di neuropeptidi (v. Agg. I, coll. *1457-1458), come peptidi oppioidi, neurochinine, VIP, sostanza P e altri. I loro effetti sulla trasmissione sinaptica sono generalmente a lenta insorgenza e protratti nel tempo. Ma anche neurotrasmettitori classici possono fungere da neuromodulatori, per cui può essere fatta una distinzione tra due differenti ruoli funzionali piuttosto che tra due diversi gruppi di sostanze.

V. MEDIATORI CHIMICI (v.; v.*); NEUROTRASMETTITORI*; SINAPSI (v.; v.**). V. anche: ORMONI*; SEGNALI CELLULARI*.

RED

NEUROPLASTICITÀ

Sin.: plasticità neurale. - F. *plasticité neuronale*. - I. *neuroplasticity*; *neural plasticity*. - T. *Plastizität neuronale*. - S. *plasticidad neuronal*.

SOMMARIO

INTRODUZIONE	col. 4018
NEUROPLASTICITÀ DURANTE LO SVILUPPO	col. 4019
Organizzazione della corteccia visiva dei mammiferi e suo sviluppo (col. 4020). - Effetti della deprivazione sensoriale: deprivazione monoculare (col. 4027).	
NEUROPLASTICITÀ NELL'ADULTO	col. 4035
Plasticità sensoriale in seguito ad arricchimento dell'esperienza (col. 4037). - Plasticità da lesione (col. 4043): Corteccia somatosensoriale. - Rimappatura.	

INTRODUZIONE

Per plasticità neurale si intende la capacità dei circuiti nervosi di poter andare incontro a mutamenti funzionali e strutturali in seguito a modificazioni dell'esperienza. Per alcune funzioni, e quindi per alcune strutture nervose, tale capacità è presente solo durante lo sviluppo, anzi, solo durante un determinato periodo dello sviluppo, detto periodo critico; per altre, invece, è presente durante tutta la vita. Un tipico esempio di plasticità neurale durante lo sviluppo è dato dalla modificazione dell'architettura funzionale della corteccia visiva in seguito a mutamenti dell'esperienza visiva. Un tipico esempio di plasticità neurale nell'adulto è dato dal riarrangiamento delle mappe corticali in seguito a

NEUROPLASTICITÀ

lesioni periferiche e dai fenomeni di apprendimento e memoria. Questa voce sarà quindi divisa in due parti, la prima riguardante il periodo di sviluppo del cervello, quando la sua plasticità è incredibilmente alta, e l'altra riguardante la plasticità durante la vita adulta. Recenti ricerche hanno infatti indicato un notevole grado di plasticità anche in questo periodo, assai maggiore di quanto ritenuto fino a pochi anni or sono. Metteremo in evidenza come le caratteristiche morfologiche e funzionali dei circuiti nervosi influenzabili dall'interazione col mondo esterno siano molto diverse nel caso del periodo di formazione e sviluppo delle strutture del sistema nervoso e nel periodo della sua maturità.

Durante lo sviluppo avviene principalmente una selezione di connessioni, con la formazione di alcuni circuiti neuronali e lo scarto di altri, in principio ugualmente probabili. Ciò avviene su una base genetica e sulla base di interazioni con l'ambiente, ovvero sulla base dell'esperienza. Tra i fattori interni che svolgono un ruolo fondamentale nella plasticità durante lo sviluppo troveremo l'attività elettrica, spontaneamente presente nei neuroni o guidata dagli ingressi sensoriali, ed i fattori neurotrofici.

Durante la vita adulta la maggior parte delle connessioni e dei circuiti nervosi rimangono sostanzialmente stabili o sono solo marginalmente influenzati dall'esperienza, in modo da garantire una sostanziale stabilità di percezione e azione. Tuttavia, le connessioni funzionali tra numerose popolazioni di neuroni continuano a mantenere una loro dinamicità, mostrando la possibilità di riorganizzarsi, sotto l'influenza del mondo esterno, in maniera stabile o transitoria per rispondere a esigenze particolari, sensoriali o motorie, dell'individuo.

Alla base della plasticità neurale c'è il fatto che l'efficacia di una sinapsi (v.; v.**) può essere modificata, sia nel senso di un potenziamento che nel senso di un indebolimento. In un primo momento la modulazione dell'efficacia sinaptica si realizza attraverso modulazioni funzionali, che lasciano inalterate le connessioni anatomiche; in un secondo momento, e questo vale specialmente nel periodo dello sviluppo, si possono verificare modifiche strutturali, che possono arrivare fino alla eliminazione di una connessione.

In molti casi si è potuto constatare che le modificazioni dell'efficacia di una sinapsi si possono ricondurre ad un principio formulato dallo psicologo Hebb (1949) che, nella sua formulazione più estesa, si può così riassumere:

«Quando le attività del neurone presinaptico e di quello postsinaptico sono correlate positivamente (ovvero i due neuroni sono attivi simultaneamente) la trasmissione sinaptica viene potenziata e possono verificarsi modificazioni morfologiche in questo senso, con la formazione di nuovi contatti sinaptici. Se invece il neurone presinaptico fallisce ripetutamente nell'attivazione del neurone postsinaptico si verifica il processo inverso».

NEUROPLASTICITÀ DURANTE LO SVILUPPO

I sistemi sensoriali forniscono numerosi esempi utili per la comprensione dei fenomeni di plasticità neurale, sia durante lo sviluppo che nell'adulto. Ad es., se si altera il normale ingresso acustico durante il primo periodo dello sviluppo postnatale (esperimenti condotti in topini), le caratteristiche funzionali dei neuroni auditivi corticali risultano permanentemente ed irreversibilmente alterate (Sanes e Constantine-Paton, 1983).

Il sistema sensoriale più usato come modello sperimentale per lo studio dei fenomeni di plasticità neurale durante lo sviluppo è il sistema visivo dei mammiferi, grazie anche alla buona conoscenza che si ha sulla sua organizzazione funzionale e su come questa viene acquisita durante lo sviluppo. Nel trattare la plasticità durante lo sviluppo faremo quindi

riferimento principalmente agli esperimenti condotti sulla plasticità della corteccia visiva dei mammiferi, con un accenno ai dati sulla plasticità della corteccia somatosensoriale. Come riferimenti generali, cfr. Sherman e Spear, 1982; Shatz, 1990; Stryker, 1991; Fox, 1995; Thoenen, 1995; Bonhoeffer, 1996; Katz e Shatz, 1996; Pizzorusso e Maffei, 1997.

Organizzazione della corteccia visiva dei mammiferi e suo sviluppo

Nei mammiferi, le fibre di ciascun nervo ottico subiscono una parziale decussazione a livello del chiasma: le fibre provenienti dalla retina nasale crociano e raggiungono il nucleo genicolato laterale dorsale (dLGN, nucleo talamico visivo) controlaterale, mentre le fibre provenienti dalla retina temporale non crociano e raggiungono il dLGN ipsilaterale. In ciascun corpo genicolato laterale è così rappresentato l'intero semicampo visivo controlaterale (fig. 1). Il

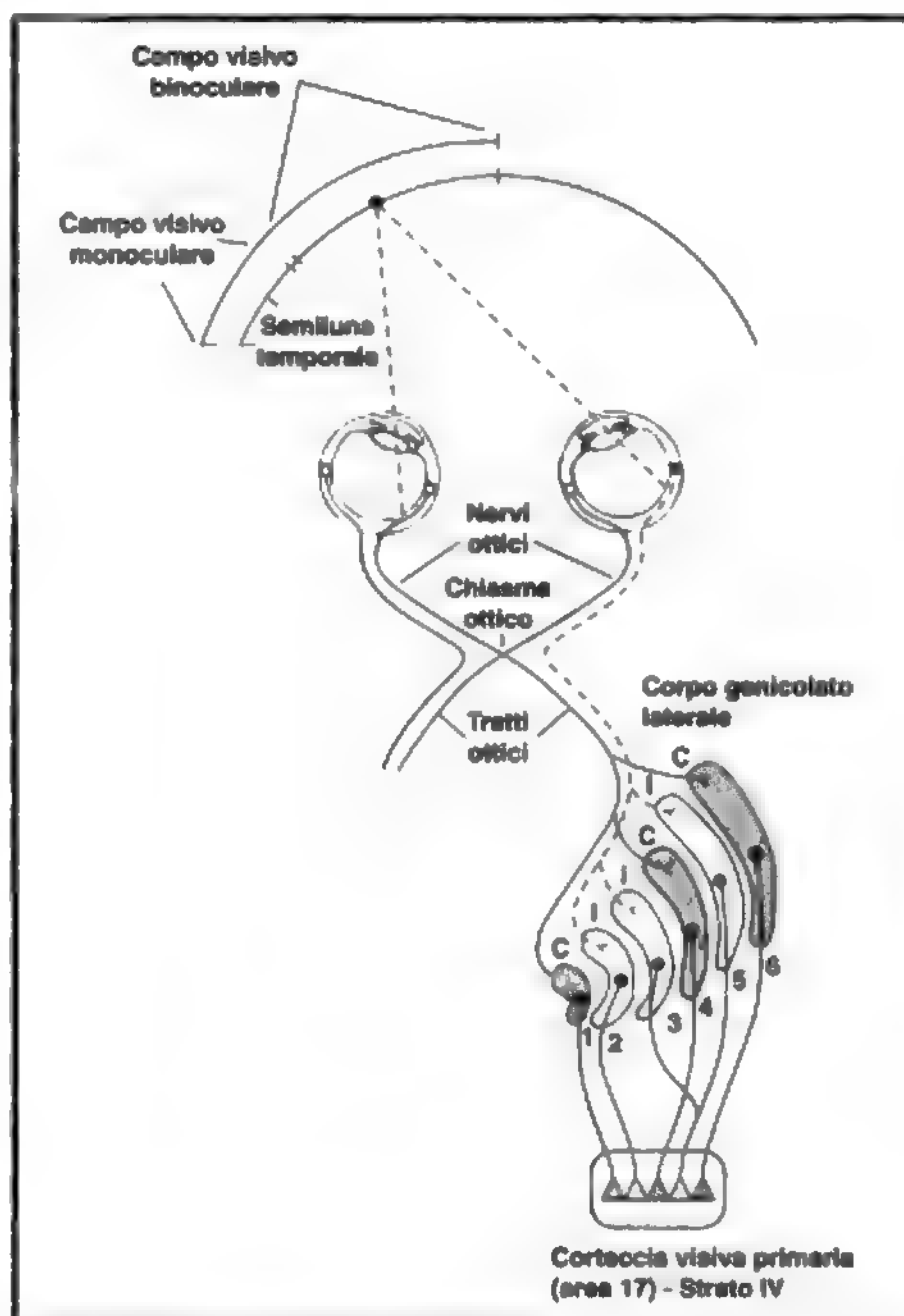
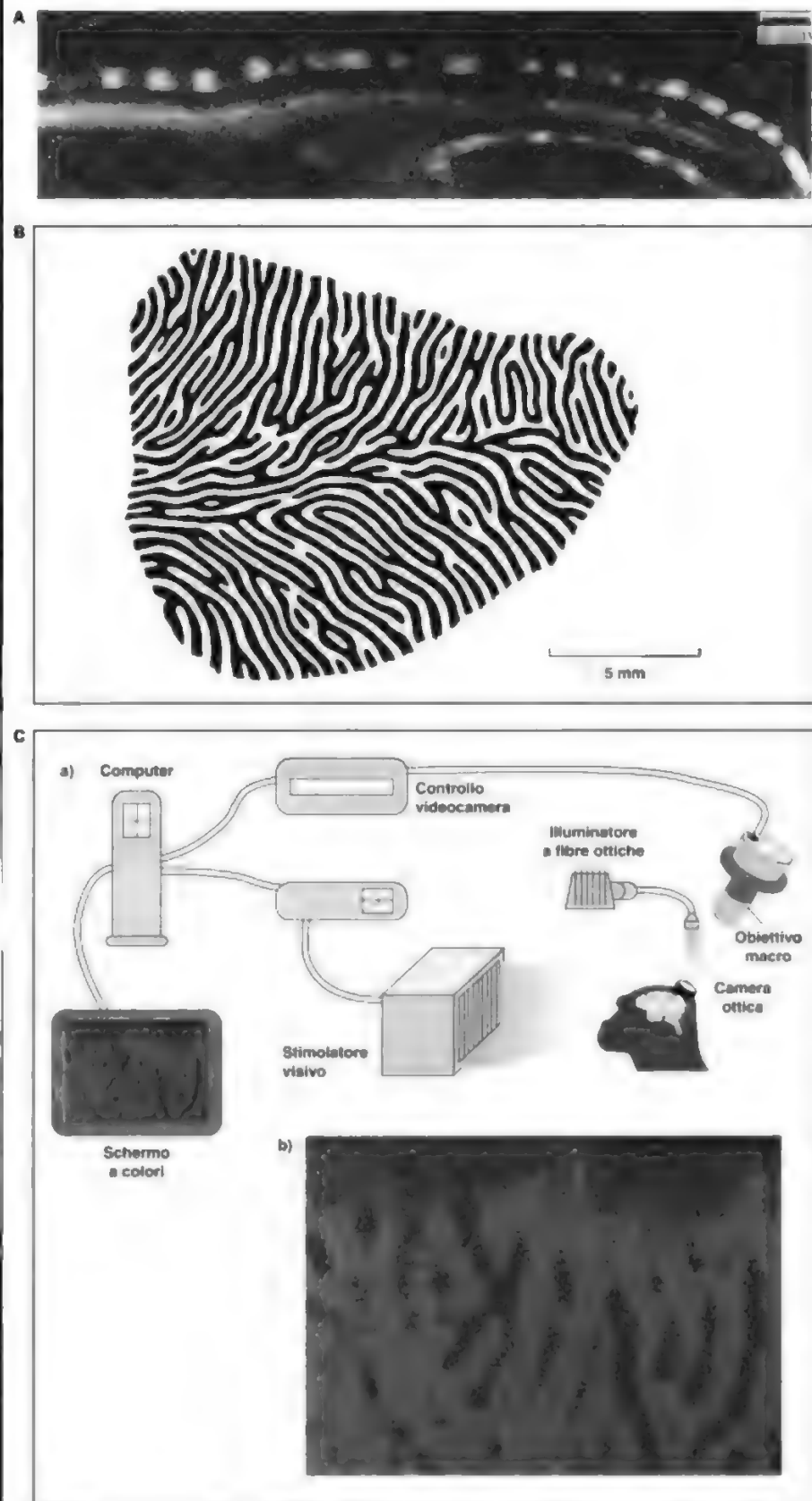


Fig. 1. Vie visive. Ingressi dalla emiretina destra di ciascun occhio proiettano al corpo genicolato laterale destro, che quindi contiene una mappa completa del semicampo visivo sinistro. Lo stesso vale per la rappresentazione del semicampo destro nel corpo genicolato laterale sinistro. Il corpo genicolato laterale è diviso in lamine (lamine 1-6) e ciascuna lamina riceve ingresso dalle fibre di un solo occhio, l'occhio controlaterale (C, lamine ombreggiate) o ipsilaterale (I). Le cellule del corpo genicolato sono quindi monoculari; esse proiettano allo strato IV della corteccia visiva primaria (area 17), le cui cellule sono ancora monoculari. Gruppi di cellule dello strato IV che ricevono ingresso dall'occhio controlaterale (triangolini ombreggiati) si alternano con gruppi di cellule che ricevono ingresso dall'occhio ipsilaterale. Lo strato IV è quindi diviso in colonne di dominanza oculare. (Modificata da Kandel, Schwartz e Jessel, 1993).

Fig. 2. Visualizzazione delle colonne di dominanza oculare nello strato IV della corteccia visiva primaria. A) Colonne di dominanza oculare nello strato IV della corteccia visiva primaria del gatto. La figura mostra una autoradiografia di una sezione coronale della corteccia visiva in un animale in cui un tracciante radioattivo (prolina triziata) era stato iniettato in un occhio per marcare le zone di proiezione delle cellule del corpo genicolato che ricevono ingresso dall'occhio iniettato. Le zone chiare corrispondono alle zone con i terminali radioattivi. Notare la distribuzione a strisce alternate chiare e scure nello strato IV, che corrispondono alla alternanza delle colonne di dominanza dell'occhio iniettato e dell'occhio non iniettato. B) Ricostruzione completa delle colonne di dominanza oculare nello strato IV della corteccia visiva della scimmia. Sono state utilizzate diverse autoradiografie di sezioni tangenziali in modo da visualizzare le colonne di dominanza oculare sull'intera parte esposta della corteccia visiva primaria destra. Notare l'intricata disposizione della mappa completa delle colonne di dominanza. (A e B adattate da Kandel et al., 1991). C) Visualizzazione in vivo delle colonne di dominanza oculare nella scimmia con la tecnica dell'«optical imaging». Nella parte (a) c'è una rappresentazione schematica del metodo. La videocamera registra cambiamenti nell'intensità della luce riflessa dalla corteccia (l'illuminazione è fornita da una fibra ottica) in seguito all'attività elettrica indotta nelle cellule corticali dalla stimolazione visiva di un occhio. La superficie di corteccia esposta è protetta dalla dura ed è sotto la camera di registrazione ottica. La visualizzazione dell'alternanza di zone con cellule più attive (*in rosso*) e di zone con cellule meno attive (*in verde*), corrispondenti alle colonne di dominanza oculare, è mostrata nella parte (b). Notare la somiglianza con la fig. 2, B. (Adattata da Nichols, Martin e Wallace, 1997).



dLGN è diviso in lamine e ciascuna lamina contiene cellule che ricevono ingresso visivo o dall'occhio ipsilaterale o dall'occhio controlaterale (fig. 1). I neuroni del dLGN sono così attivabili dalla stimolazione visiva di uno solo dei due occhi e sono quindi *neuroni monoculari*. Lamine contenenti neuroni monoculari attivabili dall'occhio ipsilaterale si alternano con lamine contenenti neuroni che ricevono ingresso dall'occhio controlaterale (fig. 1).

Dalle cellule di proiezione del dLGN partono le fibre dirette alla corteccia visiva primaria ipsilaterale (area 17 o VI). Le afferenze talamiche terminano nello strato IV, ed in particolare nello strato IVc. Le cellule corticali di tale sottostato sono quindi ancora monoculari e gruppi di cellule che ricevono ingresso dall'occhio controlaterale si alternano a gruppi di cellule che ricevono ingresso dall'occhio ipsilaterale (figg. 1 e 2). Questi gruppi prendono il nome di *colonne di dominanza oculare dello strato IV*. La larghezza delle colonne, ovvero l'estensione del territorio corticale innervato dalle fibre talamiche guidate da ciascun occhio, è visualizzabile con tecniche anatomiche e di «imaging» *in vivo* ed è uguale per le afferenze talamiche che ricevono ingresso dall'occhio ipsilaterale e dall'occhio controlaterale (fig. 2, A, B e C). Le cellule dello strato IVc proiettano alle cellule degli strati II-III e V-VI e, per la prima volta nelle vie visive, i segnali provenienti dai due occhi convergono sulla stessa cellula, compaiono cioè *neuroni binoculari*.

Hubel e Wiesel hanno proposto una classificazione delle cellule corticali visive in base alla grandezza relativa della risposta della cellula corticale (misurata in termini di fre-

quenza di scarica di potenziali d'azione) evocata dalla stimolazione visiva dell'uno o dell'altro occhio. Secondo questa classificazione (fig. 3), cellule che rispondono esclusivamente alla stimolazione dell'occhio controlaterale cadono nella classe di dominanza oculare 1 e cellule che rispondono solo all'occhio ipsilaterale cadono nella classe di dominanza oculare 7; le cellule di queste due classi sono monoculari. Cellule che rispondono con ugual vigore alla stimolazione dell'occhio ipsi- e controlaterale cadono nella classe 4. Cellule che rispondono in maniera più vigorosa alla stimolazione dell'occhio controlaterale, dette dominate dall'occhio controlaterale, cadono nelle classi 2 e 3, mentre cellule dominate dall'occhio ipsilaterale cadono nelle classi 5 e 6 (fig. 3). Le cellule delle classi 2, 3, 4, 5 e 6 sono binoculari. L'istogramma che mostra la distribuzione delle cellule corticali visive secondo la loro classe di dominanza oculare, ovvero la *distribuzione di dominanza oculare delle cellule corticali visive* è il parametro funzionale più utilizzato per valutare la plasticità corticale visiva durante lo sviluppo. Un esempio della distribuzione di dominanza oculare per la scimmia (sono esclusi i neuroni monoculari dello strato IV) è mostrato in fig. 3. Come si può vedere, la percentuale di cellule binoculari è piuttosto alta (circa 65%) e le cellule si dividono abbastanza equamente fra le popolazioni dominate dall'occhio controlaterale (classi 1-3) e quelle dominate dall'occhio ipsilaterale (classi 5-7). Per altri mammiferi (cfr. fig. 6, un esempio per il gatto, e fig. 8, per il ratto pigmentato) è presente una più forte dominanza dell'occhio controlaterale.

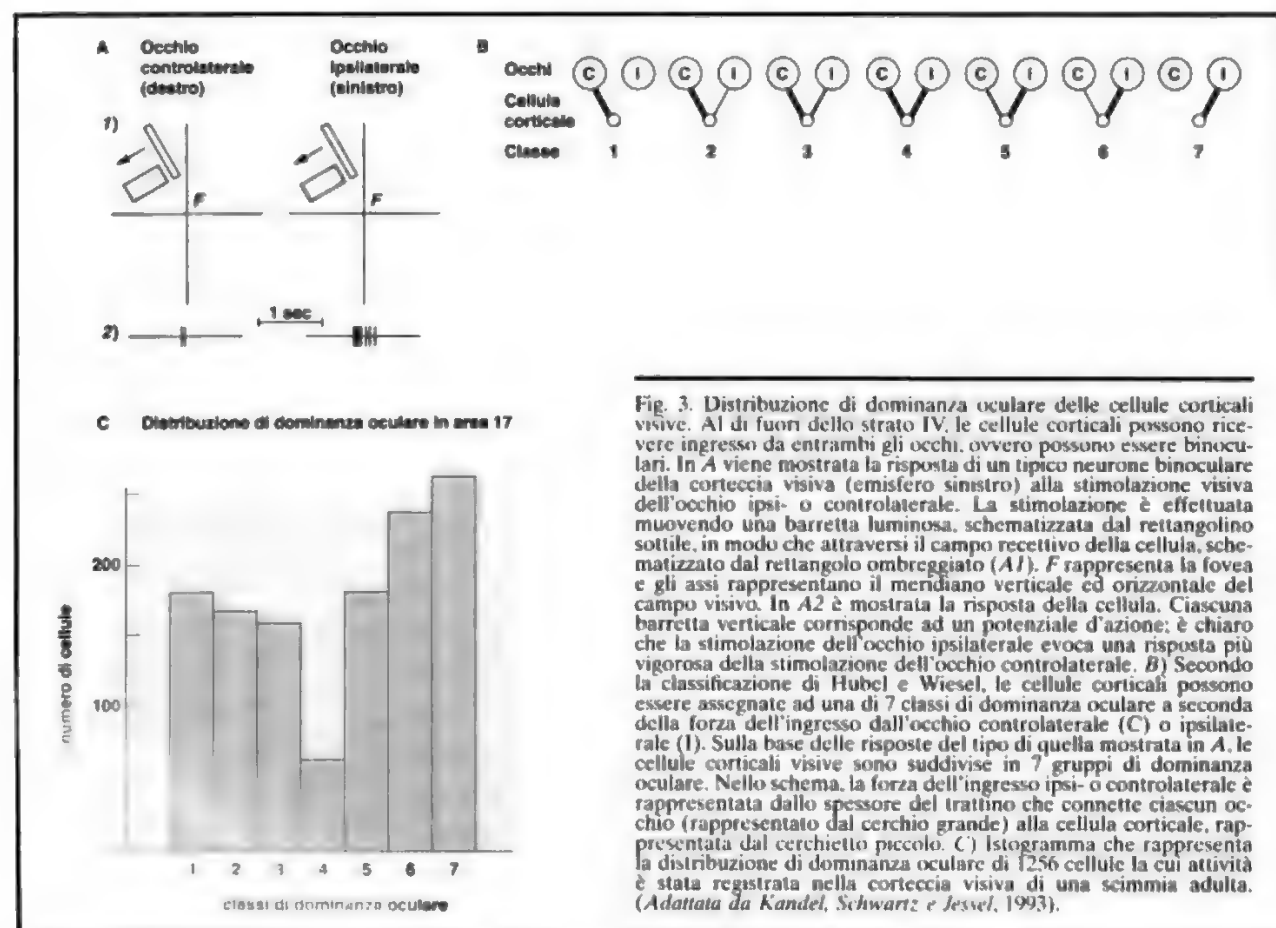
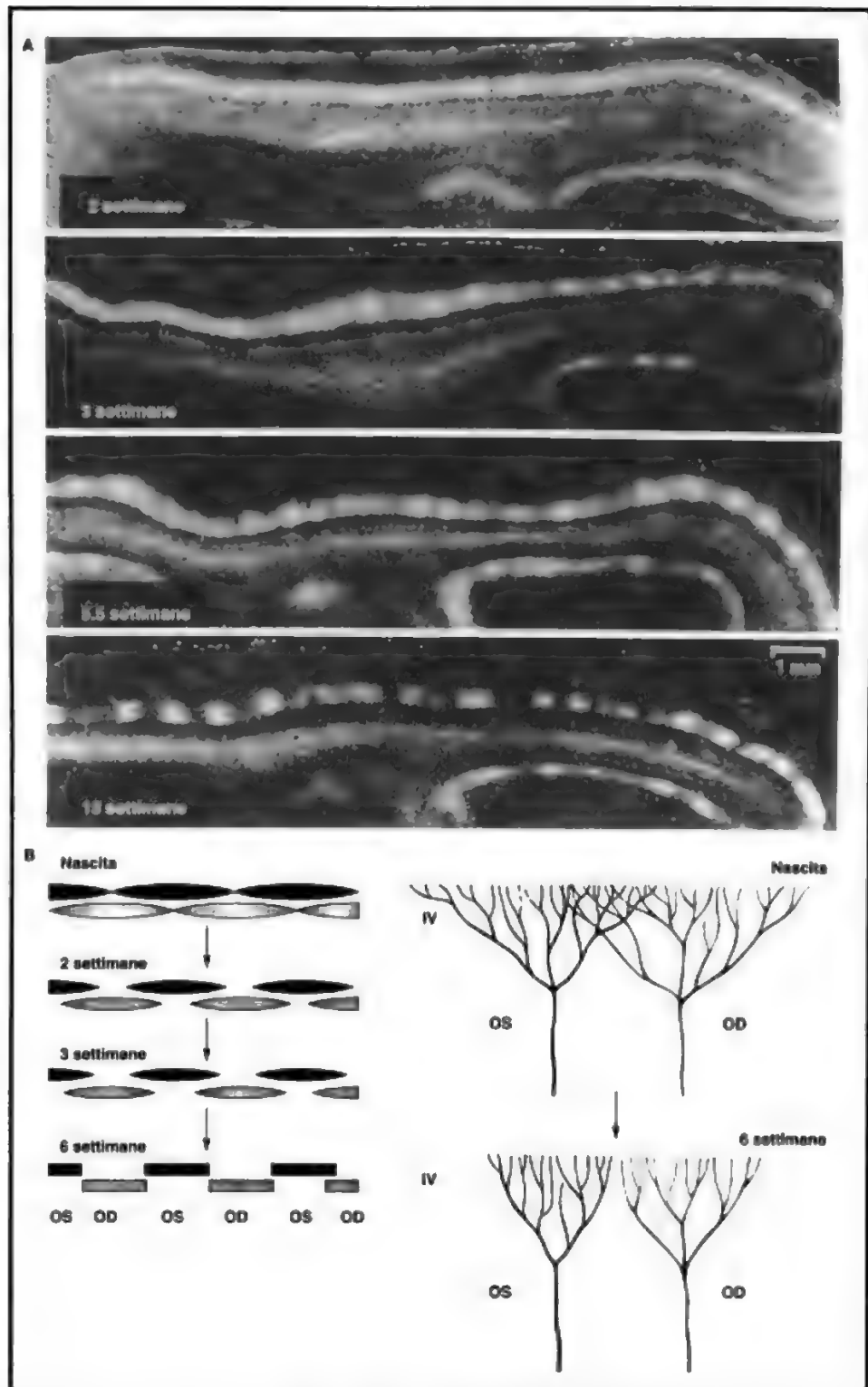


Fig. 3. Distribuzione di dominanza oculare delle cellule corticali visive. A) di fuori dello strato IV, le cellule corticali possono ricevere ingresso da entrambi gli occhi, ovvero possono essere binoculari. In A viene mostrata la risposta di un tipico neurone binoculare della corteccia visiva (emisfero sinistro) alla stimolazione visiva dell'occhio ipsi- o controlaterale. La stimolazione è effettuata muovendo una barretta luminosa, schematizzata dal rettangolino sottile, in modo che attraversi il campo recettivo della cellula, schematizzato dal rettangolo ombreggiato (A1). F rappresenta la fovea e gli assi rappresentano il meridiano verticale ed orizzontale del campo visivo. In A2 è mostrata la risposta della cellula. Ciascuna barretta verticale corrisponde ad un potenziale d'azione; è chiaro che la stimolazione dell'occhio ipsilaterale evoca una risposta più vigorosa della stimolazione dell'occhio controlaterale. B) Secondo la classificazione di Hubel e Wiesel, le cellule corticali possono essere assegnate ad una di 7 classi di dominanza oculare a seconda della forza dell'ingresso dall'occhio controlaterale (C) o ipsilaterale (I). Sulla base delle risposte del tipo di quella mostrata in A, le cellule corticali visive sono suddivise in 7 gruppi di dominanza oculare. Nello schema, la forza dell'ingresso ipsi- o controlaterale è rappresentata dallo spessore del trattino che connette ciascun occhio (rappresentato dal cerchio grande) alla cellula corticale, rappresentata dal cerchietto piccolo. C) Istogramma che rappresenta la distribuzione di dominanza oculare di 1256 cellule la cui attività è stata registrata nella corteccia visiva di una scimmia adulta. (Adattata da Kandel, Schwartz e Jessel, 1993).

Fig. 4. Sviluppo delle colonne di dominanza oculare. A) Le colonne di dominanza oculare si sviluppano postnatalmente nel gatto. In figura sono mostrate, tramite autoradiografia, quattro stadi dello sviluppo delle colonne nella corteccia ipsilaterale all'occhio iniettato con tracciante radioattivo. A due settimane (15 giorni postnatali) non c'è traccia di segregazione, come dimostra la marcatura uniforme nello strato IV. La segregazione emerge progressivamente ed a 13 settimane i bordi fra le colonne di dominanza sono già ben definiti. B) Nella scimmia, un abbozzo di colonne di dominanza oculare è già presente alla nascita, come schematizzato nella parte sinistra, dove le strisce scure rappresentano zone dello strato IV con prevalenza di terminali talamici guidati dall'occhio sinistro (OS) e le strisce chiare zone con prevalenza di terminali guidati dall'occhio destro (OD). La segregazione è però molto incompleta, ed i terminali guidati dall'occhio destro e sinistro sono largamente sovrapposti, come schematizzato nella parte destra della figura. Successivamente, si ha una sempre maggiore segregazione dei terminali talamici in zone separate, fino ad arrivare, intorno alle 6 settimane postnatali, alla situazione dell'adulto, con colonne di dominanza ben nette nello strato IV (sinistra) e nessuna sovrapposizione fra terminali guidati dall'occhio sinistro e quelli guidati dall'occhio destro. (Adattata da Nichols, Martin e Wallace, 1997).



Alla nascita, l'organizzazione anatomica e funzionale della corteccia visiva sopra descritta non è ancora presente o lo è in forma immatura e si sviluppa gradatamente durante le prime settimane o i primi mesi della vita postnatale. Durante questo periodo, detto *periodo critico della plasticità corticale visiva*, avvengono imponenti riorganizza-

zioni anatomiche e fisiologiche delle connessioni nervose nella corteccia visiva. Se durante il periodo prenatale lo sviluppo delle lamine del dLGN era stato guidato dall'attività elettrica spontanea (le lamine non si formano se tale attività elettrica, la cui esistenza è stata dimostrata da Galli e Maffei (1988), viene bloccata con TTX), durante il pe-

riodo critico l'esperienza visiva diventa un requisito necessario per il completo sviluppo della funzione visiva e un'alterazione dell'esperienza visiva comporta danni permanenti alla visione. La durata del periodo critico varia da specie a specie, è dell'ordine del mese nel ratto, di qualche mese nel gatto e nella scimmia, di qualche anno nell'uomo, e sembra correlata con la durata della gestazione.

Nelle prime fasi dello sviluppo postnatale le fibre provenienti dalle lamine del genicolato che ricevono ingresso rispettivamente dall'occhio ipsi- e controlaterale innervano territori comuni nello strato IVc (fig. 4, A e B). Di conseguenza, la maggior parte delle cellule corticali riceve un ingresso da entrambi gli occhi (fig. 6, B). Successivamente, i terminali del genicolato subiscono una progressiva segregazione, con la progressiva emergenza delle colonne di dominanza oculare nello strato IV (fig. 4, A e B). La segregazione dei terminali del genicolato e la conseguente formazione delle colonne di dominanza oculare è dovuta ad un processo di competizione fra le fibre del genicolato guidate da ciascun occhio ed è dipendente dall'attività elettrica. Infatti, il blocco dell'attività elettrica nelle vie afferenti mediante TTX iniettata intraocularmente in entrambi gli occhi blocca il processo di formazione delle colonne di dominanza oculare (Stryker e Harris, 1986). In corrispondenza con il fenomeno della formazione delle colonne di dominanza oculare, si ha la diminuzione della percentuale delle cellule binoculari al valore tipico degli animali adulti e la formazione di un istogramma di dominanza oculare di tipo adulto (fig. 6, A).

È interessante notare che la formazione di colonne di dominanza oculare può essere indotta anche nel tetto ottico di rana, dove esse non sono normalmente presenti in quanto le fibre del nervo ottico crociano totalmente. Ciò è stato ottenuto inducendo la competizione fra due insiemi di assoni mediante il trapianto di un terzo occhio durante lo sviluppo. Dall'occhio trapiantato, gli assoni delle cellule gangliari raggiungono il tetto ottico controlaterale, dove vengono ad essere presenti due insiemi di fibre afferenti, uno proveniente dall'occhio normale ed uno dall'occhio trapiantato, che competono per il bersaglio postsinaptico. Il risultato è la formazione di una regolare alternanza di colonne di dominanza oculare. Anche in questo caso, il blocco dell'attività elettrica nelle vie afferenti blocca la formazione delle colonne di dominanza oculare.

Durante il periodo di sviluppo e rimodellamento corticale si sviluppano anche le capacità percettive dell'animale. Si ha un progressivo aumento dell'acuità visiva, che nell'uomo raggiunge valori non lontani da quelli dell'adulto intorno ad un anno di età, e lo sviluppo della visione stereoscopica.

Effetti della deprivazione sensoriale: deprivazione monoculare

Il processo di sviluppo descritto nel capitolo precedente può essere alterato modificando l'ingresso visivo. In particolare, se uno dei due occhi viene privato della visione durante il periodo critico, ne consegue una drammatica riduzione delle cellule corticali visive che mostrano un ingresso funzionale dall'occhio deprivato ed un parallelo aumento delle cellule che rispondono all'occhio non deprivato. Il numero delle cellule binoculari è molto ridotto. Un esempio degli effetti della deprivazione monoculare nel determinare una profonda modifica della distribuzione di dominanza oculare è in fig. 6, C (dati dal gatto) ed in fig. 8, B (dati dal ratto). La deprivazione monoculare altera anche lo sviluppo delle colonne di dominanza oculare: le colonne che ricevono ingresso dall'occhio non deprivato si allargano e quelle corrispondenti all'occhio deprivato si stringono (fig. 5). Le capacità visive dell'occhio deprivato, quali ad es. l'acuità visiva, sono molto ridotte. Questo ha il suo corrispettivo nell'occhio dell'ambliopia da cataratta neonatale e, in senso più lato, nell'ambliopia da anisometropia o da stra-

bismo. Inoltre la visione stereoscopica, che è correlata con l'esistenza delle cellule binoculari, è compromessa. La suscettibilità della corteccia visiva alla deprivazione monoculare è limitata al periodo critico: una deprivazione monoculare anche prolungata effettuata dopo la fine del periodo critico o nell'età adulta non produce alcun effetto sulla distribuzione di dominanza oculare o sulle capacità visive dell'occhio deprivato.

Se la deprivazione monoculare viene mantenuta per tutto il periodo critico, gli effetti anatomici e funzionali sono praticamente irreversibili e l'occhio deprivato rimane permanentemente ambliope. Se l'occhio inizialmente deprivato viene riaperto durante il periodo critico e viene chiuso l'occhio inizialmente non deprivato (*deprivazione inversa*), si assiste ad un ulteriore rimodellamento dell'organizzazione funzionale della corteccia visiva. Infatti ricompaiono cellule corticali che mostrano ingresso funzionale dall'occhio inizialmente deprivato e diminuiscono quelle che ricevono un ingresso dall'occhio inizialmente non deprivato. In parallelo, l'occhio inizialmente deprivato recupera gran parte delle capacità visive perdute. Gli esperimenti di deprivazione inversa forniscono una prova ulteriore di quanto l'organizzazione funzionale della corteccia visiva sia plastica durante il periodo critico.

Sulla base di numerosissimi esperimenti, i cui risultati sono schematizzati in fig. 6, il fenomeno degli effetti della deprivazione monoculare viene spiegato tramite un meccanismo di competizione. In effetti, una deprivazione binoculare (fig. 6, D) non modifica la dominanza oculare, suggerendo che è proprio lo sbilanciamento dell'attività elettrica indotto dalla deprivazione monoculare, e non la deprivazione sensoriale, l'elemento cruciale nel determinare gli effetti della deprivazione monoculare. L'alterazione dell'attività elettrica favorirebbe le vie dell'occhio non deprivato nel processo di naturale competizione che porta alla formazione delle colonne di dominanza oculare. In questo processo svolge un ruolo cruciale la correlazione fra l'attività delle fibre afferenti e fra questa e l'attività del neurone corticale postsinaptico, come hanno dimostrato esperimenti condotti da Stryker e Harris (1986). Se i segnali in due fibre afferenti, ciascuna guidata da un occhio, sono correlati, entrambe si stabilizzeranno; altrimenti, una sola delle due rimarrà funzionalmente connessa al bersaglio postsinaptico, che diventerà quindi una cellula monoculare. A questo punto entra in gioco il tipo di scarica afferente: se entrambe le fibre, pur avendo attività tra loro scorrelata, hanno entrambe una scarica ricca e modulata dallo stimolo visivo (come è nel caso dello strabismo), esse hanno la stessa probabilità di mantenere accesso alle cellule corticali, e quindi la distribuzione di dominanza oculare risulterà polarizzata verso le classi 1 e 7 (fig. 6, G). Se invece una delle due fibre ha attività povera, non modulata dallo stimolo visivo (come è il caso della deprivazione monoculare), avrà pochissima probabilità di mantenere connessioni funzionali con il bersaglio postsinaptico, con conseguente spostamento della distribuzione di dominanza oculare verso le classi dominate dall'occhio non deprivato. Se l'attività di entrambe le fibre è povera e non modulata (come nella deprivazione binoculare o nell'allevamento al buio) o praticamente assente (come nel caso della TTX [tetrodotossina] iniettata in entrambi gli occhi) si ha una mancanza di competizione e la distribuzione di dominanza oculare rimane simile a quella del neonato (fig. 6, D) o ancora più binoculare (fig. 6, E) e le colonne di dominanza oculare si formano in maniera molto incompleta. In più, nessuno dei due sistemi di fibre afferenti sembra guadagnare ingresso permanente alle cellule corticali, il processo di sviluppo e consolidamento risulta molto rallentato ed il periodo critico si prolunga.

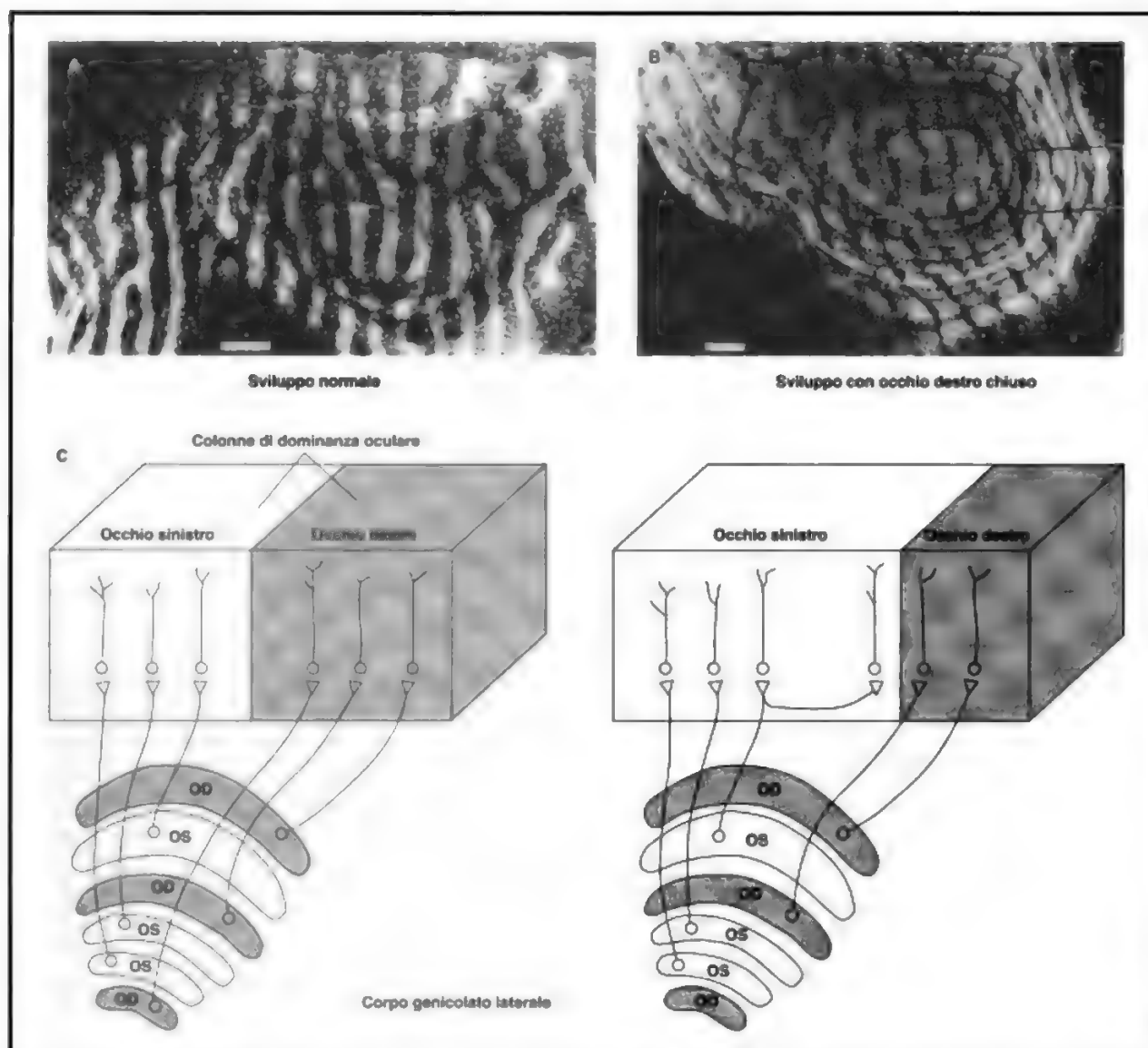


Fig. 5. La deprivazione monoculare determina il restringimento delle colonne di dominanza oculare per l'occhio deprivato nella corteccia visiva. A) Autoradiografia della corteccia visiva di una normale scimmia adulta; le strisce chiare corrispondono alle colonne di dominanza oculare dell'occhio iniettato con tracciante radioattivo. B) Autoradiografia della corteccia visiva di una scimmia di un anno e mezzo deprivata della visione dell'occhio destro a partire dall'età di 2 settimane. Le strisce chiare corrispondono alle colonne di dominanza oculare dell'occhio non deprivato (occhio sinistro), le strisce scure, più strette, corrispondono alle colonne di dominanza oculare dell'occhio deprivato (occhio destro). C) Schema che illustra come la deprivazione monoculare possa influenzare lo sviluppo delle colonne di dominanza oculare. In seguito ad uno sviluppo normale, le colonne di dominanza oculare sono di ugual dimensione per ciascun occhio (situazione corrispondente alla autoradiografia sovrastante). Quando un occhio viene deprivato della visione, in questo caso l'occhio destro, le colonne di dominanza oculare di questo occhio diventano più strette. Secondo l'ipotesi illustrata nel testo, la deprivazione di un occhio determina uno sbilanciamento nella competizione, basata sull'attività elettrica, fra le fibre del genicolato guidate da ciascun occhio a favore di quelle guidate dall'occhio non deprivato. Come conseguenza, i terminali del genicolato guidati dall'occhio deprivato regrediscono e le loro connessioni sinaptiche si indeboliscono tanto che alcune connessioni funzionali con le cellule dello strato IV vengono perse del tutto. Viceversa, i terminali delle cellule del genicolato guidate dall'occhio non deprivato si allargano, rinforzano le loro connessioni sinaptiche e mostrano connessioni funzionali con cellule corticali che prima erano connesse con cellule del genicolato guidate dall'occhio deprivato. (Modificata da Kandel, Schwartz e Jessel, 1993).

Esempi di competizione sinaptica fra insiemi di fibre afferenti in cui l'attività elettrica esercita una influenza dominante sulla stabilizzazione o l'eliminazione delle connessioni nervose sono tipici dello sviluppo del sistema nervoso. Nella corteccia somatosensoriale degli animali dotati di vibrisse esistono colonne di cellule, dette «barrels», che rispondono alla stimolazione di una sola vibrisa, la vibrisa

principale. Se durante lo sviluppo si deprivano le cellule corticali di un «barrel» dell'ingresso dalla loro vibrisa principale (ad es. tagliandola) esse rispondono alla stimolazione delle vibrisse adiacenti. Anche in questo caso c'è un periodo critico per il manifestarsi degli effetti della deprivazione sensoriale. Lo e Poo (1991) hanno studiato il processo di competizione fra fibre afferenti per il bersaglio

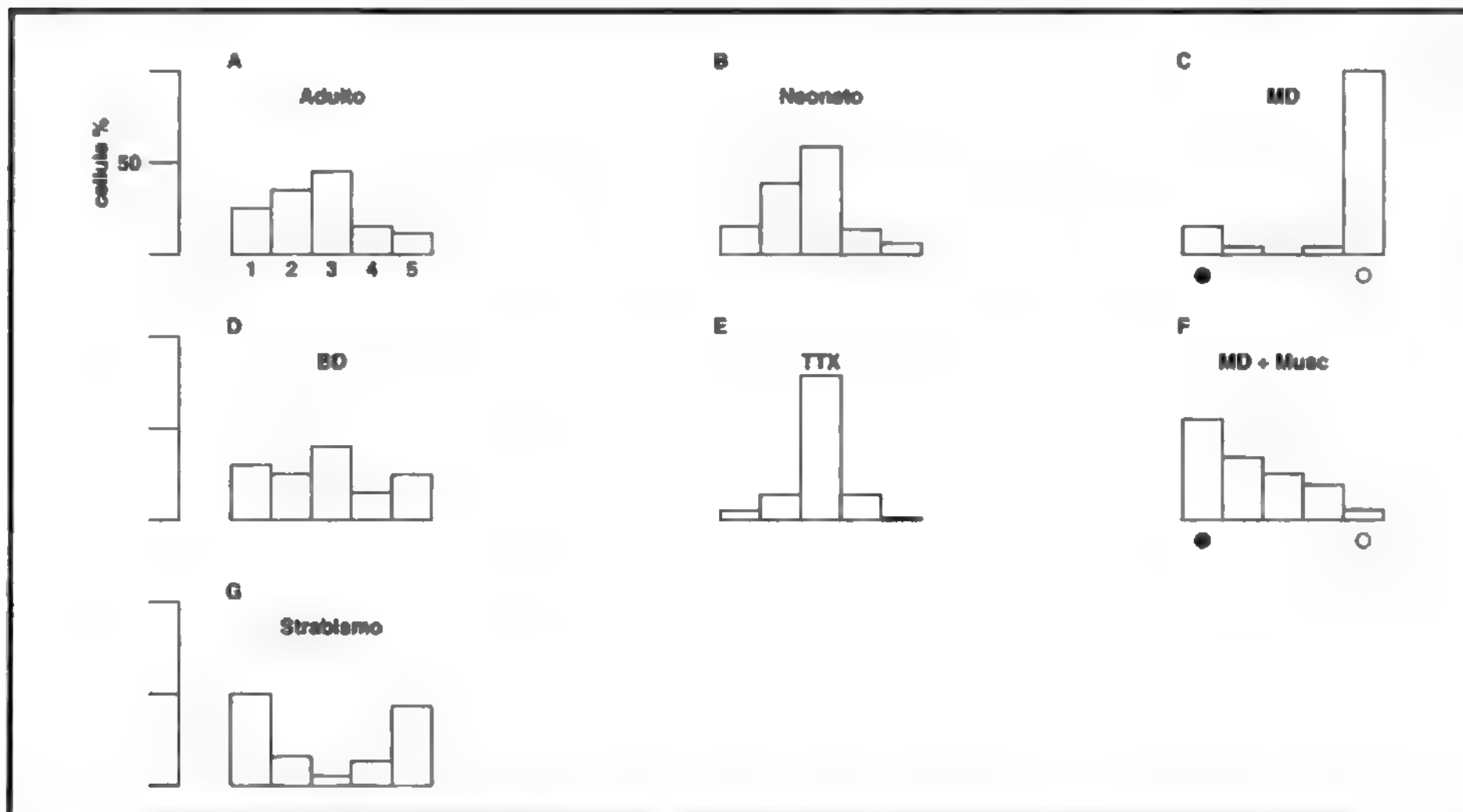


Fig. 6. Attività elettrica nelle vie visive e sviluppo della dominanza oculare. Dati riassuntivi di numerosi esperimenti nel gatto. Le classi di dominanza oculare sono ridotte da 7 a 5, con la classe 2 costituita dalle cellule delle classi 2 e 3 di Hubel e Wiesel, la classe 3 costituita dalle cellule di classe 4 di Hubel e Wiesel, la classe 4 costituita dalle cellule di classe 5 e 6 e la classe 5 dalle cellule di classe 7. A) Distribuzione di dominanza oculare nel gatto adulto normale. B) Neonato: distribuzione di dominanza oculare nel gatto neonato, con grande predominanza di cellule binoculari. C) MD: distribuzione di dominanza oculare nel gatto deprivato monocolarmente durante il periodo critico (mancanza di correlazione fra la scarica afferente nelle fibre guidate dai due occhi e scarica povera nelle fibre guidate dall'occhio deprivato); notare lo spostamento verso le classi dominate dall'occhio aperto (simboleggiato dal pallino aperto); il pallino chiuso simboleggia l'occhio deprivato, che è l'occhio controlaterale all'emisfero in cui si registrano le cellule. D) BD: distribuzione di dominanza oculare nel gatto deprivato binocularmente durante il periodo critico. E) Distribuzione di dominanza oculare nel gatto trattato intraocularmente con TTX (tetrodotossina) in entrambi gli occhi per bloccare l'attività elettrica nelle fibre afferenti (eccesso di correlazione nella scarica afferente delle fibre guidate dai due occhi). Notare l'enorme aumento delle cellule binoculari con ugual dominanza dai due occhi. F) Distribuzione di dominanza oculare nel gatto trattato con muscimolo (musc) intracorticale per bloccare l'attività elettrica dei neuroni corticali durante un periodo di deprivazione monoculare (la scarica afferente povera delle fibre guidate dall'occhio deprivato è più correlata con un bersaglio postsinaptico silente di quella delle fibre guidate dall'occhio non deprivato). Notare lo spostamento paradossale verso l'occhio deprivato. G) Dominanza oculare nel gatto reso strabico durante il periodo critico (mancanza di correlazione fra le scariche afferenti delle fibre guidate dai due occhi, ma scarica ricca e modulata in entrambe). Notare la mancanza di cellule binoculari e l'aumento delle cellule monoculari bilanciato per entrambi gli occhi. (Adattata da Shatz, 1990).

postsinaptico *in vitro* in un sistema di coltura di cellule muscolari e nervose in cui una singola cellula muscolare embrionale è coinnervata da due neuroni spinali. *In vivo*, un processo di eliminazione di sinapsi conduce alla permanenza di un solo assone che contrae sinapsi con la cellula adulta. Lo e Poo hanno dimostrato che la stimolazione tetanica di uno dei due neuroni afferenti comporta il potenziamento della sinapsi stimolata e la soppressione funzionale della sinapsi formata dal neurone non stimolato. Questa soppressione eterosinaptica era praticamente assente quando la stimolazione tetanica veniva applicata contemporaneamente ai due neuroni afferenti.

Nell'ipotesi hebbiana (Hebb, 1949), anche l'attività del neurone postsinaptico svolge un ruolo cruciale. Per testare questo punto, Stryker ha eliminato farmacologicamente l'attività dei neuroni corticali lasciando intatta quella delle fibre talamiche afferenti, in animali deprivati monocolarmente. Una volta rimosso il blocco farmacologico, nella regione di corteccia che era stata resa silente c'era uno spostamento paradossale della distribuzione di dominanza oculare (fig. 6, F): l'occhio dominante era quello deprivato. Nella zona di corteccia non trattata, l'occhio dominante era ovviamente quello non deprivato. Questo risultato è perfettamente in

linea con l'ipotesi hebbiana: infatti, l'attività povera delle fibre guidate dall'occhio deprivato è più correlata con quella del neurone corticale reso silente rispetto a quella ricca e modulata degli ingressi guidati dall'occhio aperto.

Quindi, cambiamenti plastici nelle sinapsi possono essere indotti da una appropriata distribuzione temporale dell'attività afferente e dalla sua coincidenza con l'attività postsinaptica.

Le molecole coinvolte in questi fenomeni di plasticità ed i meccanismi che li confinano all'interno del periodo critico sono ancora oscuri. Per le sue proprietà, il recettore per il glutammato NMDA è considerato il miglior candidato per fungere da detettore di correlazione fra attività pre- e postsinaptica. Infatti, questo recettore necessita della coincidenza di due eventi perché una corrente ionica, principalmente portata dal calcio, possa attraversare il canale: la presenza di glutammato, segno dell'attività presinaptica, e la depolarizzazione della membrana postsinaptica, segno dell'attività del neurone postsinaptico. Diverse proprietà della corrente mediata dal recettore NMDA cambiano durante il periodo critico (Carmignoto e Vicini, 1992; Fox *et al.*, 1995 per una rassegna) e sono modulate dall'esperienza visiva. L'attivazione del recettore NMDA potrebbe quindi

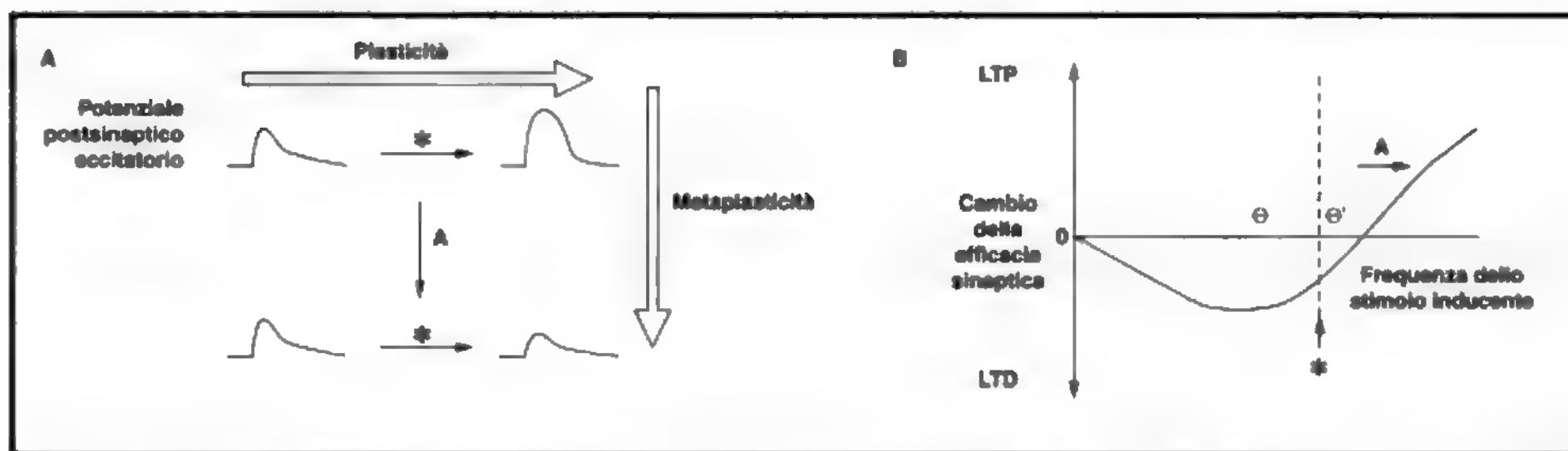


Fig. 7. Plasticità e metaplasticità. A) In seguito ad uno stimolo inducente di frequenza opportuna (simbolizzato dall'asterisco *) l'efficacia sinaptica ad una certa sinapsi aumenta (come indicato dal più alto potenziale postsinaptico eccitatorio); questo è un fenomeno di plasticità, in particolare, potenziamento a lungo termine (LTP). In seguito ad un prolungato aumento dell'attività dell'ingresso sinaptico (simbolizzato dalla freccia con la A) la situazione cambia: lo stesso stimolo (*) che prima induceva LTP ora induce LTD, come simbolizzato dal ridotto potenziale postsinaptico eccitatorio. Questa è metaplasticità, ovvero, dipendenza della plasticità sinaptica dalla pregressa attività della sinapsi stessa. B) Un modo per visualizzare questo fenomeno è di costruire un grafico dei cambi dell'efficacia sinaptica in funzione della frequenza dello stimolo usato per indurre i cambi stessi. Stimoli intensi (frequenza alta) inducono LTP, stimoli di frequenza bassa inducono LTD. Per stimoli intorno ad una certa frequenza, detta frequenza soglia (Θ), non si verifica alcun cambiamento dell'efficacia sinaptica (linea dello zero). L'aumento dell'attività media (freccia con A) determina uno spostamento verso destra della curva, con Θ che va ad un valore più alto Θ' . Di conseguenza, stimoli (*) che nella situazione iniziale (curva grigia) provocavano LTP, nella nuova situazione (curva nera) provocano LTD. Una riduzione dell'attività determinerebbe uno spostamento della curva verso sinistra, con effetti opposti. (Adattata da Deisseroth et al., 1995).

rappresentare un passo cruciale nella plasticità neurale guidata dall'esperienza ed i cambiamenti nelle proprietà di questo recettore potrebbero essere uno dei fattori che determinano la perdita della malleabilità delle sinapsi corticali, e la conseguente fine del periodo critico. In effetti, il blocco farmacologico dei recettori NMDA riduce la plasticità durante il periodo critico, sia nella corteccia visiva che in quella somatosensoriale. Va inoltre ricordato che gli ingressi colinergico e noradrenergico alla corteccia visiva esercitano un ruolo permissivo nella plasticità corticale ed il loro blocco previene gli effetti della deprivazione monoculare. V. anche GLUTAMATO, ANTAGONISTI DEL⁹⁹.

Il recettore NMDA è anche il recettore la cui attivazione permette l'instaurarsi di quei fenomeni di plasticità sinaptica, guidati dall'attività elettrica e regolati da regole hebbiane, che sono ben noti nell'ippocampo e vanno sotto il nome di potenziamento a lungo termine (LTP) e depressione a lungo termine (LTD) (v. SINAPSI⁹⁸). LTP consiste nel prolungato aumento (fino a diverse ore *in vitro*, diversi giorni *in vivo*) dell'efficacia sinaptica, misurabile dall'aumento del potenziale postsinaptico eccitatorio, in seguito ad un periodo di intensa attività presinaptica e postsinaptica correlata (Bliss e Collingridge, 1993; Cain, 1997). LTD consiste nella diminuzione dell'efficacia sinaptica, misurabile dalla riduzione del potenziale postsinaptico eccitatorio, in seguito al succedersi di ingressi a bassa frequenza. L'esatto valore della frequenza di stimolazione che separa la zona del potenziamento da quella della depressione dipende dall'attività media pregressa (*metaplasticità*; fig. 7; Deisseroth et al., 1995). L'ingresso di calcio attraverso il recettore NMDA mette in moto processi di fosforilazione di proteine-chinasi e causa l'induzione di geni precoci: il risultato è una variazione (un aumento nell'LTP) del rilascio di neurotrasmettitore ed una variazione della trascrizione a livello del DNA, con modificazione a lungo termine della produzione di determinate proteine e modificazioni funzionali e strutturali a carico della sinapsi. Di conseguenza l'efficacia di una connessione viene ad essere modificata. Sia LTP che LTD sono presenti nella corteccia visiva in maniera regolata dallo sviluppo: la possibilità di indurli declina con l'età

postnatale in modo parallelo al periodo critico per la deprivazione sensoriale sia nella corteccia visiva che somatosensoriale (Fox, 1995; Dudek e Friedlander, 1996). Questa evidenza correlativa è consistente con le teorie che LTP e LTD siano coinvolti nella plasticità corticale, anche se manca un vero legame causale.

Recentemente si è avanzata l'ipotesi che le due entrate visive alla cellula binoculare competano per un fattore neurotrofico prodotto dalla cellula corticale in proporzione all'attività elettrica in arrivo. Questo fattore avrebbe il ruolo di rafforzare le connessioni più attive. In effetti, i fattori neurotrofici possono modulare la trasmissione sinaptica ed influenzare i fenomeni di LTP (Kang e Schuman, 1995). Una serie di esperimenti, in parte eseguiti nel laboratorio del professor Maffei a Pisa, ha dimostrato che questo fattore critico per la plasticità corticale è il NGF (*Nerve Growth Factor*) o possibilmente altra neurotrofina della stessa famiglia. È stato infatti osservato (Maffei et al., 1992) che in rattoni deprivati temporaneamente, durante il loro periodo critico, della visione di un occhio, la somministrazione di NGF direttamente nel liquido cefalo-rachidiano non fa avvenire quei fenomeni normalmente conseguenti alla deprivazione monoculare (fig. 8). Si pensa che se i due occhi competono per avere il fattore neurotrofico, la presenza di esso in abbondanza per somministrazione esogena, abolisca i fenomeni di competizione, permettendo il normale sviluppo della visione in entrambi gli occhi.

Che il fattore neurotrofico NGF sia importante per lo sviluppo del sistema visivo è stato anche dimostrato bloccando per mezzo di anticorpi il NGF endogeno, presente nella corteccia visiva e in altre zone del cervello dell'animale (Berardi et al., 1994). Questo trattamento provoca un alterato sviluppo del sistema visivo, con riduzione della acuità visiva e sviluppo anormale del grado di binocularità delle cellule. Si nota anche una diminuzione della grandezza dei neuroni del corpo genicolato laterale che proiettano alla corteccia visiva, diminuzione di grandezza del soma neurale che è anche osservata negli esperimenti di deprivazione monoculare nel corpo genicolato che riceve afferenze dall'occhio deprivato.

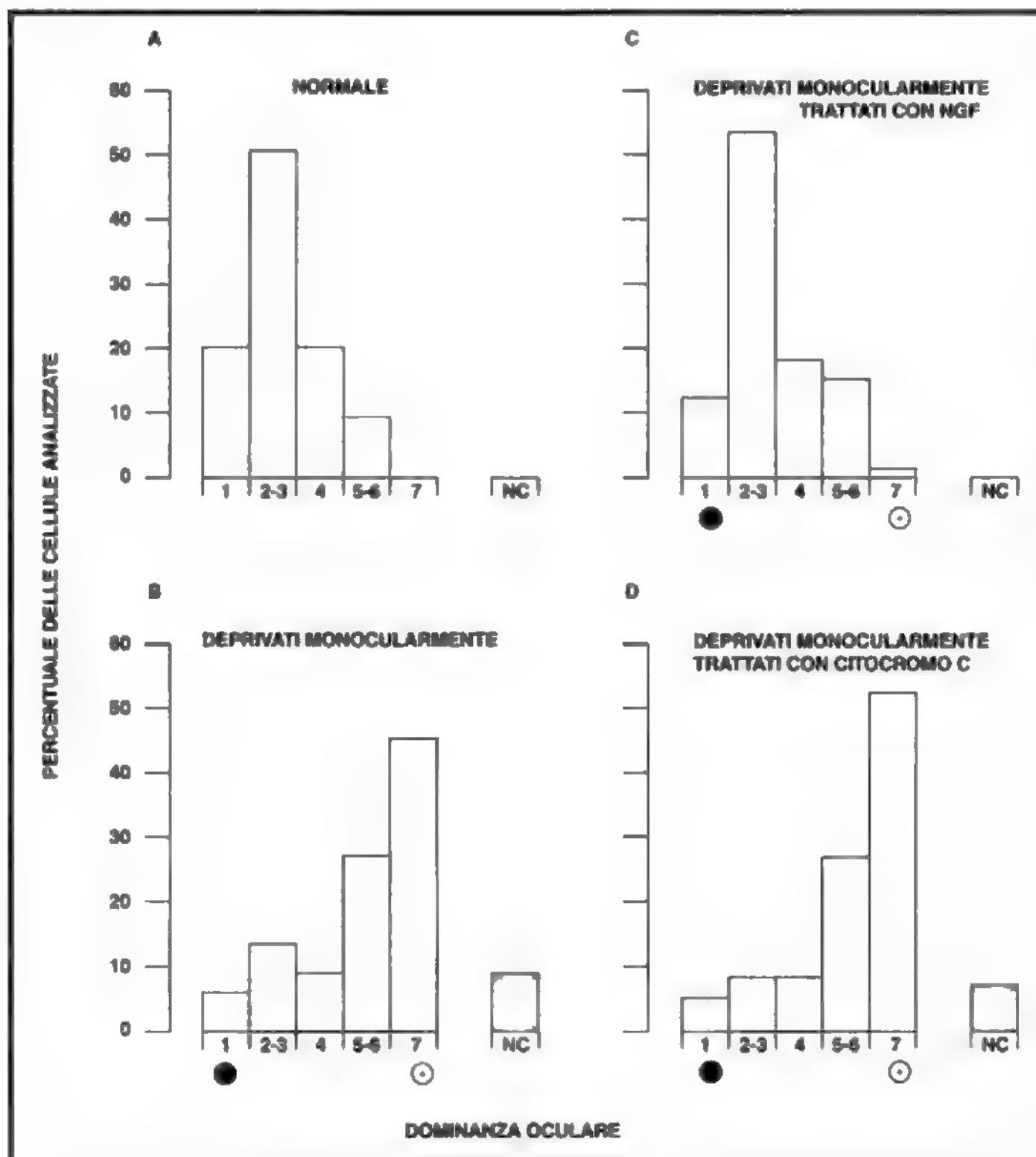


Fig. 8. Ruolo delle neurotrofine nella plasticità corticale. Dati dal ratto pigmentato. Distribuzione di dominanza oculare di singoli neuroni corticali in animali adulti (P45-P55). Le cellule erano classificate come descritto nel testo. La colonna NC indica le cellule isolate non classificabili. Il cerchio scuro simbolizza l'occhio deprivato mentre il cerchio chiaro con punto scuro al centro simbolizza l'occhio non deprivato. A) Animali normali. B) Animali monocularmente deprivati durante il periodo critico. C) Animali monocularmente deprivati durante il periodo critico e contemporanea somministrazione intravitteale di NGF. D) Animali monocularmente deprivati durante il periodo critico e contemporanea somministrazione intravitteale di citocromo C.

È stato anche visto che il NGF permette uno sviluppo del sistema visivo quasi completamente normale in animali tenuti in completa oscurità durante il periodo critico. Il fenomeno viene anche in questo caso spiegato, postulando che l'attività elettrica afferente alla corteccia possa essere inadeguata per una sufficiente produzione del fattore neurotrofico, necessario al normale sviluppo delle connessioni (Pizzorusso *et al.*, 1997).

NEUROPLASTICITÀ NELL'ADULTO

Fino a 10 anni fa, la possibilità che le strutture nervose fossero capaci di plasticità anche nell'individuo adulto veniva limitata a quelle strutture chiaramente coinvolte nei fenomeni di apprendimento e memoria, quali l'ippocampo. Infatti, la possibilità di immagazzinare nuova informazione suggeriva che all'interno delle strutture coinvolte avvenissero delle modificazioni, sia nel senso di cambi di efficacia all'interno di una struttura anatomica fissa sia nel senso di aggiunta o rimozione di connessioni in funzione dell'esperienza.

Ora è invece ben documentato il fatto che anche le cortecce sensoriali e motorie possono andare incontro a riorganizzazioni funzionali nell'adulto: le proprietà delle cellule nervose nel cervello uditivo, somatosensoriale, visiva

e motoria possono modificarsi anche nell'animale adulto. Questo significa che la nostra percezione uditiva, somatosensoriale, visiva e le nostre capacità motorie possono modificarsi.

Numerosi studi hanno dimostrato che la plasticità neurale nelle strutture corticali adulte si manifesta in risposta a: lesioni in strutture periferiche; apprendimento percettivo e motorio.

Entrambe le situazioni corrispondono ad una modificazione prolungata dell'esperienza. L'apprendimento può essere considerato, in un certo senso, come il fenomeno reciproco delle lesioni periferiche: in un caso la corteccia riceve un ingresso ridotto da una porzione ristretta della superficie sensoriale, nell'altro c'è un aumento, un arricchimento dell'ingresso.

Tratteremo separatamente questi due aspetti della plasticità corticale nell'adulto. Vedremo che meccanismi molto simili a quelli che, durante lo sviluppo, hanno portato alla formazione delle mappe e dei moduli corticali (coincidenza pre-post sinaptica di tipo hebbiano, rafforzamento degli ingressi sincroni, indebolimento degli ingressi asincroni) sono all'opera anche nell'adulto, anche se con risultati diversi (per una rassegna recente, cfr. *Seminars in Neuroscience*, 1997, AA. VV., Editor J. Kaas).

Plasticità sensoriale in seguito ad arricchimento dell'esperienza

La capacità di discriminare semplici attributi di uno stimolo sensoriale migliora con l'esercizio. Ad es., si migliora nella capacità di discriminare la direzione di movimento o il disegno di uno stimolo visivo, il tono di uno stimolo acustico o le sequenze di contatto di uno stimolo tattile.

Il miglioramento della prestazione può richiedere un lungo periodo di allenamento (giorni o settimane) ma può anche manifestarsi entro una singola sessione di poche centinaia di prove. Il risultato finale è che stimoli che ci sembravano indistinguibili all'inizio appaiono poi facilmente discriminabili.

Nella maggior parte di questi studi, gli effetti dell'allenamento sono specifici per le caratteristiche degli stimoli usati durante l'allenamento, quali ad es. l'orientamento di stimoli visivi (se si fa pratica con stimoli di orientamento verticale non si trasferiscono gli effetti dell'apprendimento alla situazione in cui gli stessi stimoli sono messi orizzontali; Fiorentini e Berardi, 1980), la frequenza di stimoli acustici. Inoltre, c'è

specificità per la superficie recettoriale interessata: se si impara a discriminare stimoli posti nel semicampo visivo inferiore non si trasportano gli effetti dell'apprendimento alla situazione in cui gli stimoli sono messi nel semicampo superiore e lo stesso accade se si passa da una zona cutanea ad un'altra in esperimenti di discriminazione tattile. Questo suggerisce che si verificano modificazioni funzionali anche in aree corticali a livelli bassi della gerarchia, in cui i campi recettivi sono piccoli, c'è forte selettività per i parametri dello stimolo e chiara topografia. Inoltre, tali modificazioni sembrano ristrette alla popolazione neurale attivata durante l'apprendimento, anche se questa popolazione può comprendere migliaia di cellule (cfr. la rassegna di Karni e Bertini, 1997).

Come si impara? La prima cosa che è stata osservata è che NON è sufficiente la sola esposizione alla ripetizione degli stimoli per condurre all'apprendimento. Le capacità discriminative aumentano solo se il soggetto presta effettivamente attenzione agli stimoli sensoriali: quindi è cruciale il ruolo di quei sistemi a proiezione diffusa con origine dal tronco dell'encefalo e dal prosencefalo basale che modulano la risposta delle cellule corticali in funzione dello stato

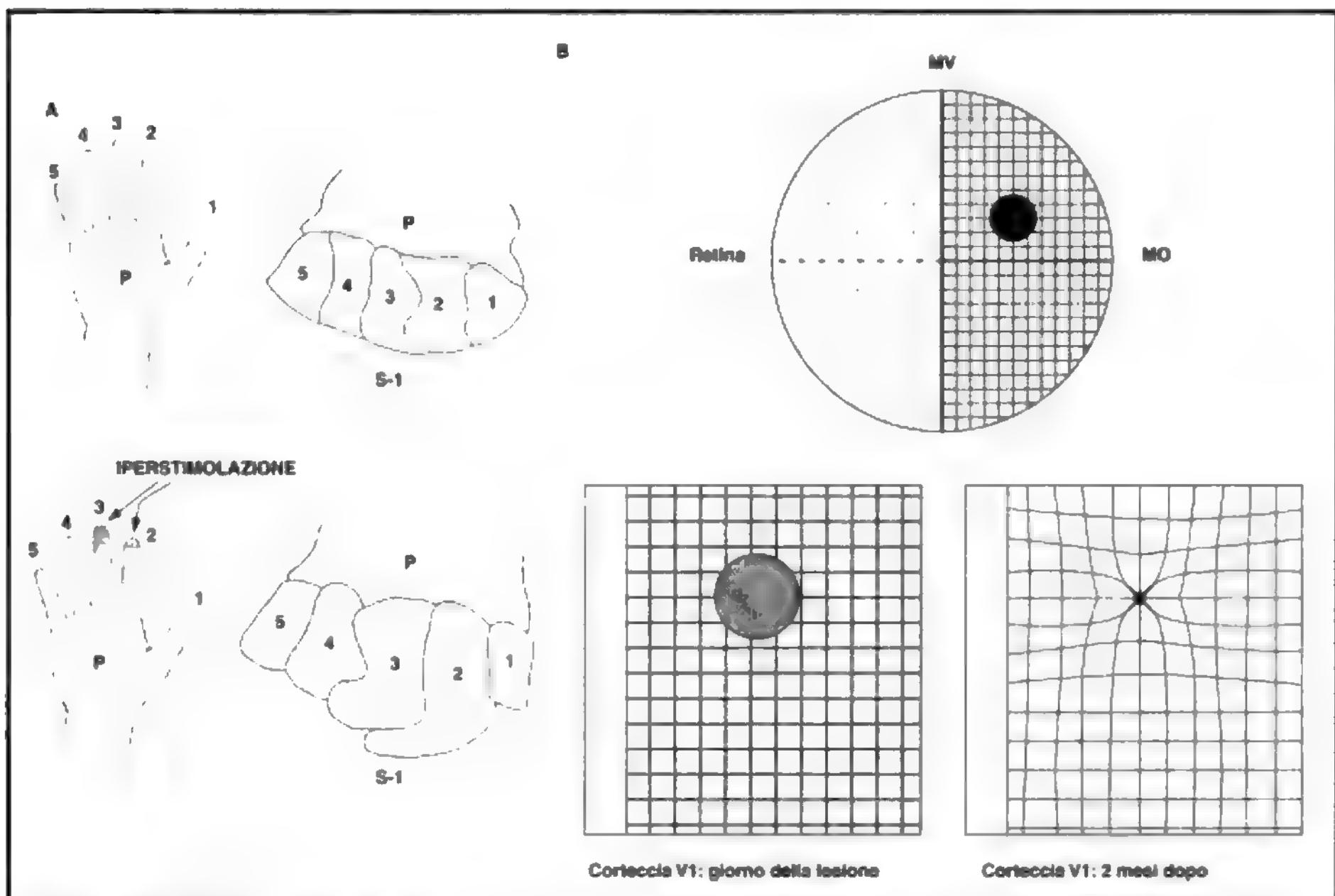


Fig. 9. Plasticità nell'adulto. A) Modificazione della rappresentazione della mano nella corteccia somatosensoriale primaria (area S-1) in seguito ad arricchimento dell'esperienza. A sinistra in alto lo schema della mano di una scimmia, con le dita numerate da 1 (pollice) a 5 (mignolo); P è il palmo. A destra in alto la mappa della mano sulla S-1, con delimitate le zone in cui le cellule rispondono alla stimolazione della cute delle diverse dita e del palmo. In basso è rappresentata la situazione dopo prolungata iperstimolazione tattile dell'indice e del medio dovuta alla esecuzione di un compito che richiedeva l'uso di tali dita: come si vede, la mappa corticale risulta alterata, con l'espansione dei territori le cui cellule rispondono alle dita 2 e 3. B) Modificazione della rappresentazione del campo visivo nella corteccia visiva primaria (V1) in seguito a riduzione dell'ingresso. Nella retina di un mammifero adulto (gatto) viene praticata una lesione che dà origine ad uno scotoma (cerchio nero nella rappresentazione del campo visivo). MV ed MO, meridiano verticale e meridiano orizzontale del campo visivo. Il giorno stesso della lesione, nella corteccia visiva si individua una zona silente (cerchio grigio), corrispondente alle cellule che ricevevano ingresso dalla zona di campo visivo interessata dallo scotoma. Due mesi dopo, la zona silente a livello corticale si è ristretta (cerchietto nero) in quanto le cellule corticali private del loro naturale ingresso dalla periferia prendono ora ingresso dalle cellule vicine, il cui campo recettivo è al di fuori dello scotoma. La mappa corticale si è quindi distorta. (Adattata da Kaas, 1997)

comportamentale. Gli effetti «evidenzianti» dell'attenzione non si estendono da un circuito che elabora un aspetto dello stimolo a circuiti che elaborano aspetti diversi.

Ma cosa accade a livello cellulare mentre le nostre capacità discriminative aumentano con la pratica? Il principale correlato neurale dell'apprendimento percettivo sembra essere il reclutamento del territorio corticale.

Sugita (1996) ha studiato scimmie adulte cui erano stati applicati occhiali prismatici (*Dove prisms*) che invertono la destra con la sinistra. All'inizio (2 settimane), tali animali non riescono nemmeno a muoversi e a nutrirsi, ma poi, come accade nell'uomo, riprendono una vita normale ed anche il loro comportamento visuo-motorio si normalizza. Registrando dalla VI dopo un mese e mezzo il 30% delle cellule aveva sviluppato un nuovo campo recettivo nel semicampo ipsilaterale, in posizione simmetrica al normale campo contralaterale rispetto al meridiano verticale e al meridiano orizzontale. Tali campi recettivi non erano più presenti dopo la rimozione degli occhiali e il rapido ritorno comportamentale alla normalità. Questa plasticità fa affidamento sulle connessioni interemisferiche.

Recanzone *et al.* (1993) hanno studiato il fenomeno del miglioramento della discriminazione tonale acustica nella scimmia. Scimmie adulte sono state allenate per diverse settimane a discriminare piccole differenze nella frequenza di singoli toni acustici presentati in sequenza. Gli animali mostravano un chiaro apprendimento percettivo, in quanto diventavano capaci di discriminare differenze tonali progressivamente più piccole. Alla fine del periodo di allenamento, gli AA. hanno studiato la rappresentazione tonotopica della corteccia acustica. Negli animali che avevano acquistato una più fine capacità discriminativa, l'estensione della rappresentazione corticale delle frequenze utilizzate per l'apprendimento era maggiore di quella trovata, per le stesse frequenze, in scimmie che non avevano avuto alcun allenamento. Questa variazione della mappa, corrispondente ad una espansione dei campi recettivi, è veramente correlata all'apprendimento e non alla pura esposizione agli stimoli sonori. Infatti, in scimmie che avevano ascoltato gli stessi stimoli tonali delle scimmie sottoposte all'apprendimento acustico (e per lo stesso numero di volte) ma che erano impegnate in un compito di discriminazione tattile, la capacità discriminativa tonale non variava e non si osservava l'aumento dell'area di rappresentazione corticale per le frequenze ascoltate.

L'aumento dell'area di rappresentazione potrebbe scaturire dal rinforzo, con un meccanismo di tipo hebbiano, degli ingressi sinaptici che rappresentano le frequenze per cui l'animale si è allenato nel compito discriminativo (con corrispondente indebolimento degli ingressi sinaptici rappresentanti frequenze vicine a quelle di allenamento). Una prova che questo meccanismo è effettivamente al lavoro viene da studi di Ahissar *et al.* (1992), in cui l'introduzione (tramite un paradigma analogo al condizionamento classico) di una correlazione positiva o negativa fra la scarica di due neuroni acustici corticali determinava rapidamente (entro 15 min) un aumento dell'efficacia delle connessioni funzionali fra i due neuroni nel caso di correlazione positiva (con conseguente espansione del campo recettivo) ed una diminuzione nel caso di correlazione negativa. Queste modificazioni dell'efficacia sinaptica però avvenivano solo se lo stimolo acustico usato per appaiare l'attività delle cellule corticali era per la scimmia comportamentalmente rilevante, ovvero, se l'animale era sottoposto ad un compito in cui doveva prestare attenzione al tono suddetto.

Un fenomeno analogo si è riscontrato in scimmie allenate a discriminare fra due diverse frequenze di stimolazione tattile applicate ad una piccola zona della cute di due dita di una mano (fig. 9, A). In questi animali, si assiste ad un progressivo miglioramento delle capacità discriminative, che è ristretto alla zona allenata. In parallelo, si ha un grande aumento della rappresentazione corticale di tale zona cutanea ed un aumento, per le cellule corticali in questa zona, della correlazione fra l'attività elettrica di cellule diverse. Questi cambi plastici riscontrati a livello corticale sono effettivamente il mezzo di plasticità corticale, in quanto non sono presenti a livello dei nuclei talamici somatosensoriali. L'osservazione che nella popolazione di cellule l'attività tende ad essere correlata suggerisce che si tratta di una correlata attivazione il fenomeno cruciale per l'espansione della mappa. Un test diretto di questa ipotesi è stato effettuato con esperimenti (Wang *et al.*, 1995) in cui, tramite

l'allenamento in un compito tattile che determinava la ripetuta stimolazione simultanea delle falangi distali dell'indice, del medio e dell'anulare, la mappa corticale si modificava, con la comparsa di campi recettivi che si estendevano dall'indice all'anulare per tutta l'area stimolata (fig. 10). Tali campi recettivi sono normalmente assenti, in quanto la mappa di ciascun dito è chiaramente separata da quella degli altri: questo è probabilmente dovuto al fatto che la stimolazione della cute di dita adiacenti è normalmente asincrona, cosa che dovrebbe contribuire a far emergere rappresentazioni separate durante lo sviluppo ed a mantenerle separate durante l'età adulta.

La stimolazione sincrona tenderebbe quindi a riunire i campi recettivi delle cellule corticali così stimulate, con conseguente cancellazione dei bordi fra le rappresentazioni di zone cutanee adiacenti; la stimolazione asincrona farebbe l'inverso. In effetti, in individui affetti da sindattilia (fusione di uno o più dita, con conseguente stimolazione simultanea della cute corrispondente), non si riscontra una divisione, a livello corticale, della rappresentazione delle dita affette. Una volta effettuata la separazione chirurgica delle dita (con conseguente inizio della stimolazione asincrona), entro poche settimane emerge una chiara divisione della rappresentazione delle diverse dita a livello corticale. Ne consegue che la topografia è una organizzazione dinamica, che può variare sotto il controllo dell'attività afferente.

Da tutti gli esempi riportati, che hanno privilegiato dati raccolti nell'uomo e nei primati non umani, emerge che:

a) l'apprendimento è in grado di provocare cambi anche a livello dei campi recettivi e delle mappe topografiche nelle corteccie sensoriali e motorie primarie: questo contraddice l'idea di una rigidità (stabilità) delle connessioni che sono alla base della organizzazione topografica e dei campi recettivi;

b) è necessario che ci sia una rilevanza comportamentale degli stimoli sensoriali o motori perché questi cambi si verifichino (è necessario che ci sia attenzione e motivazione): questo suggerisce un ruolo per i sistemi ascendenti che modulano l'attività delle cellule corticali in funzione dello stato comportamentale;

c) la plasticità sembra essere di natura principalmente corticale;

d) i meccanismi di apprendimento potrebbero operare attraverso cambiamenti dell'efficacia sinaptica che obbediscono alle regole ipotizzate da Hebb (regole che presuppongono la correlazione fra l'attività in entrata ed in uscita) per spiegare l'apprendimento associativo.

Con quali meccanismi è possibile che in un cervello adulto si attuino questi cambiamenti? La risposta è probabilmente nell'esistenza di una certa ridondanza negli ingressi e nelle uscite delle cellule corticali (fig. 10). Quindi, l'area corticale potenziale su cui può essere rappresentato un punto della periferia recettoriale può essere molto grande e, di converso, l'area recettoriale che fornisce l'ingresso ad una cellula corticale è molto grande. Un campo recettivo misurato in maniera convenzionale è quindi un sottoinsieme di questa vasta zona periferica.

Il ruolo della coincidenza temporale degli ingressi nel modificare campi recettivi e topografia potrebbe quindi essere quello di selezionare, a richiesta, un sottoinsieme di tali ingressi (quelli ripetutamente attivi insieme), aumentando l'efficacia sinaptica, ed eventualmente riducendo quella degli altri, possibilmente con meccanismi tipo LTP.

Un campo recettivo è quindi una struttura dinamica, che può cambiare senza che necessariamente si formino connessioni anatomiche nuove che forniscono l'ingresso alla cellula corticale.

Qui vorremmo concludere con una riflessione. La correlazione degli ingressi come meccanismo alla base dei processi di plasticità sembra valere sia durante lo sviluppo che durante l'età adulta, sia nell'ippocampo che nelle corteccie sensoriali e motorie. Quello che cambia sono i processi che seguono a questa iniziale presenza di correlazione fra i due

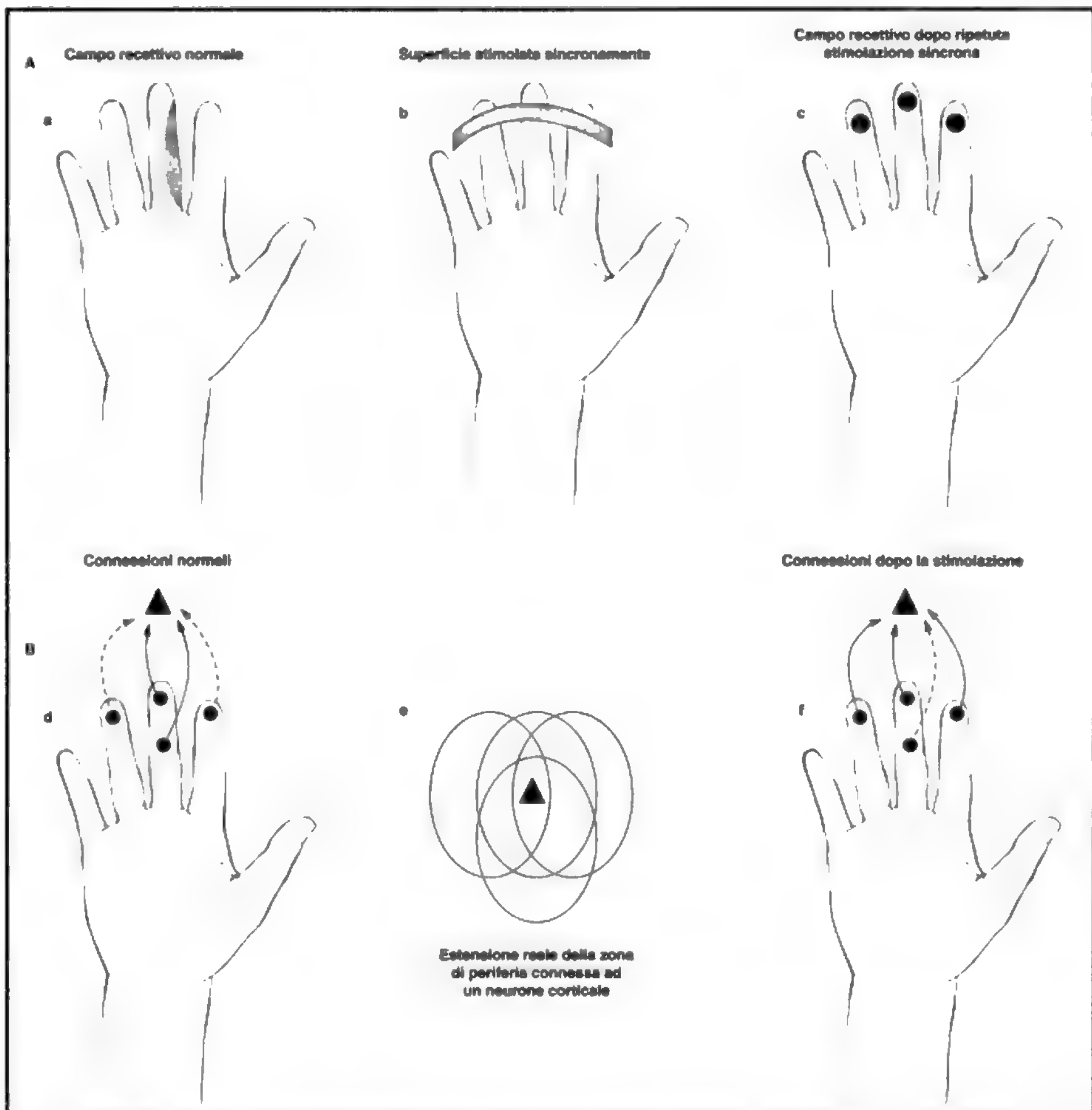


Fig. 10. Meccanismi di plasticità delle mappe corticali nell'adulto. A) Ruolo della coincidenza tra gli ingressi ad un neurone corticale nel modificarne il campo recettivo: (a) una cellula corticale nell'area 3b della corteccia somatosensoriale ha inizialmente un campo recettivo (zona ombreggiata) sulla cute del dito medio; dopo ripetuta stimolazione sincrona della cute dell'indice, del medio e dell'anulare (b), la cellula mostra un campo recettivo sulla cute di tutte e tre le dita, in corrispondenza delle falangi distali (c). Si sono rinforzate le connessioni stimulate sincronamente e si è indebolita quella meno stimolata (parte proximale del campo recettivo sul medio). B) Possibile spiegazione del fenomeno sopra descritto. Il neurone corticale (rappresentato dal triangolo scuro) riceve ingressi dalla cute del dito medio, ma riceve connessioni anche dalla cute del dito indice e dell'anulare (d); queste connessioni sono però meno efficaci (connessioni tratteggiate) e non danno origine a risposte apprezzabili, per cui il campo recettivo risulta localizzato in corrispondenza del medio. L'estensione della zona di periferia connessa con questo neurone è però più grande del campo recettivo misurabile classicamente, come schematizzato in (e), in cui ogni ovale rappresenta un possibile campo recettivo. In seguito a ripetuta stimolazione sincrona di un sottoinsieme di connessioni, queste si rinforzano, le altre si indeboliscono ed il campo recettivo si riorganizza (f). Un campo recettivo è quindi la punta dell'iceberg delle connessioni di una cellula corticale con la periferia: ogni cellula corticale è connessa con una larga zona di periferia ed è l'attività che seleziona l'insieme di connessioni «vincenti», che costituiranno il nuovo campo recettivo. Con questa ipotesi si spiegherebbero i fenomeni di plasticità delle mappe sia in seguito ad arricchimento dell'esperienza sia in seguito a lesione periferica.

eventi, processi che rispondono alle diverse esigenze del sistema nervoso (formazione delle connessioni in un caso, adattamento alle richieste della situazione nell'altro): ne

consegue che la plasticità nell'adulto, pur obbedendo apparentemente alle stesse leggi di quella nello sviluppo, ha un significato profondamente diverso, e coinvolge probabil-

mente meccanismi diversi. Non è quindi un residuo della plasticità durante lo sviluppo, è una plasticità diversa e tutta da esplorare.

Plasticità da lesione

Nel capitolo precedente abbiamo visto come anche in un cervello adulto sia possibile avere un alto grado di plasticità in seguito ad un aumento dell'uso. Ora vedremo i risultati di studi che hanno mostrato la presenza, in soggetti adulti, di una massiccia riorganizzazione nelle cortece sensoriali e motorie primarie in seguito ad una riduzione dell'attività proveniente dalla periferia, come nel caso di lesioni periferiche o di amputazioni.

Corteccia somatosensoriale

I primi dati sulle capacità di riorganizzazione nel S.N.C. adulto in seguito a lesioni periferiche sono stati ottenuti da Merzenich *et al.* (1996) nel sistema somatosensoriale della scimmia. La lesione di un nervo periferico determina la comparsa, a livello corticale, di una zona silente, corrispondente alle cellule che sono state deprivate dell'ingresso periferico. In seguito, però, tale zona silente scompare in quanto le cellule corticali al suo interno iniziano a rispondere alla stimolazione della cute adiacente a quella deafferentata. Si è avuta, cioè, una rimappatura: cellule corticali che facevano parte, ad esempio, della rappresentazione del palmo della mano rispondono ora alla stimolazione delle dita. Tali modificazioni plastiche sono a carico delle connessioni intracorticali, almeno per quelle che si manifestano rapidamente (giorni).

Più recentemente, sono stati ottenuti dati su pazienti che hanno subito l'amputazione di un arto. Tali pazienti sperimentano spesso il cosiddetto fenomeno dell'arto fantasma (v.), ovvero, continuano a percepire la presenza dell'arto ed a provare sensazioni provenienti da esso (v. CORPOREO SCHEMA). Ramachandran (1993) ha studiato alcuni pazienti che avevano subito l'amputazione del braccio ed in tutti ha trovato che c'era una mappa, topograficamente organizzata, della superficie dell'arto mancante sulla cute del moncone, subito prossimale alla linea di amputazione. In 3 pazienti, inoltre, una seconda mappa dell'arto fantasma era presente sulla faccia. Non è irrilevante notare la vicinanza fra braccio, mano e faccia nella mappa somatosensoriale. Da notare che i pazienti riferiscono gli effetti della stimolazione della cute del viso alla stimolazione della cute dell'arto mancante.

Anche la corteccia visiva mostra un alto grado di plasticità nell'adulto in risposta ad una forte riduzione dell'ingresso sensoriale (Gilbert, 1996). La creazione di uno scotoma binoculare (tramite piccole lesioni focali in punti corrispondenti delle due retine) dovrebbe produrre a livello corticale una zona di cellule silenti, in quanto sono state private dell'ingresso visivo. E in effetti, entro pochi minuti dalla lesione, si osserva a livello corticale una larga zona in cui le cellule, prima responsive a stimoli entro lo scotoma, ora sono silenti. Si osserva però un primo fenomeno, rapido, di plasticità: le cellule corticali con campo recettivo ai bordi dello scotoma, allargano il campo recettivo, smascherando la presenza di ingressi da punti del campo visivo più lontani dallo scotoma.

Entro qualche mese dalla lesione (fig. 9, B), uno stupefacente cambio plastico avviene: a livello corticale lo scotoma non esiste più, anche se è tuttora presente a livello retinico ed a livello del nucleo genicolato laterale. Con un processo tutto intracorticale, le cellule il cui campo recettivo era all'interno dello scotoma ora hanno un campo recettivo fuori dallo scotoma, ossia ricevono ingresso dai punti adiacenti nel campo visivo. La domanda se c'è mislocalizzazione percettiva, così come nel sistema somatosensoriale, rimane senza risposta, per ora.

Rimappatura

Come avviene la rimappatura? Rimappatura vuol dire espansione o spostamento del campo recettivo sotto l'influsso dell'attività elettrica, un fenomeno che abbiamo già esaminato nella sezione precedente. Le conclusioni sono largamente analoghe:

a) la rapidità di alcuni effetti di rimappatura (< 4 settimane) suggerisce che si tratti di smascheramento di connessioni preesistenti e silenti (tramite eventualmente disinibizione): del set di connessioni che afferiscono ad un neurone corticale, venendo a mancare l'insieme principale, verrebbero alla luce le altre. Questo è confermato da un recente esperimento di magnetoencefalografia (Rossini *et al.*, 1994) in cui la rimappatura, per estensioni minori di area corticale, avveniva entro 20 min da un silenzio periferico ottenuto tramite anestesia ischemica dell'anulare: la mappa dell'indice, del medio e del mignolo si allargava cospicuamente;

b) l'estensione delle arborizzazioni talamo-corticali nella scimmia (600 µm per un terminale assonico talamico in S1, circa 2 mm per la zona di sovrapposizione degli assoni da cellule talamiche vicine in S1) non è sufficiente a spiegare l'estensione della rimappatura a lungo termine (fino a 3 cm), ma è sufficiente per essere la base preesistente per i cambi rapidi, che infatti sono limitati a zone entro 1-2 mm;

c) per cambi da spostamento dei campi recettivi nella mappa di più di 3 mm ma entro 1 cm, e/o che si manifestano entro poche settimane, si può pensare a cambi dell'efficacia sinaptica di connessioni preesistenti, in questo caso le connessioni intracorticali orizzontali a lungo raggio (6-8 mm di estensione);

d) per cambi di campo recettivo di più di 1 cm e che si manifestano dopo mesi occorre pensare alla formazione di nuove connessioni (*sprouting*);

e) il sito di plasticità è corticale o sottocorticale? Per gli effetti rapidi è in larga misura corticale. Per gli effetti più lenti a manifestarsi può essere sottocorticale (Florence *et al.*, 1997), con il vantaggio che un piccolo *sprouting* a livello periferico dà un grosso cambio a livello corticale.

Bibliografia

- Alusar E. *et al.*, *Science*, 1992, **257**, 1412-1415.
 AA. VV., *Functional plasticity in adult cortex*, in Kaas J. H. ed., *Seminars in neuroscience*, 1997, Vol. 9, 1-2, Academic Press, New York.
 Berardi N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 684-688.
 Bliss T. V. P., Collingridge G. L., *Nature*, 1993, **361**, 31-39.
 Bonhoeffer T., *Curr. Op. Neurobiol.*, 1996, **6**, 119-126.
 Cam P. D., *Curr. Op. Neurobiol.*, 1997, **7**, 235-242.
 Carmignoto G., Vicini S., *Science*, 1992, **258**, 1007-1011.
 Das A., Gilbert C. D. (Plasticità da lesione nella corteccia visiva), *Nature*, **375**, 780-784.
 Deisseroth K. *et al.*, *Curr. Biol.*, 1995, **5**, 1334-1338.
 Donoghue J. P. (Plasticità della rappresentazione sensorimotoria nell'adulto), *Curr. Op. Neurobiol.*, 1995, **5**, 749-754.
 Dudek S., Friedlander M. J., *Neuron*, 1996, **16**, 1097-1106.
 Elbert T. *et al.* (Plasticità corticale motoria nell'uomo), *Science*, 1995, **270**, 305-307.
 Faggin B. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 9428-9433.
 Fiorentini A., Berardi N., *Nature*, 1989, **287**, 43-44.
 Flor H. *et al.* (Estensione della rimappatura in S1, uomo), *Nature*, 1995, **375**, 482-484.
 Florence H., Kaas J. H. (Sito della rimappatura, corticale o sottocorticale), *J. Neurosci.*, 1995, **15**, 8083-8095.
 Fox K., *Neuron*, 1995, **15**, 485-488.
 Galli L., Maffei L., *Science*, 1988, **242**, 90-91.
 Gilbert C. D. (Plasticità nella corteccia visiva), *Curr. Op. Neurobiol.*, 1996, **6**, 269-274.
 Hebb D. O., *The organization of behaviour*, 1949, John Wiley, New York.
 Kandel E. R., Schwartz C. H., Jessel T., *Principi di Neuroscienze*, Ambrosiana Editrice (1993), Milano (Ediz. Inglese 1991).
 Kang H., Schuman E. M., *Science*, 1995, **267**, 1659-1662.
 Karni A., Bertini G. (Rassegna su plasticità da apprendimento percettivo), *Curr. Op. Neurobiol.*, 1997, **7**, 530-535.
 Karni A. *et al.* (Plasticità nella corteccia motoria dell'uomo), *Nature*, 1995, **377**, 155-158.

- Katz L. C., Shatz C. J., *Science*, 1996, **274**, 1133-1138.
 Lo Y. J., Poo M., *Science*, 1991, **254**, 1019-1022.
 Lohof A. M., Ip N. Y., Poo M. M., *Nature*, 1993, **363**, 350-353.
 Maffei L. et al., *J. Neurosci.*, 1992, **12**, 4651-4662.
 Merzenich et al., *Science*, 1996, **271**, 77-84, con commentario di Barnaga sullo stesso numero di *Science*.
 Nichols J. G., Martin A. R., Wallace B. G., *Dai neuroni al cervello*, 1997, Zanichelli, Bologna (Ediz. Inglese 1992).
 Nudo R. J. et al. (Plasticità corteccia motoria adulto), *J. Neurosci.*, 1996, **16** (2), 785-807.
 O'Leary et al. (Plasticità corteccia somatosensoriale), *Curr. Op. Neurobiol.*, 1994, **4**, 535-544.
 Pizzorusso T. et al., *Letters to Neuroscience*, 1997, (in stampa).
 Pizzorusso T., Maffei L., *Curr. Op. Neurol.*, 1997, **9**, 122-125.
 Ramachandran V. S. (Plasticità da lesione nell'uomo), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 10413-10420.
 Recanzone et al. (Plasticità corteccia acustica adulto), *J. Neurosci.*, 1993, **13**, 87-103.
 Rossini P. M. et al., *Brain Res.*, 1994, **642**, 169-177.
 Sadato et al. (Attivazione della V1 nei ciechi nati), *Nature*, 1996, **380**, 526-528.
 Sanes D. H., Constantine-Patron M., *Science*, 1983, **221**, 1183-1185.
 Shatz C. J., *Neuron*, 1990, **5**, 745-756.
 Sherman S. M., Spear P. D., *Physiol. Rev.*, 1982, **71**, 587-615.
 Stryker M. P., Harris W. A., *J. Neurosci.*, 1986, **6**, 1078-1099.
 Stryker M. P., in Lam D. M. K., Shatz C. J. (eds.), *Development of the visual system*, 1991, Cambridge, Mass. MIT Press, pp. 267-287.
 Sugita Y., *Nature*, 1996, **380**, 523-526.
 Sur M., *Nature*, 1995, **378**, 13-14.
 Thoenen H., *Science*, 1995, **270**, 593-598.
 Wang et al., *Nature*, 1995, **378**, 71-74.
 Weinberger N. M. (Contiene anche una rassegna dei primi dati di Merzenich e Kaas), *Ann. Rev. Neurosci.*, 1995, **18**, 129-158.

NICOLETTA BERARDI

NEURORADIOLOGIA: V. ARTERIOGRAFIA, arteriografia cerebrale (II, 940-952); ENDOCRANICI TUMORI (V, 1971-1990); ENDOCRANICI TUMORI* (coll. *2670-2693); PSICHIATRIA**, visualizzazione cerebrale in psichiatria; SCINTIGRAFIA (XIII, 2208-2215); TOMOGRAFIA A EMISSIONE DI POSITRONI (PET) (XIV, 2409-2411); TOMOGRAFIA A EMISSIONE DI SINGOLI FOTONI (XIV 2413; *7064-7065); TOMOGRAFIA A RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE*, patologia del S.N.C. (XIV, 2430-2439); TOMOGRAFIA A RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE* (coll. *7105-7120); TOMOGRAFIA ASSIALE COMPUTERIZZATA, patologia del S.N.C. (XIV, 2525-2538).

NEURO-URO-GASTROENTEROLOGIA

SOMMARIO

Definizione e obiettivi (col. 4045). - **Fisiopatologia con implicazioni cliniche relative alla incontinenza urinaria, alla incontinenza fecale e ai disturbi dell'erezione** (col. 4046): *Urgenza minzionale. - Incontinenza fecale. - Disturbi dell'erezione.*

Definizione e obiettivi

La neuro-uro-gastroenterologia è quella branca della medicina che studia le alterazioni anatomofunzionali del sistema urogenitale e gastroenterico secondarie ad una sofferenza del sistema nervoso centrale o periferico.

Gli obiettivi che si prefigge la neuro-uro-gastroenterologia sono:

a) l'identificazione della prevalenza e della severità dei disturbi urogastroenterologici in pazienti con lesioni del sistema nervoso centrale e periferico;

b) l'identificazione dei centri nervosi a vari livelli del neurasse le cui lesioni causano alterazioni della funzione motoria gastrointestinale ed urinaria (tab. I);

c) descrizione delle modalità diagnostiche non invasive per individuare le alterazioni motorie gastrointestinali ed uro-genitali in pazienti con lesioni del sistema nervoso centrale e periferico (tab. II, tab. III, tab. IV);

d) approntamento di schemi di terapia, fisica riabilitativa e/o farmacologica, per trattare i disturbi gastrointesti-

TAB. I. CENTRI DI CONTROLLO DELLA CONTINENZA

Circuito	Origine-destinazione	Funzione
Cerebrale	lobo frontale gangli basali tronco encefalico	inizia ed inibisce il passaggio tra la fase di riempimento e di svuotamento
Spinale	tronco encefalico cono midollare	coordina lo svuotamento rettale e vescicale
Segmentale	nervi pelvici e pudendi motoneuroni sacrali	attiva il riflesso di svuotamento e il rilasciamento sfinterico
Cortico-spinale	corteccia motoria primaria motoneuroni sacrali	controllo volontario dei muscoli sfinterici e del piano pelvico

TAB. II. ESAMI NEUROFISIOLOGICI

Elettromiografia del piano perineale
 Stimolazione transcutanea della cauda equina
 Riflesso bulbocavernoso elettrico
 Potenziali evocati somatosensoriali da nervo pudendo
 Potenziali evocati motori da stimolazione transcranica

TAB. III. ESAMI GASTROENTEROLOGICI

Manometria anorettale
 Defecografia
 Studio ultrasonografico dinamico
 Scintigrafia con gamma camera
 Studio del transito oro-cecale (test del respiro all'idrogeno)
 Studio del transito segmentario del crasso (con indicatori radioopachi)
 Studio delle funzioni digestive e assorbitive

TAB. IV. ESAMI UROLOGICI

Urodinamica
 Cistoscopia
 Pielografia
 Urografia
 Rigi-scan (v. col. **4049)
 Ecodoppler dinamico penieno

nali e urologici in pazienti con lesioni del sistema nervoso centrale e periferico. Ciò al fine di migliorare l'autonomia del paziente neuroleso cercando di ridurre principalmente le interferenze tra terapie neurologiche, urologiche e gastroenterologiche.

Fisiopatologia con implicazioni cliniche relative alla incontinenza urinaria, alla incontinenza fecale e ai disturbi dell'erezione

Urgenza minzionale

L'urgenza minzionale è un sintomo comune, ma di per sé, aspecifico; infatti diverse sono le cause che la determinano.

Schematicamente possiamo riconoscere forme idiopatiche, ostruttive, sensitive, e motorie.

a) *Le forme idiopatiche*, che includono la cosiddetta *urge incontinence*, descritta all'esame urodinamico (International Continence Society, 1976) da contrazioni detrusoriali non inibite presenti già ad un riempimento di 300 ml, sono quelle che non presentano danni organici e per esse viene supposta come etiopatogenesi un'alterata maturazione della vescica.

L'incontinenza da stress è invece caratterizzata da una significativa perdita di urine dopo colpi di tosse o risate. Solo alcuni pazienti presentano la forma pura che viene diagnosticata con un esame urodinamico. In tale forma si osservano l'assenza di contrazioni detrusoriali ed una pressione intravesicale superiore a quella di chiusura uretrale durante l'episodio di incontinenza.

Tale incontinenza si verifica nei casi iatrogeni post-chirurgici (come nelle resezioni del collo vescicale, nella sfinterotomia esterna praticata nei pazienti paraplegici per promuovere il drenaggio urinario), nelle forme infiammatorie, degenerative e post-irradiazione vescicale. Candidate a questo tipo di incontinenza sono inoltre le donne che hanno partorito. Queste solitamente presentano una discesa del collo vescicale o difetti della sospensione anteriore o posteriore della vescica (Tanagho, 1974) o incompetenza del pavimento pelvico (Snooks *et al.*, 1984). Quest'ultima condizione è solitamente accompagnata da una sofferenza delle terminazioni del nervo pudendo che innerva i muscoli del pavimento pelvico e gli sfinteri: quindi spesso l'incontinenza urinaria può associarsi con quella fecale. In questi casi è determinante l'esame elettromiografico che evidenzia un danno neurogeno della muscolatura del piano perineale con alterazione del riflesso bulbocavernoso.

Vanno sempre differenziati i casi di incontinenza urinaria secondari a cistocele che tipicamente non presentano alcun danno a livello della muscolatura anorettale.

b) *Le forme ostruttive* sono generalmente causate da ipertrofia e neoplasie della prostata (v.; v.*; v.***) o da restringimenti uretrali.

Le patologie secondarie a lesioni neurologiche sono invece quelle in cui vi è una contrazione paradossa del collo vescicale che comporta una marcata ostruzione funzionale all'espulsione dell'urina. Ciò si riscontra in un ristretto numero di pazienti con danno midollare: in questi si nota infatti un quadro di dissinergia detruso-sfinterica secondaria al mancato controllo del centro reticolare pontino che, normalmente, regola il sinergismo d'azione tra i muscoli durante lo svuotamento vescicale.

A livello dello sfintere striato si può, altresì, determinare, in risposta sia ad una uretrite che a disturbi psicologici, la cosiddetta *pseudo-dissinergia*. Questa va comunque differenziata dalla vera dissinergia sostenuta dall'alterata inibizione reciproca, secondaria ad una sofferenza del sistema nervoso centrale. Esami dirimenti in questo senso risultano essere l'urodinamica e la cistouretrografia minzionale; quest'ultima rivela una chiusura uretrale più corta nei casi di pseudo-dissinergia (Blaivas e Labib, 1977; McGuire, 1984). È importante ricordare che la mancanza di rilasciamento degli sfinteri, spesso in associazione a contrazioni detrusoriali non inibite, può essere presente in patologie degenerative del sistema nervoso quali ad es. la malattia di Parkinson e l'atrofia multisistemica (malattia degenerativa di più sistemi neuronali centrali, caratterizzata prevalentemente da una sindrome extrapiramidale, da disturbi neurovegetativi e dalla mancanza di risposta alla terapia dopaminergica [Inghilterra *et al.*, 1998]).

c) *Le forme sensibili* sono caratterizzate da una ridotta capacità funzionale vescicale poiché vi è un'abnorme ecci-

tazione delle afferenze sensitive provenienti dalla mucosa vescicale. Ciò produce una precoce attivazione del riflesso detrusoriale associato a senso di pienezza vescicale e conseguente urgenza minzionale spesso dolorosa. Le cause principali di tale disturbo sono le patologie infiammatorie e neoplastiche della mucosa uretrale e vescicale. I pazienti neurologici che accusano difficoltà nello svuotamento presentano più frequentemente cistiti ed uretriti. In questi casi supporti diagnostici utili sono, oltre agli esami ematochimici e delle urine con urinocoltura, la pielografia e, se necessario, la cistoscopia e l'urografia.

d) *Le forme motorie* sono tipicamente secondarie ad una sofferenza neurologica: di solito sono dovute ad una ipereccitabilità del riflesso di svuotamento vescicale. Si riconoscono forme idiopatiche e secondarie. Queste ultime possono essere causate dalla sofferenza dei centri nervosi sovrappontini come: nelle lesioni frontali bilaterali (Andrews e Nathan, 1964), nell'idrocefalo, nel meningioma parasagittale, in alcune forme degenerative quali il morbo di Parkinson (Murnagha, 1961; Pavlakis *et al.*, 1983) e l'atrofia multisistemica (Quinn, 1989). Sul piano fisiopatologico le lesioni cerebrali determinano perdita dell'inibizione del centro minzionale pontino così da produrre lo svuotamento vescicale involontariamente e prematuramente. Sotto il profilo funzionale l'atto dello svuotamento, così come il flusso, risultano normali mentre lo stop viene effettuato tramite la contrazione volontaria dello sfintere striato che si oppone alla continua contrazione del muscolo detrusore. Nel caso, invece, delle lesioni midollari l'incontinenza urinaria è associata ad alterato ed incompleto svuotamento vescicale accompagnato spesso da dissinergia detruso-sfinteriale: il quadro generalmente arriva a produrre ritenzione urinaria che assomiglia molto a quella prodotta da una ostruzione intravesicale.

V. anche. URODINAMICA (XV, 1312); INCONTINENZA URINARIA (VII, 1720); MINZIONE (IX, 1593).

Incontinenza fecale

L'incontinenza fecale è un disturbo che può modificare notevolmente lo stile di vita di un gran numero di pazienti. Vengono riconosciute come cause più significative i traumi sullo sfintere esterno dell'ano, il prollasso rettale (Henry, 1980), i danni neurogeni della muscolatura del pavimento pelvico soprattutto dopo il parto (Snooks *et al.*, 1984), le alterazioni della *compliance* rettale, le modificazioni della consistenza fecale, i danni a carico delle radici nervose sacrali o del cono midollare, sede del centro parasimpatico sacrale e dei motoneuroni che controllano gli sfinteri (nucleo di Onuf) e la muscolatura pelvica.

La denervazione o il danno chirurgico dei muscoli sfinterici causa inabilità nel controllo del *flatus* o di feci morbide, mentre la denervazione del muscolo puborettale e la conseguente perdita del normale angolo anorettale determina incontinenza fecale solida.

Generalmente le alterazioni anatomiche dello sfintere striato sono quelle che risentono favorevolmente dei provvedimenti chirurgici anche se il ruolo svolto dalla neuropatia del nervo pudendo è fondamentale nel produrre incontinenza fecale (Kiff e Swash, 1984; Beersiek, 1983). A tal proposito, infatti, un gran numero di casi che in passato venivano definiti idiopatici oggi vengono ascritti, con frequenza superiore nel sesso femminile, a danni neurogeni della muscolatura del pavimento pelvico (Snooks *et al.*, 1985; Parks *et al.*, 1977). Ovviamente la neuropatia può coesistere con deficit anatomici dello sfintere anale tanto che, per tale motivo, si impone, oltre alla manometria anorettale, anche la misurazione delle latenze motorie delle terminazioni del nervo pudendo con l'elettromiografia del

piano pelvico (Vernava *et al.*, 1993; Felt Bersma *et al.*, 1989; Pinho *et al.*, 1991; Wexner *et al.*, 1991; Swash e Snooks, 1985).
V. anche: DEFCAZIONE (IV, 2022); INCONTINENZA FECALE (VII, 1713).

Disturbi dell'erezione

I disturbi dell'erezione possono essere causati da lesioni a carico del sistema nervoso, vascolare, ormonale, oppure dipendere da cause psicologiche. Dal punto di vista neurologico è necessario ricordare che a livello mielomero S3-S4 (cono midollare) è situato il centro riflesso parasimpatico dell'erezione; la stimolazione cutanea del glande evoca la vasodilatazione e l'apertura delle anastomosi arterovenose nei corpi cavernosi. Vi è, inoltre, un centro simpatico, attivato prevalentemente da stimoli psicogeni, situato a livello mielomero T11-L2.

Schematicamente, tra le cause neurologiche, riconosciamo le lesioni del midollo spinale o della cauda equina (su base tumorale, demielinizzante, vascolare, traumatica e malformativa) ed i danni dei nervi periferici (neuropatia alcolica, diabetica) (Fowler *et al.*, 1988; Fairburn, 1981).

Nelle lesioni midollari o della cauda equina, Guttmann (1976) descriveva più fasi nella fisiopatologia dell'erezione. Subito dopo una lesione midollare si manifesta la fase dello shock spinale, che può durare da poche ore a diverse settimane, durante le quali si osserva la completa abolizione dell'erezione e dell'eiaculazione, clinicamente non è possibile evocare il riflesso bulbocavernoso e cremasterico. Si ipotizza che questa fase sia secondaria all'interruzione di sistemi di fibre discendenti sovrasegmentali normalmente facilitanti i motoneuroni spinali (Adams e Victor, 1989). In una seconda fase, se la lesione è al di sopra del mielomero T11, si osserva che la stimolazione cutanea del glande evoca la comparsa di una intumescenza peniena. Solitamente in questa fase si osserva la ricomparsa del riflesso detrusoriale e l'instaurarsi di una spasticità sottolesionale. Gli stimoli tattili determinano la comparsa dell'intumescenza peniena per l'integrità del centro riflesso sacrale S3-S4. I pazienti con lesione mielomera al di sotto di L2 avranno solo una modesta intumescenza peniena indotta da stimoli psicologici (stimoli visivi, uditivi, olfattivi) grazie al normale funzionamento della via simpatica toraco-lombare.

È necessario prendere in considerazione altre cause organiche che comportano disturbi dell'erezione, tra cui sicuramente le più importanti sono le vasculopatie (ateroma dell'arteria iliaca interna, coartazione dell'aorta, fistola cavernosa) e i disordini ormonali.

Assume particolare rilevanza nel paziente con impotenza *erigendi* l'accurata anamnesi con la valutazione delle erezioni notturne e l'esame neurologico poiché già da questi dati può essere postulata l'ipotesi diagnostica.

L'ecodoppler dinamico ed il *rigi-scan* (sistema computerizzato per la monitorizzazione, mediante trasduttori posti sul pene, dell'intumescenza notturna) verranno poi utilizzati per lo studio dell'apparato vascolare: si effettueranno quindi i dosaggi ormonali e l'ecografia testicolare. Le indagini neurofisiologiche devono essere richieste nel sospetto di un coinvolgimento del sistema nervoso periferico o centrale: di particolare rilevanza è l'elettromiografia del piano perineale con lo studio del riflesso bulbocavernoso, seguita dallo studio dei potenziali evocati motori da stimolazione corticale e dei potenziali evocati somatosensoriali da nervo pudendo per il controllo delle vie di conduzione centrale.

Per quanto concerne l'impiego del sildenafil (Viagra®) nel trattamento dei disturbi dell'erezione, si rinvia alle voci IMPOTENZA** (col. **2337) e SILDENAFIL**.

V. anche: EREZIONE (VI, 26); EIAICULAZIONE (V, 846); IMPOTENZA (VII, 1692; *3701; **2734).

Bibliografia

- Adams D. B., Victor M., *Diseases of the spinal cord*, in Adams D. B., Victor M. eds., *Principles of neurology*, 5 ed., New York, McGraw-Hill, 1993, p. 1059.
Andrews J., Nathan P. N., *Brain*, 1964, **87**, 233-262.
Beersick F., *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* (Sir Allan Parks 1920-1982), 1983, **32**, 17-19.
Fairburn C., *Br. J. Hosp. Med.*, 1981, **25**, 484-491.
Felt-Bersma R. J., Strijer R. L., Janssen J. J *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1989, **32**, 112-116.
Fowler C. J., Ali Z., Kirby R. S., Pryor J. P., *Br. J. Urol.*, 1988, **61**, 63-67.
Guttmann L., *Spinal cord injuries. Comprehensive management and research*, in Blackwell Scientific Publications, 2 ed., Oxford, 1976, 474-505.
Henry M. M., *Br. J. Hosp. Med.*, 1980, **24**, 302-307.
Inghileri M., Carbone A., Stocchi F. *et al.*, *NeuroUroGast.*, 1995, **1**, 8-13.
International Continence Society, *Br. J. Urol.*, 1976, **48**, 39-42.
Kiff E. S., Swash M., *Br. J. Surg.*, 1984, **71**, 614-616.
Murnagha G. F., *Br. J. Urol.*, 1961, **333**, 403-409.
Parks A. G., Swash M., Urlick H., *Gut*, 1977, **18**, 656-665.
Pavakis A. J., Siroky M. B., Goldstein I. L., Krane R. J., *J. Urol.*, 1983, **129**, 801-83.
Pinho M., Hosie K., Bielecki K., Keighley M. R., *Dis. Colon Rectum*, 1991, **34**, 69-71.
Quinn N., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1989 (Suppl.), 78-79.
Snooks S. J., Swash M., Seichell M., Henry M. M., *Lancet*, 1984, **2**, 546-550.
Snooks S. J., Swash M., Henry M. M. *et al.*, *Br. J. Surg.*, 1985, **72** (Suppl.), S15-17.
Swash M., Snooks S. J., *Coloproctology and the pelvic floor: pathophysiology and management*, in Henry M. M., Swash M. eds., 1985, 88-103. London Butterworths.
Tanagho E. A., *Br. J. Urol.*, 1974, **46**, 295-302.
Vernava A. M., Longo W. E., Daniel G. L., *Dis. Colon Rectum*, 1993, **36**, 23-27.
Wexner S. D., Marchetti F., Salanga V. D. *et al.*, *Dis. Colon Rectum*, 1991, **34**, 606-612.

MAURIZIO INGHILERI E MARCO ARGENTIA

NEVROSI [v. vol. X, coll. 1134-1166]

SOMMARIO

Terminologia (col. 4050). - **Etiopatogenesi delle nevrosi** (col. 4050): **Modelli psicobiologici**. - **Generalità sulla nosografia delle nevrosi** (col. 4051). - **Terapia farmacologica** (col. 4051).

Terminologia

Il termine di nevrosi [n.], nella nosologia attuale, si va dissolvendo, per lasciar posto a denominazioni che non contengono più le dizioni «nevrosi» e «nevrotico», considerate ambigue e imprecise. Nonostante ciò la forza tradizionale del termine fa sì che esso venga ancora ampiamente usato.

Gli aspetti di maggior interesse che riguardano oggi il capitolo delle n. sono quelli concernenti i nuovi modelli psicobiologici nell'etiopatogenesi, la diversa e più particolareggiata tassonomia, l'intervento terapeutico di tipo farmacologico.

Etiopatogenesi delle nevrosi

Modelli psicobiologici

Sul versante *neuroanatomico* l'ansia, in quanto emozione, viene correlata alle funzioni svolte dal sistema limbico, in particolare dalla via setto-ippocampale e dal giro cingolato, e dalla corteccia cerebrale (frontale e temporale).

La *neurofisiologia* cerebrale, attraverso l'uso della tecnica dei *potenziali evocati*, ha evidenziato che nei disturbi di somatizzazione esistono alterazioni di talune funzioni cognitive (ad es. l'eccessiva distraibilità, la mancanza di selettività agli stimoli, etc.).

Gli studi di *brain-imaging* hanno mostrato che l'esistenza di una certa asimmetria emisferica (ad es. a livello dell'emisfero destro) potrebbe avere un significato in pazienti specifici che sviluppano disturbi d'ansia. Si può, più in generale,

ammettere che i soggetti con disturbi d'ansia siano portatori di alterazioni encefaliche (ad es. in sede occipitale e temporale, nella corteccia frontale o nella circonvoluzione paraippocampale). Nei disturbi somatoformi si è riscontrato (sebbene in un campione numericamente limitato) l'esistenza di una riduzione delle attività metaboliche dei lobi frontali e dell'emisfero non dominante.

L'esistenza di una *componente genetica* nei disturbi d'ansia è ampiamente dimostrata dal fatto che quasi il 50% dei soggetti con disturbo di panico hanno almeno un familiare che presenta la stessa sintomatologia. Nel disturbo di somatizzazione i familiari di primo grado di sesso femminile di soggetti con questo tipo di patologia hanno dal 10 al 20% di possibilità di esserne anch'essi affetti.

Il ruolo dei *neurotrasmettitori* nei disturbi d'ansia chiama in causa sia la noradrenalina, sia la serotonina, sia l'ac. gamma-amino-idrossibutirrico (GABA). Per la noradrenalina si suppone l'esistenza di un sistema di controllo della sua attività la cui regolazione sarebbe alterata. È noto, d'altra parte, che soggetti con disturbi di panico possono andare incontro a un attacco se si somministrano loro agonisti beta-adrenergici, come l'isoproterenolo, e antagonisti alfa2-adrenergici, come la yimbina. Anche per la serotonina si può ricordare come gli antidepressivi serotoninergici (ad es. la clomipramina) e un agonista serotoninergico, quale il buspirone, agiscono, rispettivamente, nel disturbo ossessivo-compulsivo la prima e nei disturbi d'ansia il secondo.

Venendo al GABA, l'efficacia delle benzodiazepine (che intervengono ad aumentare l'attività di tale neurotrasmettitore a livello dei recettori GABA_A) nel controllare i disturbi d'ansia è nota (in particolare le benzodiazepine a bassa potenza agiscono sul disturbo da ansia generalizzata, mentre quelle ad alta potenza, come l'alprazolam, lo fanno nei disturbi di panico).

Un'alterata regolazione delle citochine, sostanze che funzionano da messaggeri molecolari nel sistema immunitario, potrebbe stare alla base della genesi di taluni sintomi (ad es. senso di fatica) che si osservano nei disturbi somatoformi.

V. ANSIA E ANGOSCIA (II, 104); ANSIA E ANGOSCIA** (*414-420); PANICO, ATTACCO DI* (*5685).

Generalità sulla nosografia delle nevrosi

Secondo il DSM-III-R e il DSM-IV la nosologia delle n. si differenzia, per taluni aspetti, dall'inquadramento classico di impronta in parte psicoanalitica. Una visualizzazione in tal senso è offerta dalla tab. I.

Terapia farmacologica

Si basa essenzialmente sull'impiego di prodotti ansiolitici e di antidepressivi serotoninergici.

Nei *disturbi di panico* e nell'*agorafobia* i farmaci di prima istanza sono gli antidepressivi triciclici (in particolare clomipramina e imipramina). Nel caso non si rendessero efficaci la seconda scelta cadrà su un inibitore delle monoaminoxidasi (IMAO), su un antidepressivo inibitore della ricaptazione della serotonina (ISRS) o su una benzodiazepina (per le benzodiazepine [v.*] vale sempre il problema legato alla dipendenza e all'abuso nel caso di impiego continuativo di queste sostanze). I triciclici si somministrano a dosi di partenza di 10 mg/die, aumentandoli poi di altri 10 mg ogni 2-3 giorni (o di 25 mg se risultano ben tollerati). I dosaggi da raggiungere sono quelli pieni (150-200 mg/die in media) e il tempo necessario per evidenziare l'efficacia varia dalle 8 alle 12 settimane. Il ricorso agli IMAO, la benzodiazepina ma bisogna ricordare che al momento non rimane che un solo IMAO disponibile in commercio

TAB. I. INQUADRAMENTO NOSOGRAFICO DELLE NEVROSI

Classico	DSM-III-R (1987)	DSM-IV (1994)
Nevrosi d'ansia Nevrosi nevrastenica Nevrosi fobica	Disturbo da ansia generalizzata Disturbo da attacchi di panico con o senza agorafobia Fobia sociale Fobia semplice	Disturbo da ansia generalizzata Disturbo da attacchi di panico con o senza agorafobia Agorafobia Fobia sociale Fobia specifica
Nevrosi isterica Nevrosi ipocondriaca	Dismorfofobia Disturbo di conversione Ipocondria Disturbo di somatizzazione Disturbo da dolore somatoforme Disturbo somatoforme indifferenziato Disturbo da personalità multipla Fuga psicogena Amnesia psicogena Disturbo di depersonalizzazione	Disturbo da dismorfismo corporeo Disturbo di conversione Ipocondria Disturbo di somatizzazione Disturbo da dolore Disturbo somatoforme indifferenziato Disturbo dissociativo dell'identità Fuga dissociativa Amnesia dissociativa Disturbo di depersonalizzazione
Nevrosi ossessiva	Disturbo ossessivo-compulsivo	Disturbo ossessivo-compulsivo
Nevrosi di carattere	Disturbi di personalità	Disturbi di personalità
Nevrosi depressiva	Distimia	Disturbo distimico
Nevrosi posttraumatiche	Disturbo post-traumatico da stress	Disturbo post-traumatico da stress Disturbo da stress acuto
Nevrosi d'organo	Fattori psichici che incidono sulla condizione fisica	Fattori psicologici che incidono sulla condizione medica

è la tranilcipromina associata alla trifluoperazina, una fenotiazina, che non lo rende utilizzabile quindi in questi disturbi.

Tra gli ISRS il più impiegato è la fluoxetina (v.**). La dose iniziale è di 2-4 mg/die da aumentare di altri 2-4 mg ogni 2-4 giorni sino a giungere ad almeno 20 mg/die.

La benzodiazepina più utilizzata è l'alprazolam (quantitativo di partenza 0,5 mg quattro volte al dì fino a raggiungere in alcuni giorni i 4-6 mg). La durata complessiva della terapia è mediamente compresa tra 8 e 12 mesi.

Nella *fobia sociale* il trattamento psicofarmacologico si avvale degli IMAO o, in seconda istanza, di benzodiazepine (alprazolam o clonazepam); nelle situazioni che implicano prestazioni di fronte al pubblico (la cosiddetta «paura del palcoscenico») utili i beta-bloccanti come il propranololo (20-40 mg) o l'atenololo (50-100 mg). I dosaggi sono equiparabili a quelli cui si ricorre nel disturbo di panico (v. sopra); per il clonazepam il quantitativo giornaliero è di 1,5-4 mg.

Nel *disturbo ossessivo-compulsivo* farmaco di prima scelta è la clomipramina (inizialmente 25-50 mg al momento di andare a letto, incrementati di altri 25 mg ogni 2-3 giorni fino a raggiungere i 250 mg/die). La fluoxetina si può usare

in alternativa al tricyclico con le modalità già esposte ma con dosaggi finali più elevati (80 mg/die).

Il *disturbo post-traumatico da stress* si avvale dei tricyclici imipramina e amitriptilina. Il trattamento dura attorno alle 8 settimane; la dose di farmaco è pressoché analoga a quella riportata in precedenza sia per l'imipramina che per l'amitriptilina. Se non si ottengono risultati positivi si può utilizzare un IMAO, un ISRS o uno stabilizzatore dell'umore (carbamazepina 400-600 mg/die in media in 2 somministrazioni giornaliere, ac. valproico 250-750 mg/die in media in 3 frazioni quotidiane).

Nel *disturbo da ansia generalizzata* sono da impiegarsi innanzitutto le benzodiazepine o il buspirone. Per le benzodiazepine si consigliano quelle a emivita intermedia (ad es. lorazepam, oxazepam, alprazolam) iniziando con dosi minime da elevarsi, se necessario, fino a raggiungere quelle più alte (ad es. 2 mg/die di lorazepam in 2 somministrazioni nell'arco delle 24 ore, aumentabili fino a 7.5-10 mg/die in media). Il buspirone si usa in quantitativi di 15-60 mg/die divisi in 3 somministrazioni; gli effetti del farmaco richiedono 1-2 settimane per manifestarsi con un massimo di efficacia a distanza di 4-6 settimane.

Nel *disturbo di conversione* qualche risultato utile può raggiungersi con farmaci ansiolitici; in quello da *dismorfismo corporeo* è provata l'efficacia nel ridurre i sintomi (50% dei casi trattati) degli ISRS.

Nel *disturbo da dolore* si possono impiegare i tricyclici (es. amitriptilina, imipramina e doxepina).

Bibliografia

- AA. VV., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV)*, 1994, American Psychiatric Association, Washington.
 AA. VV., *Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali (DSM-III-R)*, 1988, Masson Italia, Milano (tr. it.).
 AA. VV., *Anxiety Disorders*, in Kaplan H. I., Sadock B. J., Grebb J. A. eds., *Synopsis of Psychiatry*, 1994, Williams & Wilkins, Baltimore.
 Arana G. W., Hyman S. E., *Handbook of Psychiatric Drug Therapy*, 1991, Little, Brown & Co., Boston.
 Giberti F., Rossi R., *Il problema delle nevrosi*, in AA. VV. eds., *Trattato Italiano di Psichiatria*, 1992, Masson Italia, Milano.

MAURIZIO RUCCA

NIEMANN-PICK, MALATTIA DI [v. vol. X, coll. 1175-1179]

SOMMARIO

Introduzione (col. 4053). - **Cenni storici** (col. 4053). - **Genetica** (col. 4054). - **Sintomatologia** (col. 4054). - **Istopatologia** (col. 4055). - **Diagnosi** (col. 4055). - **Terapia** (col. 4055).

Introduzione

La malattia di Niemann-Pick [m. di N.-P.] tipo A e quella tipo B sono caratterizzate da un accumulo lisosomale di sfingomielina conseguente a difettosa attività della sfingomielinasi acida. La m. di N.-P. tipo C, sebbene conservi un eponimo analogo a quello del tipo A e B, è causata da un errore metabolico di base differente, con accumulo lisosomale soprattutto di colesterolo non esterificato. Sinonimi della m. di N.-P. tipo C sono: malattia da accumulo neuroviscerale con oftalmoplegia sopranucleare verticale; m. di N.-P. giovanile con istiociti blu mare; lipidosi oftalmoplegica.

Cenni storici

Nel 1914 A. Niemann, pediatra tedesco, pubblicava il caso di una bambina con imponente epatosplenomegalia associata a rapida progressiva compromissione neurologica. Nel 1927 L. Pick riportava il quadro anatomico-patologico e quello particolareggiato delle

cellule da accumulo tipiche della malattia. Nel 1934 E. Klenk rendeva noto che la sostanza accumulata era della sfingomielina, accumulo causato, come ebbero a dimostrare nel 1966 R. Brady e coll., dal difetto della sfingomielinasi acida, enzima lisosomale che idrolizza la sfingomielina in ceramide e fosforilcolina.

L'eterogeneità clinica della m. di N.-P. venne rilevata da A. C. Crocker e S. Faber nel 1958 in seguito all'osservazione di una prima serie di 18 pazienti, ma è solamente all'inizio degli anni '70 che si arrivò ad una distinzione tra i pazienti nei quali si ha accumulo di sfingomielina per il deficit di sfingomielinasi e quelli nei quali la sfingomielinasi è normale e si ha soprattutto accumulo di colesterolo non esterificato.

Genetica

La malattia *tipo A* e quella *tipo B* sono ad ereditarietà autosomica recessiva e, sebbene siano panetniche, si osservano con maggior frequenza negli ebrei Ashkenaziti. L'incidenza della malattia di tipo A è di 1 su 40.000 e quella di tipo B di 1 su 80.000. Da notare che per individuare i portatori sani della malattia il dosaggio enzimatico è inaffidabile. È indispensabile la individuazione della mutazione mediante analisi molecolare.

Il gene della sfingomielinasi residua acida è stato mappato nella regione cromosomica 11p15.1 - p15.4 ed è stato sequenziato. Sono state identificate oltre dodici mutazioni della sfingomielinasi acida causa della m. di N.-P. tipo A e B. Tre mutazioni R496L, L302P, e fs P330 sono responsabili di circa il 92 per cento delle mutazioni dei pazienti ebrei Ashkenaziti tipo A e una singola mutazione DR608 è responsabile di circa il 50 per cento dei pazienti ebrei Ashkenaziti tipo B. La stessa mutazione è stata riscontrata nei pazienti di tipo B del Nord Africa.

La m. di N.-P. *tipo C* è a distribuzione panetnica. Due geni NPC1 e NPC2 possono causare la *tipo C*. Le mutazioni del NPC1, mappato sul cromosoma 18q11, incidono per il 95% dei casi.

Sintomatologia

I pazienti affetti dal *tipo A* presentano epatosplenomegalia, vomito e/o diarrea, mancato accrescimento staturale-ponderale. Sono emaciati, anemici, a volte itterici con addome sempre più voluminoso per il progressivo aumento di volume degli organi ipocondriali, con estremità gracili. Sono dispnoici sia per la presenza in alcuni pazienti di un'infiltrazione polmonare a carattere miliariforme, sia per l'epato-splenomegalia. A questa sintomatologia si associa una grave e progressiva compromissione neurologica, con alterazione della velocità della conduzione nervosa e, in circa il 50 per cento dei casi, una macchia di colore rosso ciliegia evidenziabile nella regione maculare del fondo oculare. L'evoluzione è rapida e la morte avviene tra i 14 ed i 30 mesi.

I pazienti affetti dal *tipo B* presentano una cospicua epatosplenomegalia. I segni di ipersplenismo non sono così frequenti ed intensi come nella malattia di Gaucher (v. GAUCHER, MALATTIA DI, VI, 2270; **2375-2378); pressoché costante è una diffusa infiltrazione reticolo-nodulare polmonare. Molti pazienti presentano un ritardato accrescimento staturale-ponderale e un ritardo dello sviluppo puberale. Nella maggioranza dei pazienti è presente una iperlipidemia tipo II B (v. IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE, VIII, 71-76; *3954-3965; **2862-2870), associata a volte a xantomi nodulari. È assente o molto lieve l'interessamento neurologico; i pazienti sopravvivono nell'età adulta.

La forma *tipo C* presenta nella forma infantile uno spettro di sintomi clinici molto vari quali, l'ittero neonatale con manifestazioni colostatiche, epatosplenomegalia, demenza e atteggiamento posturale distonico.

I sintomi iniziali nei pazienti adulti possono essere limitati al comportamento psicotico con splenomegalia. Viene considerata patognomica la presenza di una oftalmoplegia verticale sopranucleare. L'evoluzione è variabile, l'*exitus* può succedere in epoca neonatale o entro i 16-20 anni.

Istopatologia

Grandi istiociti del diametro di 20-90 micron, con uno o più nuclei e con un citoplasma ripieno di goccioline birifrangenti alla luce polarizzata e sudanofile, con aspetto a nido d'ape sono presenti nel midollo osseo, fegato, milza, linfonodi, nella midollare surrenale, negli alveoli polmonari e in altri tessuti nei pazienti affetti da m. di N.-P. tipo A e B. All'esame ultrastrutturale sono presenti, nel citoplasma di queste cellule istocitarie, inclusioni lipidiche sia lamellari che dense corrispondenti a lisosomi sovraccarichi di sfingomielina; nei macrofagi sono accumulati anche altri lipidi.

Le cellule d'accumulo presenti nel midollo osseo della m. di N.-P. tipo C presentano, contrariamente a quanto descritto per la A e la B, dei vacuoli irregolari non ben definiti, PAS positivi, non birifrangenti e non sudanofili. Grovigli neurofibrillari si trovano, all'esame neuropatologico *post mortem*, in molte parti dell'encefalo: in quantità consistente nell'ippocampo, ipotalamo, sostanza innominata, *neocortex*, gangli basali e talamo.

Questi grovigli sono argirofili e fluorescenti alla luce ultravioletta quando vengono trattati con trioflavinas; essi si presentano alla microscopia elettronica come dei filamenti elicoidali identici a quelli presenti nella malattia di Alzheimer (v. ALZHEIMER, MALATTIA DI, I, 1365-1371; *245-254; **245-252).

Diagnosi

Si conoscono due distinte sfingomielinasi, una acida lisosomale ed una neutra localizzata nei foglietti esteriori della membrana plasmatica.

I due tipi di m. di N.-P. A e B presentano una fortissima riduzione dell'attività dell'enzima lisosomale sfingomielinasi acida; ma mentre le cellule della forma neuronopatica tipo A presentano circa uno 0,15% dell'attività della sfingomielinasi residua, le cellule dei pazienti affetti dalla forma viscerale tipo B presentano circa un 4% dell'attività della sfingomielinasi residua.

La diagnosi dei due tipi A e B della m. di N.-P. può essere effettuata mediante dosaggio enzimatico nei globuli bianchi dei pazienti. La diagnosi degli eterozigoti è possibile mediante analisi molecolare.

La diagnosi del tipo C può essere effettuata in base alla presenza di colesterolo esterificato nei fibroblasti in coltura dei pazienti e mediante analisi molecolare.

La *diagnosi prenatale* può essere effettuata nelle gravidanze a rischio per le forme di tipo A e B sia mediante dosaggio enzimatico che mediante analisi molecolari, e per il tipo C negli amniociti utilizzando le specifiche analisi molecolari.

Terapia

Al momento non esistono trattamenti specifici. Trapianti di fegato e di cellule amniotiche in vari pazienti affetti dalla forma di tipo B non hanno avuto successo.

Il successo ottenuto nella malattia di Gaucher (v. VI, 2270, GAUCHER, MALATTIA DI**) mediante terapia con enzima modificato nella catena oligosaccaridica dell'enzima stesso fa ritenere che questa tecnica possa essere utilizzabile anche per la catena oligosaccaridica nelle sfingomielinasi. La terapia enzimatica sostituitiva in malattie da accumulo lisosomali selezionate è attualmente un'area di intense ricerche, ma non ha per ora possibilità di applicazione pratica.

V. anche: LISOSOMALI MALATTIE, VIII, 2255; *4700; SFINGOLIPIDOSI, XIV, 128.

Bibliografia

- Graber D., Salvayre R., Levade T., *J. Neurochem.*, 1994, **63**, 1060-1065.
 Love S., Bridges L. R., Case C. P., *Brain*, 1995, **118**, 119-129.
 Schuchman E. H., Desnick R. J., *Niemann-Pick disease types A and B: Acid sphingomyelinase deficiencies*, in Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7 ed., 1995, vol. III, McGraw-Hill, New York, pp. 2601-2622.
 Vanier M. T., Rodriguez-Lafrasse C., Roussan R. et al., *Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity (Review)*, *Dev. Neurosci.*, 1991, **13**, 307-314.

PAOLO DURAND

NITRICO OSSIDO (NO): V. MONOSSIDO D'AZOTO**.

NOONAN, SINDROME DI

La *sindrome di Noonan* [s. di N.] è un'affezione genica, autosomica dominante a espressività variabile, caratterizzata da bassa statura, ipertelorismo e *facies* peculiare, collo corto con pterigio, deformità della gabbia toracica (fig. 1), cardiopatia congenita e, occasionalmente, ritardo mentale lieve (Gorlin et al., 1990). Descritta da Noonan e Ehmke nel 1963, di fatto era stata osservata per la prima volta nella seconda metà del secolo scorso (Kobylinski, 1883). La sua frequenza è stata calcolata in 1 su 1000-5000 (Allanson, 1987).



Fig. 1. Paziente con ipertelorismo oculare, padiglioni auricolari ad attaccatura bassa, collo corto con pterigio, torace escavato.

Sebbene venga considerata di solito sporadica, oggi si ritiene che un'attenta valutazione clinica dei genitori dei pazienti dimostri la trasmissione familiare in circa la metà dei casi. Sono noti alcuni pazienti con le caratteristiche facciali della s. di N. che presentavano anomalie cromosomiche diverse. L'assenza del fenotipo completo della sindrome ha escluso che queste anomalie fossero utili a localizzare il gene-malattia. Tuttavia, l'associazione tra la delezione 22q11, la sindrome di DiGeorge e di Noonan ha suggerito l'esistenza di un possibile *locus* per questa affezione nella regione (Wilson *et al.*, 1993). Questa osservazione ha avuto sinora una sola conferma. Recentemente, le analisi di *linkage* hanno dimostrato in alcune famiglie la cosegregazione del gene-malattia con i marcatori della regione 12q22-qter e hanno localizzato un gene per la s. di N. in quella regione (Jamieson *et al.*, 1994). Lo stesso studio ha anche dimostrato l'eterogeneità genetica della sindrome. Un'altra regione cromosomica «candidata» in base alle evidenze cliniche, in particolare la consistente associazione tra la s. di N. e la neurofibromatosi di tipo 1 il cui gene è stato clonato dalla regione 17q, è stata esclusa dalle analisi di *linkage* (Sharland *et al.*, 1992a).

Il quadro clinico è fortemente evocativo della sindrome. Il peso neonatale è di solito normale (40%), ma può risultare aumentato per la presenza di edemi. La lunghezza media è di 47 cm. Nella prima infanzia la statura si colloca attorno al 3° percentile, ma la velocità di crescita è normale. La statura nell'età adulta è mediamente di 162,5 cm nei maschi e 152,7 cm nelle femmine. L'età ossea è ritardata in circa 1/5 dei pazienti, mentre i valori ormonali sono normali.

Le stigmate facciali tendono a modificarsi con l'età. Nel periodo neonatale è presente ipertelorismo oculare, con rime palpebrali oblique in basso e verso l'esterno, filtro prominente (95% dei casi), palato ogivale (45%), micrognazia (25%), padiglioni auricolari a bassa attaccatura, retrorotati, con elice ispessita (90%), cute retronucleare abbondante, bassa attaccatura dei capelli sulla nuca. Con il tempo la testa assume un aspetto turricefalico, con ipertelorismo, prominenza dei globi oculari, infossamento della radice del naso, che mostra una base larga e una punta globosa. Successivamente la *facies* può assumere un aspetto grossolano o miopatico. La prominenza degli occhi si riduce nell'adolescenza e la radice del naso diventa sottile e prominente. Il collo appare più lungo e si accentua lo pterigio o la prominenza del trapezio (90%). Negli adulti sono accentuate le pieghe nasolabiali e l'attaccatura dei capelli sulla fronte è arretrata.

Il torace appare carenato nella parte superiore e infossato in quella inferiore in circa 2/3 dei pazienti. I capezzoli sono bassi e lateralizzati. Le spalle sono arrotondate e il cubito valgo (50%). Sono comuni la clinobrachidattilia del 5° dito e le alterazioni radiografiche dello sterno e della colonna vertebrale. In circa 2/3 dei pazienti sono presenti cardiopatie congenite, in particolare stenosi della polmonare (50%), difetto del setto atriale (10%), ipertrofia asimmetrica del setto, difetti del setto interventricolare (5%) e pervietà del dotto arterioso (3%). Le alterazioni elettrocardiografiche sono comuni, soprattutto la deviazione dell'asse destro.

Nei maschi lo sviluppo puberale, la virilizzazione e la fertilità possono essere normali o alterati. In circa il 60% dei pazienti sono presenti criptorchidismo ed anomalie secondarie della spermatogenesi. La fertilità è di solito conservata nelle femmine e la loro pubertà può essere normale o ritardata.

La cute mostra nevi pigmentati in circa 1/4 dei casi e macchie caffè latte nel 10%. L'ipoplasia o l'aplasia dei vasi linfatici può causare linfedema generalizzato o periferico, linfangectasie intestinali, igroma cistico ed idrope fetale.

Circa 1/4 dei pazienti, soprattutto maschi, presentano ritardo psicomotorio e del linguaggio. In alcuni casi questo ritardo può essere secondario a ipoacusia, in particolare di tipo neurosensoriale.

Il 20% dei pazienti mostra difetti della coagulazione, ad esempio deficit del fattore XI, malattia di von Willebrand e disfunzioni piastriniche. La notevole eterogeneità dei difetti coagulativi fa ritenere che nei pazienti siano alterati fattori di regolazione che controllano il sistema intrinseco (Sharland *et al.*, 1992b). L'associazione con l'ipertermia maligna, nota anche come *sindrome di King*, è una complicazione che non deve comunque fare considerare nosologicamente distinti questi pazienti.

Varie ipotesi hanno tentato di chiarire la patogenesi della s. di N. Sanchez-Cascos (1983) ha ritenuto che le anomalie della testa, del collo e del cuore presenti nei pazienti siano secondarie a difetti degli archi branchiali. L'ostruzione linfatica potrebbe ridurre il flusso cardiaco destro e causare la stenosi della polmonare (Clark, 1984). È possibile tuttavia che parte dei difetti presenti nella sindrome siano secondari al linfedema. L'igroma cistico nucale prenatale, che causa lo pterigio del collo e le anomalie nella migrazione tessutale, potrebbe spiegare l'ipertelorismo, le anomalie di orientamento delle rime palpebrali, il basso impianto delle orecchie, la prominenza del trapezio, la teleelia ed il criptorchidismo (Gorlin *et al.*, 1990).

La diagnosi differenziale si pone con la sindrome di Turner, che comunque è sempre associata ad anomalie cromosomiche (soprattutto la monosomia X), e con la sindrome LEOPARD (sindrome autosomica dominante caratterizzata da lentiggini generalizzate, ipertelorismo oculare, ritardo di crescita, sordità, cardiopatie etc.) L'associazione tra la s. di N. e la neurofibromatosi di tipo 1, o sindrome di Watson, è ancora un problema nosologicamente non risolto (Mendez e Opitz, 1985). La sindrome cardio-facio-cutanea (CFC) (Reynolds *et al.*, 1987), caratterizzata da ritardo mentale e staturale, anomalie cardiache, aspetto della *facies* evocatore della s. di N., alterazioni della cute e dei capelli, è di fatto un'espressione della s. di N., come dimostra la ricorrenza familiare di casi di s. di N. classica e di casi con sindrome CFC (Legius *et al.*, 1998).

Bibliografia

- Allanson J. E., *J. Med. Genet.*, 1987, **24**, 9.
Gorlin R. J., *et al.*, *Syndromes of the Head and Neck*, 3 ed., 1990, Oxford University Press, New York, p. 803.
Kobylinski O., *Arch. Anthropol.*, 1883, **14**, 342.
Jamieson C. R., *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8**, 357.
Legius E., *et al.*, *Europ. J. Human Genet.*, 1998, **6**, 32.
Mendez H. M. M., Opitz G. M., *Am. J. Med. Genet.*, 1985, **21**, 493.
Noonan J. A., Ehmeke, *J. Pediatr.*, 1963, **63**, 468.
Reynolds J. F., *et al.*, *Proc. Greenwood Genet. Ctr.*, 1987, **6**, 171.
Sanchez-Cascos A., *Eur. Heart J.*, 1983, **4**, 223.
Sharland M., *et al.*, *J. Med. Genet.*, 1992a, **29**, 188.
Sharland M., *et al.*, *Lancet*, 1992b, **339**, 19.
Wilson D. I., *Arch. Dis. Child.*, 1993, **68**, 187.

BRUNO DALLAPICTOLA

NORRIE, MALATTIA DI

La *malattia di Norrie* [m. di N.], nota anche come displasia congenita progressiva oculo-acustica-cerebrale, è stata inizialmente descritta nel 1927 da Gordon Norrie in alcuni pazienti che presentavano atrofia congenita oculare a trasmissione familiare legata all'X. In realtà, solo nel 1961 è stata riconosciuta come entità clinica nosologicamente distinta, caratterizzata da pseudotumori bilaterali della retina, sordità e ritardo mentale. A questi successivamente si associano il microftalmo, l'opacità corneale, la cataratta e la ftisi del bulbo. L'esame istologico rivela la presenza di masse necrotiche emorragiche nella camera posteriore, di

tessuto gliale indifferenziato nel vitreo, di calcificazioni della membrana di Bowman e di iride interamente atrofica.

La diagnosi differenziale si pone soprattutto con il retinoblastoma bilaterale, per le caratteristiche morfologiche e cliniche, ma se ne differenzia per la modalità di trasmissione che è autosomica dominante nel retinoblastoma (v.*; v.***) e legata al cromosoma X nella m. di N. Questa, pur essendo una patologia rara (1/100.000 maschi), è stata estensivamente studiata per la sua gravità e complessità fenotipica. La cecità è presente alla nascita, occasionalmente associata a ritardo dello sviluppo e microcefalia.

La complessità fenotipica ha suggerito il coinvolgimento di più geni della regione e ha fatto ipotizzare che la m. di N. fosse una sindrome da geni contigui. Infatti, gli studi di genetica formale e le analisi molecolari hanno mappato il locus Norrie sul braccio corto del cromosoma X (Xp11.3-p11.2) in stretta vicinanza con i geni codificanti le monoaminossidasi A e B (MAOA e MAOB). Sebbene questi geni siano distinti dal locus Norrie, sono stati descritti alcuni pazienti con la malattia e disturbi neurologici del comportamento, da deficit delle monoaminossidasi. Le analisi molecolari in questi pazienti hanno dimostrato la presenza di delezioni che coinvolgevano oltre al locus Norrie anche i geni delle MAO.

Il gene ND è stato isolato nel 1992, mediante lo screening di genoteche preparate da retina e da cervello fetale. Il gene si estende per una regione di 50 kb ed è fisicamente concatenato ai loci MAOB e MAOA. È composto da tre esoni che codificano per una proteina di 133 aminoacidi che possiede caratteristiche proprie della famiglia delle mucine. La sua struttura terziaria e probabilmente le sue funzioni sono simili a quelle del fattore di crescita TGFβ. La patogenesi della malattia sarebbe quindi direttamente correlata con la perdita di attività di questo fattore durante l'organizzazione e il mantenimento neuronico della retina e del sistema nervoso centrale. Il gene è infatti espresso nella retina, nella corioide e nel cervello.

Il 70% dei pazienti presenta mutazioni puntiformi in questo gene, mentre negli altri si evidenziano delezioni più o meno estese, coinvolgenti anche i loci MAOB e MAOA. Mutazioni del gene sono state descritte anche in altre patologie, ritenute inizialmente entità cliniche differenti, come la vitreoretinopatia essudativa (XFEVR), la persistenza primaria di vitreo iperplastico (PHPV), la retinopatia da prematurità, alcune forme di retinoblastoma e la displasia retinica primaria legata all'X che vengono perciò considerate oggi manifestazioni alleliche dello stesso gene. Il clonaggio del gene ha reso possibile la diagnosi molecolare della malattia con elevata sensibilità ed accuratezza e ha fornito la base biochimica per comprendere processi patologici della degenerazione retinica.

Bibliografia

Anderson S. R., Warburg M., *Arch. Ophthalmol.*, 1961, **66**, 6114-6118.
Chen Z. Y., et al., *Nature Genetics*, 1992, **1**, 204-208.
Meitinger T., et al., *Nature Genetics*, 1993, **5**, 376-380.
Chen Z. Y., et al., *Nature Genetics*, 1993, **5**, 180-183.
Chen Z. Y., *Hum Molec. Genet.*, 1995, **4**, 1729-1737.

GIUSEPPE NOVELLI

NUCLEARE MEDICINA [v. vol. X, coll. 1241-1250]

MEDICINA NUCLEARE CEREBRALE

SOMMARIO

Introduzione: la PET e la SPET (col. 4060). - **Ischemia cerebrale** (col. 4061). - **Processi di recupero della funzione** (col. 4062). - **Demenze** (col. 4064). - **Epilessia** (col. 4065). - **Tumori** (col. 4066).

Introduzione: la PET e la SPET

Gli anni '80 sono stati caratterizzati dall'avvento di tecniche tomografiche, che hanno favorevolmente influenzato anche le potenzialità di studiare con la medicina nucleare il cervello, sostituendo i metodi di indagine bidimensionali fino ad allora impiegati.

Le tecniche tomografiche basate sull'uso di traccianti radioattivi, indicate come «tomografia da emissione», consentono lo studio di parametri fisiologici e le loro modificazioni in patologia, nel cervello umano, *in vivo*, a livello regionale ed in maniera non-invasiva.

La distinzione tra la tomografia a emissione di positroni (v.; PET: *Positron Emission Tomography*) e la tomografia a emissione di fotoni singoli (v.; v.*; SPET: *Single Photon Emission Tomography*) si basa principalmente sul tipo di tracciante radioattivo utilizzato e sulle caratteristiche del sistema di rivelazione. Il sistema di ricostruzione delle immagini tomografiche è sovrapponibile nelle due tecniche e si basa in entrambi i casi su complessi algoritmi matematici di retroproiezione a partire da molteplici proiezioni laterali ottenute ad angolazione differente.

Il tipo di isotopi diversi utilizzati caratterizza l'informazione che si può ottenere con le due tecniche. Se da una parte l'uso di isotopi di costituenti naturali della materia vivente, positrono-emittenti, quali l'ossigeno-15, il carbonio-11, l'azoto-13 e il fluoro-18, permette lo studio di molteplici parametri fisiologici con la PET, dato che un gran numero di molecole può essere così marcato, dall'altra parte ne limita l'uso a un numero ristretto di centri, a causa della necessità di un ciclotrone nelle immediate vicinanze. Tali isotopi devono infatti essere prodotti *in loco*, a causa della brevissima emivita. Per più ampie informazioni sulla PET, si rinvia alla voce TOMOGRAFIA A EMISSIONE DI POSITRONI (XIV, coll. 2401-2413).

I costi e le esigenze di personale altamente qualificato per la complessità delle attrezzature sono invece nettamente ridotti nei centri che utilizzano la SPET, che hanno, per questo motivo logistico-economico, trovato una più larga diffusione nella pratica clinica.

In questa voce verranno quindi trattate prevalentemente le applicazioni della SPET in neurologia, che sono molteplici e comprendono patologie diverse, dalle malattie cerebro-vascolari alle demenze, dalle epilessie ai tumori cerebrali.

Da un punto di vista metodologico, le immagini SPET possono essere ottenute con apparecchiature diverse, le più diffuse delle quali sono le gamma-camere rotanti a singola testa, che producono immagini con risoluzione spaziale variabile tra i 14 e i 17 mm. Esistono sistemi di rivelazione più complessi, che offrono una migliore risoluzione spaziale delle immagini (dai 7 ai 10 mm) e un tempo minore della durata dell'esame, come le gamma-camere a 3 teste e i sistemi dedicati costituiti da detettori disposti ad anello.

Le applicazioni della SPET sono chiaramente legate al tipo di tracciante utilizzato e, di conseguenza alle immagini fornite, atte a valutare le modificazioni fisiopatologiche, in termini di flusso ematico (CBF: *Cerebral Blood Flow*), volume ematico (CBV: *Cerebral Blood Volume*), densità recettoriale, o attività metabolica-replicativa del tessuto cerebrale. Al contrario, le tecniche di neuroradiologia, come la tomografia a trasmissione (TC) e la risonanza magnetica (RMN), documentano principalmente le modificazioni strutturali. Se queste ultime tecniche hanno un maggior impatto clinico, in termini soprattutto diagnostici, la SPET è soprattutto un mezzo utile per valutare quelle modificazioni funzionali che si verificano in regioni di tessuto morfologica-

mente normale e che sono comunque alla base di un'espressione sintomatologica.

Gli studi di CBF possono essere ottenuti sia con molecole marcate con il tecnezio-99m (^{99m}Tc HM-PAO e ^{99m}Tc ECD), che con lo ^{133}Xe : nel primo caso, il vantaggio è rappresentato, soprattutto se si utilizzano tomografi «dedicati», dall'ottima definizione delle immagini, che rende possibile un miglior riconoscimento delle diverse strutture cerebrali; nel secondo caso, il vantaggio è dato soprattutto dalla quantificazione del CBF in termini assoluti.

Gli studi di volume ematico possono essere ottenuti marcando le emazie autologhe con ^{99m}Tc . È possibile procedere alla quantificazione del CBF (mediante ^{133}Xe) e del CBV in un'unica seduta d'esame (Sabatini *et al.*, 1991a), ottenendo informazioni utili sulla riserva di perfusione.

Un altro metodo per studiare la riserva di perfusione con la SPET, per capire quindi se una situazione di oligoemia sia ancora in qualche modo compensata dai meccanismi di autoregolazione cerebrale, si basa sullo studio delle variazioni del CBF indotte da un vasodilatatore, quale per esempio l'acetazolamide (Vorstrup *et al.*, 1986; Di Piero *et al.*, 1989).

Varie molecole marcate con ^{123}I , tra cui la più utilizzata è la iodobenzamide, sono state utilizzate per lo studio del versante post-sinaptico dopaminergico (Schwartz *et al.*, 1993).

Un interesse prevalentemente clinico è offerto dagli studi con ^{201}Tl per il riconoscimento, nel contesto del tessuto cerebrale, di tessuto neoplastico, ad elevata attività metabolico-riproduttiva.

Non esiste al momento attuale un radiotracciante in grado di valutare il consumo metabolico cerebrale, a differenza della PET, con la quale possono essere studiati sia il consumo in ossigeno che quello di glicoso nelle varie aree cerebrali.

Comunque, in tutte le condizioni in cui l'autoregolazione è conservata, lo studio del CBF rappresenta un ottimo indice della funzionalità cerebrale a livello regionale, dal momento che i valori di CBF dipendono strettamente dalle esigenze metaboliche tessutali, a loro volta espressione del grado di attività neuronale (Raichle *et al.*, 1976; Lenzi *et al.*, 1981).

Ischemia cerebrale

La stretta dipendenza tra CBF e metabolismo è perduta in condizioni di ischemia, dove lo studio contemporaneo di CBF, consumo di ossigeno, estrazione di ossigeno e volume ematico con la PET ha chiaramente documentato il «disaccoppiamento» tra questi parametri. Se il consumo di ossigeno è l'indice più fedele della vitalità neuronale, l'estrazione di ossigeno e il volume ematico documentano i tentativi di compenso del tessuto cerebrale all'ischemia stessa. Il CBF può comunque rivestire un certo interesse, soprattutto nelle prime ore dopo l'ictus, quando un danno irreversibile del tessuto non si è ancora verificato, in quanto documenta l'entità della riduzione dell'apporto ematico, legata il più delle volte ad occlusione embolica di arterie cerebrali del distretto intracranico.

L'entità della riduzione di CBF nella fase acuta dell'ictus ha un significato prognostico, in termini di recupero funzionale, come documentato da Giubilei *et al.* (1990) in uno studio su 32 pazienti valutati nelle prime 6 ore dall'evento ischemico.

Inoltre, la SPET trova una sua validità clinica nella valutazione degli effetti sul CBF di terapie, ad es. con fibrinolitico, nelle prime ore dell'ictus (Lenzi *et al.*, 1992). L'uso dell'HM-PAO o dell'ECD, infatti, consente di effettuare la scansione fino a due ore dopo l'iniezione del tracciante, senza quindi determinare ritardi nell'inizio del trattamento, mentre il metodo della *split-dose* (Pantano *et al.*, 1992) per-

mette di eseguire due scansioni (prima e dopo terapia) con un intervallo di un'ora o anche meno.

Un recente studio (Baird *et al.*, 1993) su 22 pazienti trattati con streptochinasi, e studiati con la SPET prima della terapia e 24 ore più tardi, ha evidenziato, comunque, che la ri-perfusione ottenuta farmacologicamente, sebbene più evidente, non differisce significativamente come frequenza rispetto a quella che si manifesta in pazienti non trattati. La ri-perfusione precoce, sia dopo terapia che spontanea, sembra avere un significato prognostico favorevole sia in termini di mortalità che di invalidità, ma questi dati dovranno essere confermati su casistiche più ampie.

Processi di recupero della funzione

Di recente l'interesse si è focalizzato sulla possibilità di studiare con la SPET la risposta di aree cerebrali a stimoli diversi e i meccanismi di recupero funzionale, spontaneo o indotto da terapia, dopo un danno tessutale.

Queste nuove prospettive di applicazione della SPET sono conseguenti alla migliore conoscenza dei rapporti tra flusso ematico e metabolismo cerebrale in condizioni fisiologiche, e alla possibilità di indurre, mediante specifiche stimolazioni, un aumento dell'attività funzionale e, quindi, metabolica, di aree cerebrali implicate nello svolgimento di una determinata funzione. Gli studi di flusso con SPET eseguiti mentre il soggetto è sottoposto a uno stimolo particolare vengono definiti di «attivazione cerebrale», e la loro applicazione permette lo studio delle aree cerebrali implicate nell'esecuzione di un determinato compito, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

In base al tipo di stimolo utilizzato possiamo distinguere vari tipi di attivazione: *attivazioni motorie*, in cui lo stimolo è rappresentato da un compito motorio; *attivazioni sensoriali*, in cui lo stimolo può essere uditivo, visivo o sensitivo; *attivazioni cognitive*, caratterizzate da compiti di lettura, di produzione verbale, di calcolo, di memorizzazione etc.; *attivazioni farmacologiche*, che studiano l'effetto di un farmaco sulla circolazione cerebrale o l'effetto di questo su attività specifiche di aree cerebrali.

Gli studi di attivazione in soggetti normali, eseguiti soprattutto con la PET, uniti ai progressi della neuropsicologia cognitiva, rappresentano lo strumento per comprendere come il cervello lavora in condizioni fisiologiche (Phelps *et al.*, 1982; Roland *et al.*, 1980; Fox *et al.*, 1985; Posner, 1993). D'altra parte, lo studio dei meccanismi di recupero spontaneo di una funzione precedentemente deficitaria mediante studi di attivazione, seppure non trovano una immediata applicazione clinica, rivestono un interesse particolare in campo neurologico per la possibilità che offrono di individuare situazioni su cui è possibile intervenire con una terapia sia riabilitativa che farmacologica. Per quanto concerne il recupero della funzione motoria, sebbene gli studi PET permettano una più sofisticata elaborazione ed analisi dell'immagine (Chollet *et al.*, 1991), informazioni valide possono essere ottenute anche mediante la SPET, come dimostrano recenti studi in pazienti con ictus emiplegico (Di Piero *et al.*, 1992), o in pazienti con morbo di Parkinson trattati con agonisti dopaminergici (Sabatini *et al.*, 1991b).

La possibilità di studiare l'effetto di un farmaco su un'attivazione motoria rappresenta una possibilità futura per lo studio del recupero motorio. Infatti, l'osservazione derivante da studi sull'animale, che farmaci come l'anfetamina (Feeney *et al.*, 1982) possono facilitare il recupero motorio, gettano le basi per futuri studi SPET di attivazione farmacologica nell'uomo, in cui si potranno valutare le modificazioni indotte sul CBF da tali farmaci in specifiche aree cerebrali e, quindi, conoscere meglio i meccanismi attraverso cui tali farmaci agiscono.

Il recupero spontaneo sembra, almeno in parte, legato alla regressione della depressione neuronale che si verifica a distanza della lesione, dovuto all'interruzione di fibre nervose che connettono aree distinte anatomicamente, ma correlate da un punto di vista funzionale, fenomeno ipotizzato da von Monakow nel 1905 e che va sotto il nome di *diaschisi* (fig. 1).

L'afasia e il *neglect* visuo-spaziale dopo lesione talamica sinistra o destra, rispettivamente, trovano la loro spiegazione nella estesa ipoperfusione corticale ipsilateralmente alla lesione talamica, prodotta dall'interruzione delle afferenze talamo-corticali (Baron *et al.*, 1986; Perani *et al.*, 1987). Inoltre il miglioramento sintomatologico in questi casi è associato alla regressione della diaschisi corticale (Vallar *et al.*, 1988).

Meno conosciuti sono i sintomi associati alla diaschisi cerebellare crociata, fenomeno molto frequente dopo una lesione sopratentoriale per interruzione del fascio cortico-ponto-cerebellare (Baron *et al.*, 1980; Lenzi *et al.*, 1982; Pantano *et al.*, 1986; Pantano *et al.*, 1987). Ciò è probabilmente legato al fatto che possibili sintomi cerebellari sono «mascherati» dal deficit motorio primario dovuto alla lesione sopratentoriale. Una possibile espressione clinica è la riduzione del tono muscolare del lato emiplegico, che in alcuni pazienti tende a non risolversi in fase acuta e a perdurare per mesi (Pantano *et al.*, 1993).

Demenze

Nel capitolo delle demenze il ruolo degli studi PET e SPET da un punto di vista strettamente clinico non è ancora ben delineato, soprattutto nei confronti di TC e RMN che sono riconosciute indagini fondamentali nella diagnosi differenziale tra demenza vascolare e demenza di Alzheimer. Ciononostante, il quadro delle alterazioni di flusso e di metabolismo nelle due forme di demenza risulta profondamente diverso.

Nella demenza di Alzheimer si assiste ad una riduzione di flusso e di metabolismo nelle aree temporo-parietali bilateralmente, anche se talora in maniera asimmetrica, con coinvolgimento anche delle regioni frontali nei casi più avanzati (Frackowiak *et al.*, 1981; Foster *et al.*, 1983; Di Piero *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1988; Perani *et al.*, 1988; Lowenstein *et al.*, 1989).

Al contrario nella demenza vascolare le alterazioni di flusso e di metabolismo a livello corticale sono eterogenee, dipendendo dalla sede e dall'estensione delle lesioni vascolari (Frackowiak *et al.*, 1981; Benson *et al.*, 1983; Toghi *et al.*, 1991). Inoltre, le neuroimmagini funzionali possono fornire informazioni utili sulla risposta di aree cerebrali a stimoli diversi, come per esempio durante l'esecuzione di un compito cognitivo, soprattutto nelle fasi iniziali di malattia (Duara *et al.*, 1992).

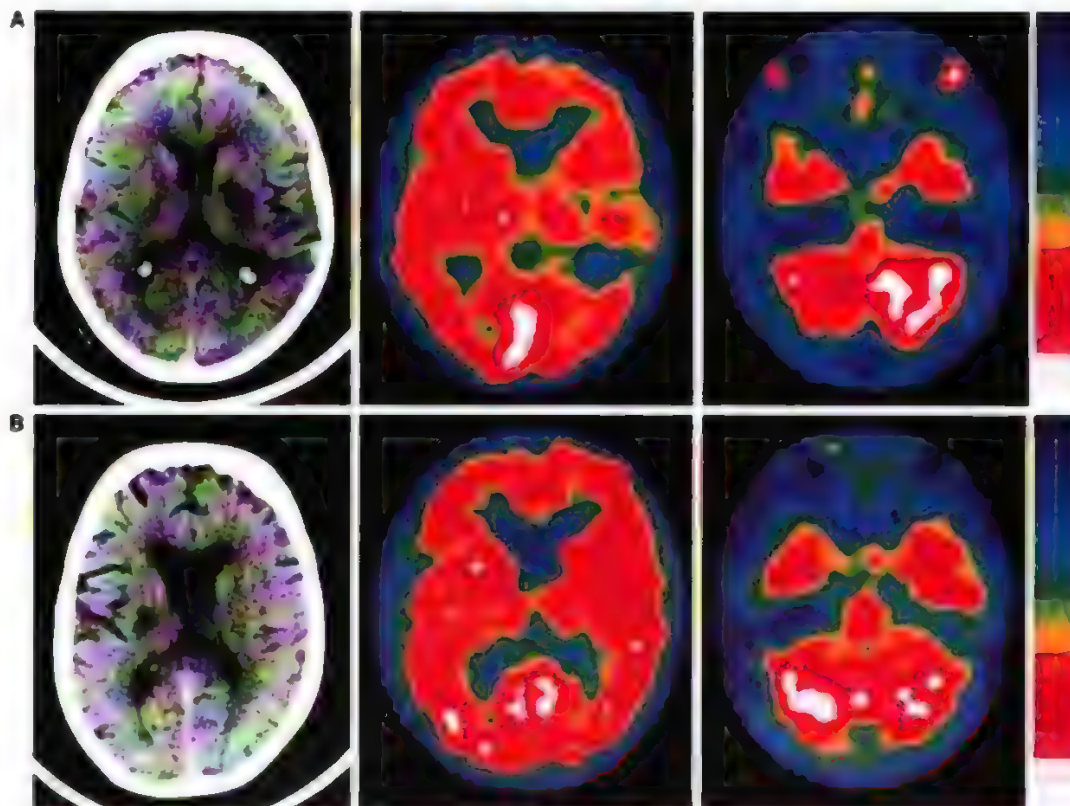


Fig. 1. Fsame TC e SPET in due pazienti studiati nella fase post-acuta dell'ictus, che presentavano emiparesi associata a flaccidità muscolare prolungata o a spasticità. Nonostante che la lesione ischemica fosse simile come estensione e localizzazione nei due pazienti, la SPET evidenziava un quadro di gravità diversa, soprattutto in termini di estensione dell'ipoperfusione anche a strutture anatomiche distanti (corteccia cerebrale ipsilaterale ed emisfero cerebellare controlaterale).

A) Paziente con grave emiparesi sinistra e flaccidità muscolare prolungata dopo 3 mesi dall'ictus. La lesione ischemica coinvolgeva alla TC la capsula interna e il globo pallido a destra. Alla SPET la perfusione ematica cerebrale risultava ridotta a livello delle strutture sottocorticali e della corteccia fronto-temporale di destra e a livello dell'emisfero cerebellare sinistro (*diaschisi* cerebellare crociata).

B) Paziente con emiparesi destra di media entità e spasticità muscolare dopo 2 mesi dall'ictus. La lesione ischemica coinvolgeva alla TC la capsula interna e la corona radiata di sinistra. Alla SPET la perfusione ematica cerebrale risultava lievemente ridotta a livello della corteccia temporale ipsilaterale.

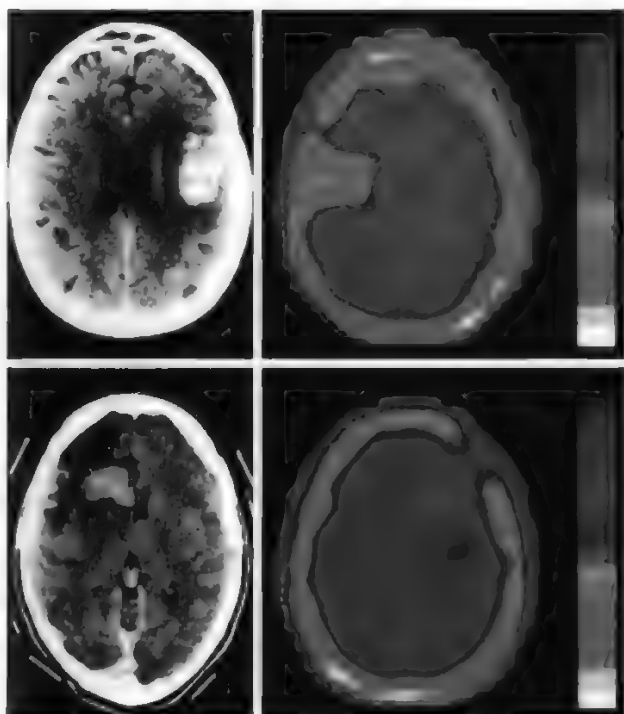


Fig. 2. Esame TC cerebrale e SPET con tallio-201 in un caso di recidiva tumorale ed in un caso di radionecrosi. Le immagini in alto sono relative ad un paziente operato 6 anni prima di astrocitoma di II grado in sede fronto-temporale sinistra e sottoposto a radioterapia frazionata dopo l'intervento. Controlli TC negativi per 5 anni, infine un controllo TC ha evidenziato un'area disomogenea, con edema perilesionale, che si potenziava dopo contrasto, nella sede del precedente tumore (il lato sinistro del paziente è a destra nell'immagine TC). L'esame SPET evidenziava un accumulo patologico di ^{201}Tl nella stessa sede. L'istologia mostrava trattarsi di una recidiva di alto grado. Le immagini in basso sono relative ad una paziente operata due anni prima di oligodendroglioma di II grado in sede frontale destra e trattata con radioterapia in stereotassi. Il controllo TC, eseguito dopo un anno dalla radioterapia, ha evidenziato un'area disomogenea, con edema perilesionale e potenziamento dopo mezzo di contrasto, nella sede del tumore asportato. L'esame SPET evidenziava una debole captazione di ^{201}Tl nella stessa sede. L'istologia mostrava trattarsi di radionecrosi.

Epilessia

Nel capitolo delle epilessie l'utilità clinica della SPET è basata sul fatto che tale patologia è associata a profonde modificazioni del CBF. Infatti durante una crisi generalizzata si verifica un aumento globale di CBF, che, nelle forme parziali, è più localizzato e corrisponde al focus epilettogeno all'EEG. Nelle fase intercritica, vi è al contrario una riduzione del CBF che ugualmente può corrispondere da un punto di vista topografico alle anomalie EEG (Magistretti *et al.*, 1982; Bonte *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1987). Inoltre, possono essere visualizzate aree ipoperfuse anche a distanza dal focolaio (Lee *et al.*, 1988; Pantano *et al.*, 1991), talora in relazione a deficit neuropsicologici, che dimostrano come le alterazioni funzionali possono essere più diffuse rispetto al focolaio EEG. Il ruolo principale della SPET, in alternativa alla PET, è comunque rappresentato dalla localizzazione topografica del focolaio in fase critica nei casi di epilessia farmaco-resistente in cui si prospetta la necessità dell'escissione chirurgica del focolaio stesso. I progressi tecnologici che hanno portato al miglioramento

della risoluzione spaziale dei tomografi da singolo fotone facilitano questo compito.

Tumori

La presenza di tessuto neoplastico nel contesto del parenchima cerebrale può essere documentata con l'uso del ^{201}Tl . Tale molecola è un analogo del potassio, la cui captazione è, nelle cellule nervose normali, praticamente nulla. La captazione del ^{201}Tl aumenta in relazione alla vascolarizzazione, alla permeabilità della barriera ematoencefalica, e all'attività della pompa sodio-potassio. È molto elevata nei casi di tumori poco differenziati e ad elevata attività replicativa, come i glioblastomi, o in caso di tumori particolarmente vascolarizzati, come i meningiomi o gli emangioblastomi.

La SPET con ^{201}Tl permette una buona differenziazione tra tumori della serie gliale a basso grado e ad alto grado di accrescimento (Black *et al.*, 1989), e la diagnosi differenziale tra radionecrosi e recidiva tumorale (Schwartz *et al.*, 1992; Ricci *et al.*, 1992) in pazienti già operati per un glioma e sottoposti a trattamento radiante (fig. 2). Infatti, mentre la recidiva si comporta come il tumore primitivo e presenta un'elevata captazione del radiotracciante, la radionecrosi, costituita prevalentemente da tessuto di tipo reattivo e infiammatorio, ha una captazione molto modesta. Tale diagnosi differenziale è in genere difficile, se non impossibile, con la TC o la RMN dell'encefalo.

Bibliografia

- Baird A. E., Donnan G. A., Austin M. C. *et al.*, *Stroke*, 1993, **25**, 79-85.
 Baron J. C., Boussier M. G., Comar D., Castaigne P., *Trans. Am. Neurol. Ass.*, 1980, **105**, 459-461.
 Baron J. C., D'Antona R., Pantano P. *et al.*, *Brain*, 1986, **109**, 1243-1259.
 Benson D. F., Kuhl D. E., Hawkins R. A. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1983, **40**, 711-714.
 Bonte F. J., Devous M. D., Stokely E. M., Homan R. W., *AJNR*, 1983, **4**, 544-546.
 Black K. L., Hawkins R. A., Kim K. T. *et al.*, *J. Neurosurg.*, 1989, **71**, 342-346.
 Chollet F., Di Piero V., Wise R. J. S. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 1991, **29**, 63-71.
 Di Piero V., Lenzi G. L., Passafiume D., *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 1987, **89**, 2-17.
 Di Piero V., Pozzilli C., Pantano P., Grasso M. G., Fieschi C., *Acta Neurol. Scand.*, 1989, **80**, 35-40.
 Di Piero V., Ricci M., Toni D. *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1992, **13** (Suppl. 1), S802.
 Duara R., Barker W. W., Chang J. *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1992, **12**, 927-934.
 Feeney D. M., Gonzales A., Law W. A., *Science*, 1982, **217**, 855.
 Foster N. L., Chase T. N., Fedio P. *et al.*, *Neurology*, 1983, **33**, 961-965.
 Fox P. T., Fox J. E., Raichle M. E., Burde R. M., *J. Neurophysiol.*, 1985, **54**, 348-369.
 Frackowiak R. S. J., Pozzilli C., Legg N. J. *et al.*, *Brain*, 1981, **104**, 753-778.
 Giubilei F., Lenzi G. L., Di Piero V. *et al.*, *Stroke*, 1990, **21**, 895-900.
 Johnson K. A., Holman L., Mueller S. P. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1988, **45**, 392-396.
 Lee B. I., Markand O. N., Wellmann H. N. *et al.*, *Epilepsia*, 1987, **28**, 305-311.
 Lee B. I., Markand O. N., Wellmann H. N. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1988, **45**, 397-402.
 Lenzi G. L., Frackowiak R. S. J., Jones T. *et al.*, *Eur. Neurol.*, 1981, **20**, 285-290.
 Lenzi G. L., Frackowiak R. S. J., Jones T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1982, **2**, 321-335.
 Lenzi G. L., Di Piero V., Pantano P., International Stroke Society, *Second World Congress of Stroke*, 1992, S149.
 Lowenstein D. A., Barker W. W., Chang J. Y. *et al.*, *Arch. Neurol.*, 1989, **46**, 146-152.
 Magistretti P., Uren R., Blume H. *et al.*, *Europ. J. Nucl. Med.*, 1982, **7**, 484-485.
 Pantano P., Baron J. C., Samson Y. *et al.*, *Brain*, 1986, **109**, 677-694.
 Pantano P., Lenzi G. L., Guidetti B. *et al.*, *Europ. Neurol.*, 1987, **27**, 142-148.
 Pantano P., Di Piero V., Pozzilli C. *et al.*, *Clinical Nuclear Medicine*, 1991, **16**, 898-903.

- Pantano P., Di Piero V., Ricci M., Fieschi C., Bozzao L., Lenzi G. L., *Eur. J. Nucl. Med.*, 1992, **19**, 939-945.
 Pantano P., Formisano R., Ricci M. et al., *Cerebrovasc. Dis.*, 1993, **3**, 80-85.
 Perani D., Vallar G., Cappa S. et al., *Brain*, 1987, **110**, 1211-1229.
 Perani D., Di Piero V., Vallar G. et al., *J. Nucl. Med.*, 1988, **29**, 1507-1514.
 Phelps M. E., Mazziotta J. C., Huang S. C., *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1982, **2**, 113-162.
 Posner M. I., *Science*, 1993, **262**, 673-674.
 Rachle M. E., Grubb R. L., Gado M. H. et al., *Arch. Neurol.*, 1976, **33**, 523-526.
 Ricci M., Pantano P., Bastianello S. et al., in Scotti G. ed., *Neuro-radiologia 1992*, Edizioni Del Centauro, Udine, pp. 365-369.
 Roland P. E., Skinhøj E., Lassen N. A., Larsen B., *J. Neurophysiol.*, 1980, **43**, 137-150.
 Sabatini U., Rascol O., Celsis P. et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1991a, **32**, 229-234.
 Sabatini U., Celsis P., Viillard G. et al., *Stroke*, 1991b, **22**, 324-330.
 Schwartz J., Tatsch K., Arnold G. et al., *Neurology*, 1993, **43**, 17-20.
 Schwartz R. B., Carvalho P. A., Alexander E. et al., *AJNR*, 1992, **12**, 1187-1192.
 Toghi H., Chiba K., Sasaki K. et al., *J. Neurol.*, 1991, **238**, 365-370.
 Vallar G., Perani D., Cappa S. et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 1988, **51**, 1269-1276.
 Vorstrup S., Brun B., Lassen N. A., *Stroke*, 1986, **17**, 1291-1298.

PATRIZIA PANTANO E LUIGI BOZZAO

NUCLEICI ACIDI [v. vol. X, coll. 1250-1282; Agg. I, coll. *5463-5481]

FARMACI INFORMATIZionali

SOMMARIO

Definizione e generalità sul meccanismo d'azione (col. 4067). - **Strategia anti-gene** (col. 4069). - **Struttura del triplex**. - **Stabilità del triplex**. - **Specificità della formazione della tripla elica**. - **Cinetica di formazione della tripla elica**. - **Formazione e possibile funzione di H-DNA** - *in vivo* -. - **Controllo genico mediante oligonucleotidi che formano triple eliche**. - **Inibizione della replicazione da parte di triple eliche**. - **Altri effetti prodotti da oligonucleotidi** (col. 4079). - **Ribozimi** (col. 4080). - **Conclusioni** (col. 4082).

Definizione e generalità sul meccanismo di azione

Lo scopo di una qualsiasi terapia è quella di fornire all'organismo un farmaco che colpisca solo il bersaglio verso cui è diretto e che non interferisca con gli altri normali processi biologici. Gli antitumorali e gli antivirali dovrebbero cioè uccidere solo le cellule trasformate o infettate risparmiando le cellule sane. Negli ultimi anni questa strategia ha previsto l'uso di farmaci a base di catene corte di acidi nucleici (oligonucleotidi) sia naturali che modificati chimicamente. Queste sostanze sono state denominate anche *farmaci informatizionali* in quanto contengono una informazione nella sequenza delle basi che le compongono.

Il DNA di ogni cellula contiene l'informazione per dirigere ogni processo che la riguarda e tale informazione

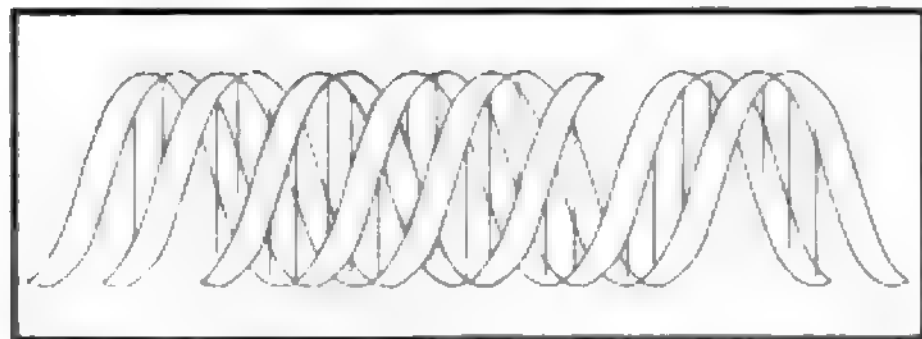


Fig. 1. Formazione della struttura a tripla elica, o triplex, con il terzo filamento che si inserisce nel solco largo della struttura a doppia elica.

viene duplicata prima della divisione cellulare (replicazione) e trasmessa a cascata all'RNA messaggero e alle proteine durante i processi di trascrizione e traduzione. Il meccanismo dei farmaci informatizionali è quello di bloccare uno di questi processi o comunque di interferire con essi. Una determinata sequenza di basi nel DNA genomico o nell'RNA messaggero provvede la necessaria selettività del bersaglio da parte di questi farmaci.

L'arresto traduzionale (l'arresto della sintesi di qualche proteina non voluta) può essere raggiunto mediante la cosiddetta *strategia antisense* (discussa in altra sede [v. ANTISENNO OLIGONUCLEOTIDI*]), che permette ad un oligonucleotide esogeno (qualche volta endogeno) di legarsi in maniera stabile a porzioni dell'RNA messaggero sotto forma di duplex impedendo la sintesi proteica o mediante un processo di blocco dei ribosomi o mediante l'attivazione della ribonucleasi H che taglia l'RNA messaggero. Questa strategia, attivamente perseguita in molti laboratori, ha tuttavia molti limiti, il maggiore dei quali è la necessità di inattivare molte copie di RNA messaggero.

Potenzialmente più idonea è la strategia che cerca di bloccare il passaggio dell'informazione direttamente alla fonte e cioè sul DNA. In questo modo il numero di informazioni da bloccare è certamente più limitato (ci sono normalmente due copie di ciascun gene in un genoma diploide) e quindi la strategia risulta più efficace. Questo obiettivo si raggiunge mediante la formazione di triple eliche direttamente sul genoma.

Una tripla elica (DNA *triplex*) (fig. 1) si forma quando un filamento di DNA o di RNA occupa il solco maggiore di un tratto di DNA duplex (a sequenza esclusivamente purinica in un filamento ed esclusivamente pirimidinica nell'altro) formando legami idrogeno di tipo Hoogsteen od anti-Hoogsteen con le purine delle coppie Crick e Watson. Tale struttura può essere formata intramolecolarmente (in tal caso è chiamata struttura H), nel senso che il terzo filamento viene catturato da un tratto di duplex adiacente della stessa catena di DNA (con la liberazione di un singolo filamento) (fig. 2), oppure intermolecolarmente quando il

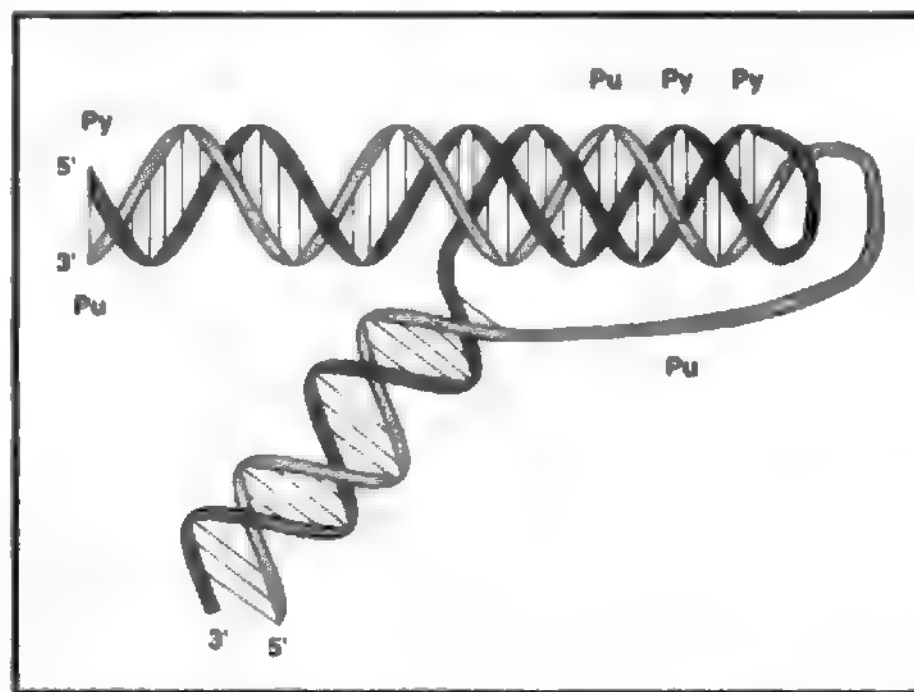


Fig. 2. Struttura della tripla elica intramolecolare (struttura H) che si forma nel DNA in presenza di una sequenza polipurinica-poli-pirimidinica con simmetria a specchio. Metà del filamento polipurinico si ripiega e si sistema nel solco largo della doppia elica formando una tripla py-pu-py, liberando la metà dell'altro filamento polipurinico che rimane non appaiato. Alternativamente è la metà del filamento purinico che può ripiegarsi e dare luogo ad una tripla pu-py-pu.

terzo filamento è fornito dall'esterno. Il primo processo è forse utilizzato dalle cellule per fini al momento ignoti mentre il secondo è utilizzabile per fini biotecnologici o terapeutici.

Questa strategia è denominata «anti-gène» per distinguerla da quella denominata «anti-senso».

Strategia anti-gène

Struttura del triplex

Numerosi studi hanno ormai dimostrato che la tripla elica può essere generata sia aggiungendo un filamento pirimidinico al duplex con formazione di una struttura $Y \cdot R = Y$ (in cui Y rappresenta un filamento pirimidinico, R quello purinico, il punto rappresenta i legami idrogeno secondo Crick e Watson e la doppia linea i legami idrogeno secondo Hoogsteen), sia aggiungendo un filamento purinico con formazione della struttura $Y \cdot R = R$. Inoltre, le catene possono essere costituite da DNA o da RNA o da una loro combinazione. Le triple $Y \cdot R = Y$ contengono le triadi $C \cdot G = C$ e $T \cdot A = T$ che, essendo state scoperte per prime, sono considerate le triadi canoniche. Queste due triadi sono geometricamente identiche (isomorfe) per cui una tripla elica costituita solo da queste triadi risulta perfettamente regolare (fig. 3). Le triple formate da queste due triadi hanno però il grave difetto di non essere stabili a pH fisiologici in quanto $C \cdot G = C$ richiede la protonazione dell' N^3 della citosina nel terzo filamento per formare i legami Hoogsteen e quindi valori di pH inferiori a 6.

Le triple $Y \cdot R = R$ sono più versatili delle triple $Y \cdot R = Y$. Esse sono rappresentate in fig. 4. Dalla figura si deduce: 1) i legami con cui le purine G ed A del terzo filamento si accoppiano alle rispettive purine del duplex sono del tipo anti-Hoogsteen (notare la posizione del gruppo R rispetto a quella della fig. 3); 2) la triade $T \cdot A = T$ può essere incorporata totalmente o parzialmente al posto della triade $T \cdot A = A$ poiché ha una geometria che la rende quasi isomorfa alle altre due, conservando il legame anti-Hoogsteen.

Nelle triple $Y \cdot R = R$ il terzo filamento è antiparallelo al filamento purinico del duplex: se esso è prevalentemente pirimidinico, in esso le T sarebbero parallele alle T del filamento pirimidinico. La versatilità delle triple puriniche sta nel fatto che nel terzo filamento si può avere A o T che si oppone alle coppie A-T, mentre nelle triple pirimidiniche

la sequenza del terzo filamento è strettamente determinata dalla sequenza del duplex.

Si è visto che la formazione delle triple può essere inter- o intramolecolare. C'è da aggiungere che esse possono essere formate indifferentemente da catene di DNA o di RNA o da una loro combinazione. Inoltre, possono esistere sequenze di DNA nelle quali un blocco di purine può essere seguito nello stesso filamento da un blocco di pirimidine. In tal caso la tripla può essere ottenuta da un terzo filamento anch'esso fatto a blocchi.

Tutte le varie combinazioni di strutture inter- ed intramolecolari sono riportate in fig. 5. Le strutture che hanno rilevanza per quello che segue nel testo sono quelle designate dalle lettere A, F, K e L e dove tutti i filamenti sono di DNA.

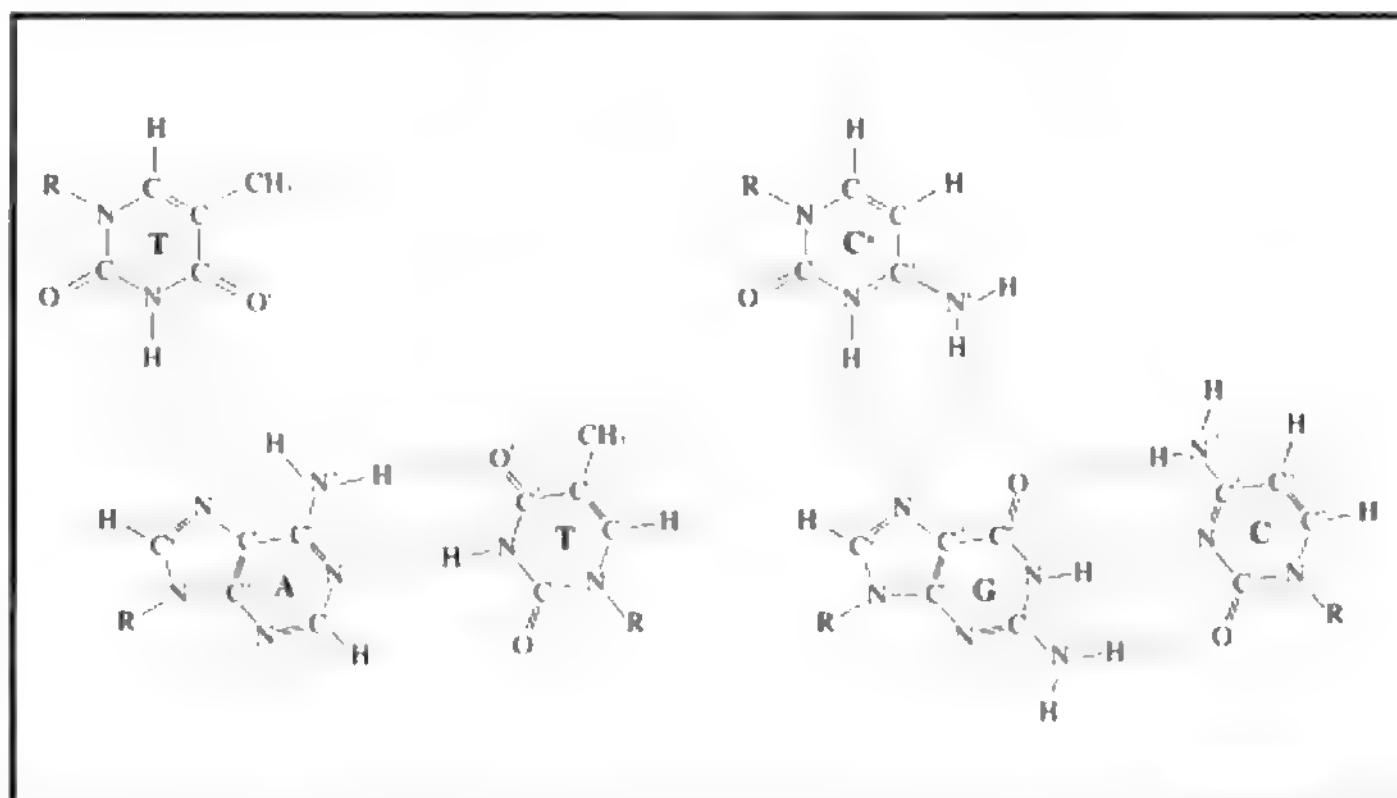
Stabilità del triplex

La stabilità delle triple eliche è particolarmente importante in vista di una loro possibile utilizzazione biologica.

Le triple con il terzo filamento pirimidinico sono stabili solo in condizioni acide. Il pH fisiologico è tuttavia neutro e questo sembra precludere la loro utilizzazione *in vivo*. Sperimentalmente si è visto, però, che l'uso della metil-citosina invece della citosina rende possibile l'uso del terzo filamento pirimidinico a valori del pH non molto lontani dalla neutralità, specialmente se il terzo filamento è povero in citosine. A questo si aggiunga l'effetto stabilizzante delle poliamine spermina e spermidina sulla tripla elica. Ambedue queste poliamine sono presenti nel nucleo delle cellule in concentrazione millimolare e questo aumenta la possibilità della formazione di triple *in vivo*. Un'altra possibile soluzione è quella di sostituire alla citosina delle basi non naturali che non richiedono protonazione per formare legami Hoogsteen con il duplex. Alcune di queste basi sono state sintetizzate e si è visto sperimentalmente che sono in grado di formare triple a pH neutro.

Le triple con il terzo filamento purinico non presentano i problemi legati al valore del pH fisiologico ma si è visto che la stabilità delle triple eliche formate dipende, oltre che dalla presenza di poliamine, anche da concentrazioni millimolari di ioni bivalenti come Ca^{2+} e Mg^{2+} . Questi ioni sono presenti nelle cellule ma probabilmente a concentrazioni libere inferiori a quelle necessarie per questo scopo.

Fig. 3. Struttura delle triadi con la terza base pirimidinica (triadi canoniche). La coppia di basi in basso è quella classica di Crick e Watson mentre la base in alto appartiene al terzo filamento della tripla elica.



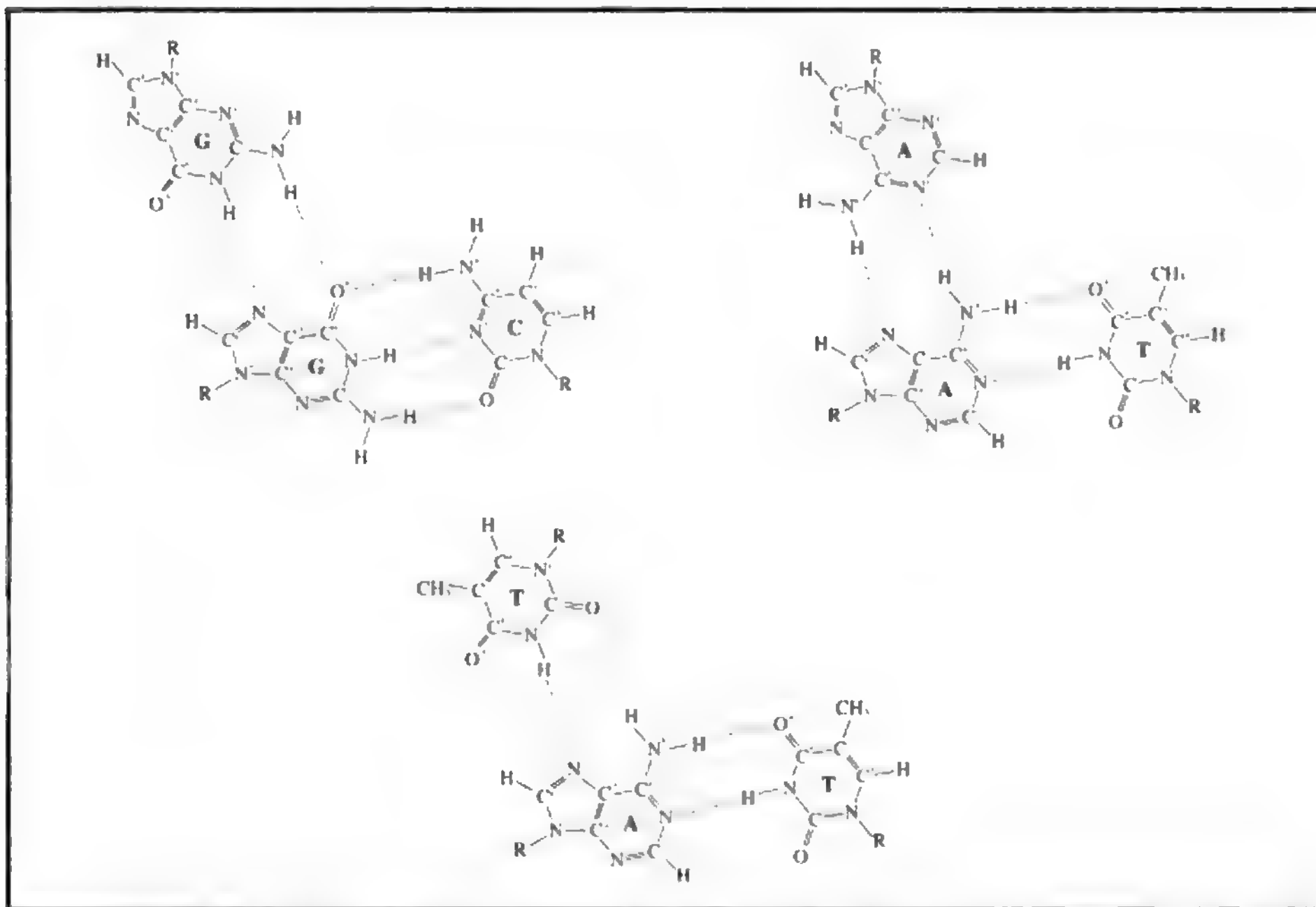


Fig. 4. Struttura delle triadi con la terza base purinica. Come nella figura precedente la coppia di basi in basso è quella classica di Crick e mentre la base in alto appartiene al terzo filamento. Notare che a questo gruppo di triadi appartiene anche quella che ha come terza base T (una pirimidina), ma in posizione rovesciata rispetto alla T della figura precedente. Questa triade pirimidinica risulta essere isomorfa con le triadi puriniche.

Un modo generale di aumentare la stabilità di tutte le triple eliche, sia *in vitro* che *in vivo*, è quello di attaccare al terminale del terzo filamento un gruppo intercalante, una

molecola cioè che sia in grado di interagire fortemente con il DNA bersaglio inserendosi tra le coppie di basi del duplex vicino alla giunzione con la tripla.

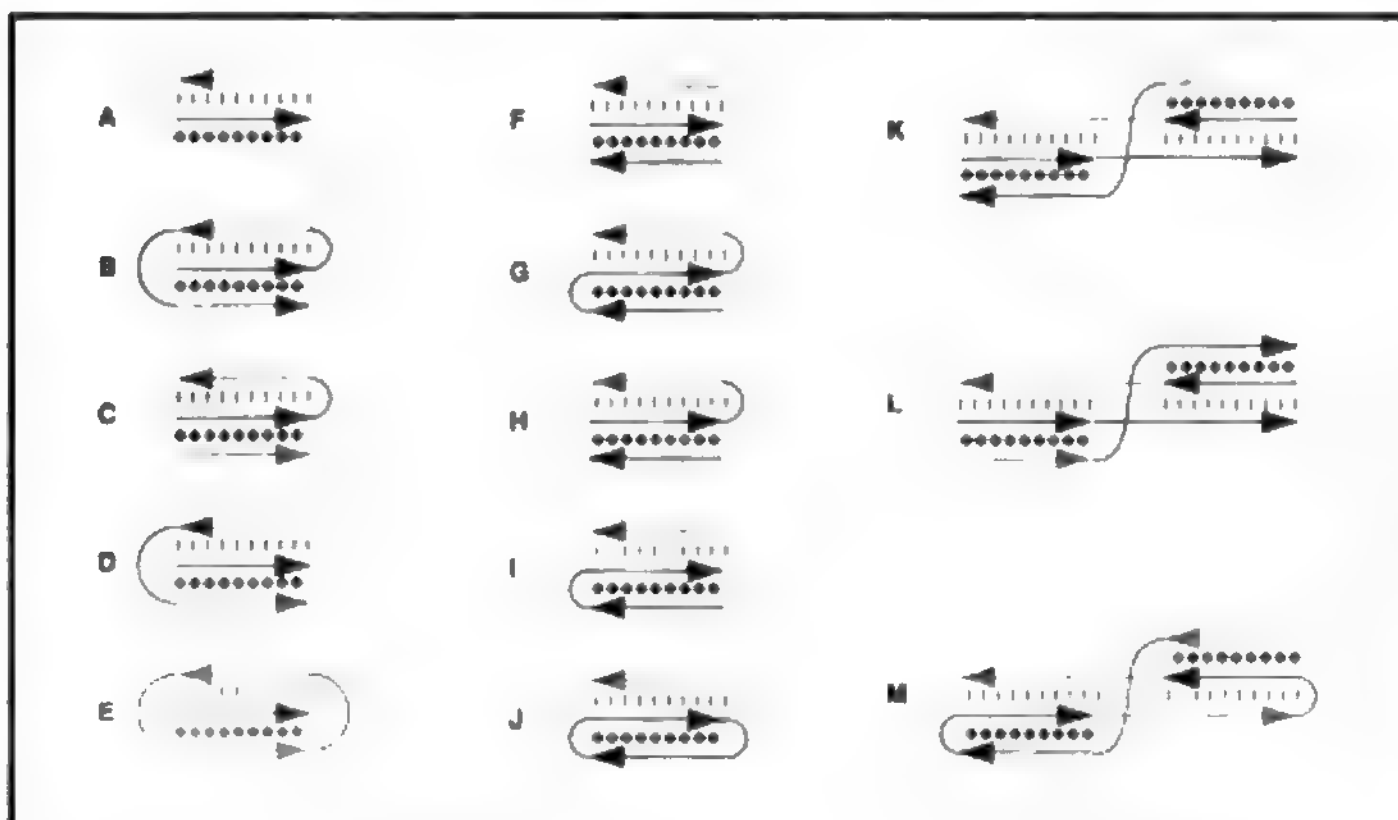


Fig. 5. Possibili strutture a tripla elica sia intra- che inter-molecolari. I filamenti possono essere di DNA o di RNA. Le frecce piene rappresentano sequenze puriniche, quelle ombreggiate rappresentano sequenze pirimidiniche ed indicano ambedue la polarità della catena. Le linee rappresentano i legami idrogeno di Crick e Watson, i quadratini rappresentano i legami secondo Hoogsteen.

Una strategia ancora più efficace è quella di usare lo *psoralene* (v. PSORALENI) come molecola attaccata ad un terminale del terzo filamento, a condizione che nella giunzione tra la doppia elica e la tripla elica ci sia nella prima una sequenza 5'TpA3'. In queste condizioni e sotto l'azione della luce ultravioletta lo psoralene (che è in grado di inserirsi tra le due coppie di basi AT della doppia elica confinante) è in grado di reagire con le due timine sopra e sotto il sito di intercalazione formando un legame crociato e fissando quindi in maniera irreversibile il terzo filamento al DNA bersaglio. Ovviamente questa strategia presuppone che la cellula o il tessuto che ha captato il terzo filamento sia irradiabile mediante luce ultravioletta.

La formazione della tripla elica può essere verificata *in vitro* sperimentalmente con un certo numero di tecniche.

1. *Gel elettroforesi*. - L'uso di questa tecnica si basa sulla differenza di mobilità attraverso il gel, in presenza di un campo elettrico, del duplex rispetto al triplex. Quest'ultimo ha una mobilità inferiore e quindi la formazione della tripla evidenzia una banda di migrazione ritardata rispetto al duplex (fig. 6).

2. *Stabilità alla fusione termica*. - Se si riscalda una tripla elica e contemporaneamente si misura l'assorbimento a 260 nm (dove c'è assorbimento sia da parte del duplex che del triplex) in funzione della temperatura, si ottiene una curva di fusione bifasica come quella mostrata in fig. 7. La prima fusione corrisponde al distacco del terzo filamento dal duplex, mentre la seconda si riferisce alla denaturazione del duplex. Questo esperimento riveste una certa importanza, sia perché dimostra la formazione della tripla elica sia perché definisce anche il campo di temperatura entro il quale la tripla è stabile. Questa informazione è fondamentale per l'uso della tripla *in vivo* perché la temperatura fisiologica è normalmente 37 °C e la tripla deve essere stabile a questa temperatura se si vuole che produca gli sperati effetti biologici.

3. *Metodo dell'impronta chimica*. - La formazione della tripla elica, con l'inserimento del terzo filamento nel solco largo della doppia elica del DNA, rende inaccessibili alcuni gruppi chimici nel duplex. Questi gruppi, potenzialmente capaci di reagire con alcune sostanze, ne sono impediti se si forma la tripla elica. Analogamente

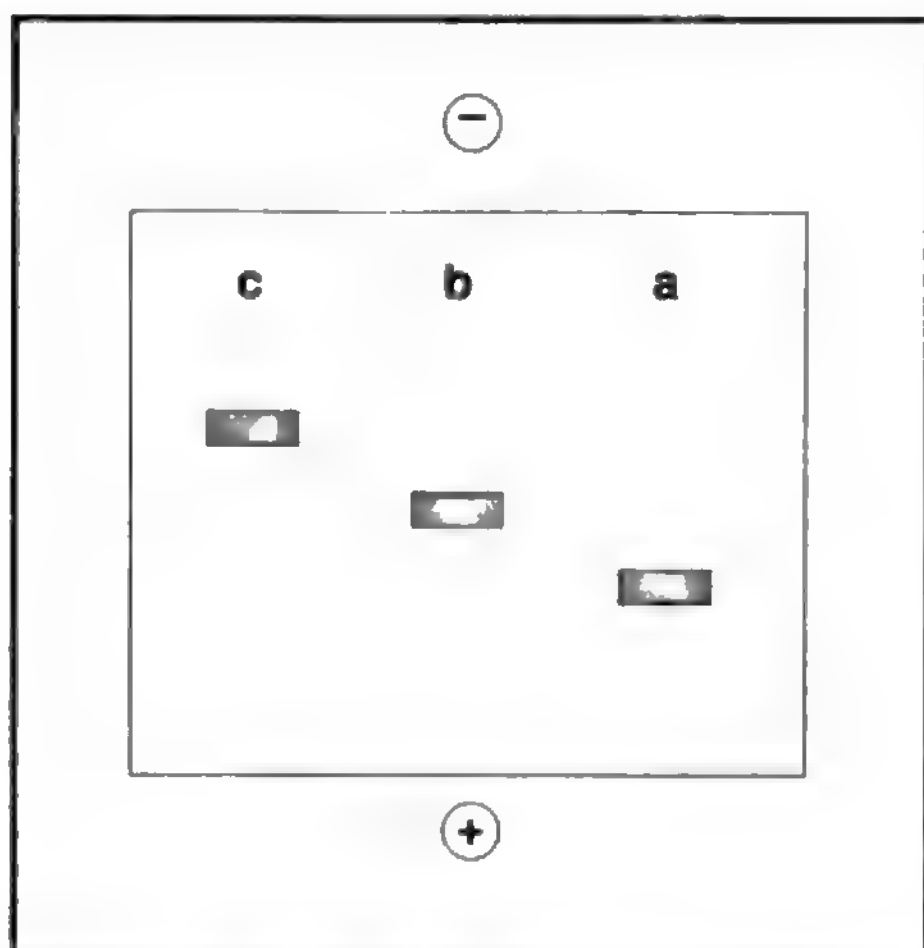


Fig. 6. Differenza di mobilità elettroforetica tra singoli filamenti (a), duplex (b) e triplex (c) della stessa lunghezza.

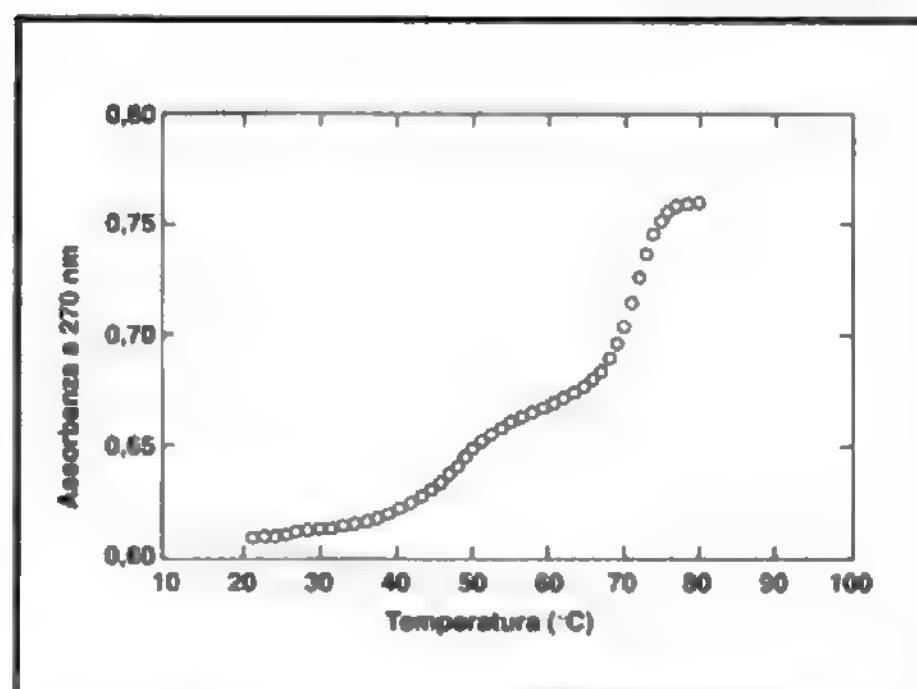


Fig. 7. Fusione termica di una tripla elica registrata mediante misure di assorbimento U.V. a 270 nm. La fusione è bimodale: a bassa temperatura (circa 45 °C) si stacca il terzo filamento, a più alta temperatura (circa 70 °C) si denatura la doppia elica.

i duplex, che possono essere enzimaticamente tagliati da endonucleasi sia aspecifiche che specifiche (di restrizione), mostrano un'assenza del taglio in corrispondenza dei tratti a tripla elica. L'assenza di reazione o di taglio in corrispondenza dei tratti a tripla elica sarà rivelatrice della presenza di questa struttura.

Specificità della formazione della tripla elica

Se l'obiettivo della formazione della tripla elica è il blocco funzionale di un tratto di DNA è necessario garantire che l'interazione del terzo filamento sia specifica ed esclusiva per una certa sequenza nel DNA genomico. La lunghezza del DNA genomico varia da alcune migliaia di coppie di basi nei virus, ad alcuni milioni nei batteri, ad alcuni miliardi negli eucarioti superiori. Il genoma umano contiene 3 miliardi di coppie di basi per copia. Di fronte a questa ampia variabilità di lunghezza del genoma è necessario scegliere con oculatezza la lunghezza del bersaglio. In altri termini non basta avere individuato nel DNA una sequenza potenzialmente in grado di dar luogo, con l'opportuno terzo filamento, alla formazione della tripla elica. Infatti, una sequenza troppo corta, oltre a non garantire una tripla sufficientemente stabile *in vivo*, potrebbe dar luogo alla formazione di triple non volute in altri punti del genoma solo perché la sequenza bersaglio ha statisticamente una certa probabilità di esistere altrove. Ovviamente questo ragionamento è applicabile a quei genomi di cui non si conosce l'intera sequenza, che a tutt'oggi sono tutti con l'eccezione di alcuni batteri, di un lievito e di qualche virus. Nel caso del genoma umano il pericolo della formazione della tripla in zone non volute è evitabile con un semplice calcolo della probabilità di esistenza di una certa sequenza di una certa lunghezza (basata su una distribuzione casuale delle basi e su un contenuto di AT e GC pari al 50% di ciascuna coppia). Questo calcolo prevede che una sequenza lunga 17 coppie di basi è un bersaglio sufficientemente lungo da rendere poco probabile l'esistenza casuale della stessa sequenza in altre zone del genoma. Lunghezze maggiori ovviamente diminuiscono la probabilità del pericolo di formare triple indesiderate. Per un genoma batterico gli stessi calcoli danno una lunghezza minima di 11 coppie di basi.

Il problema della specificità dell'interazione ne solleva

un altro che con essa si intreccia: cosa accade se la sequenza bersaglio (con la sua lunghezza ottimale) non è rigorosamente purinica-pirimidinica, ovvero contiene una o più purine nel filamento pirimidinico e viceversa? In tal caso si parla di *effetto mismatch*, che è di grande importanza nelle applicazioni *in vivo* per il semplice motivo che è molto difficile trovare nel tratto del DNA bersaglio una sequenza sufficientemente lunga esclusivamente purinica e pirimidinica nei due filamenti. Esperimenti *in vitro* su questo effetto hanno portato alle seguenti conclusioni: 1) un *mismatch* destabilizza sempre la tripla elica; 2) l'ammontare della destabilizzazione dipende dalla natura del *mismatch* e dalla natura delle coppie di basi che gli sono immediatamente vicine.

Queste conclusioni suggeriscono agli sperimentatori di provare sempre *in vitro* la formazione della tripla elica e la sua stabilità con la temperatura prima di passare alle applicazioni biologiche. Se si utilizzano tutte queste precauzioni si è sperimentalmente provato che l'uso degli oligonucleotidi giusti porta alla ricognizione univoca del bersaglio.

Cinetica di formazione della tripla elica

Le misure cinetiche hanno mostrato che la formazione della tripla elica è un processo circa mille volte più lento della formazione della doppia elica. La velocità dipende molto dalla presenza di ioni e dalla presenza di *mismatches*. Anche questo è un punto importante da capire prima di un eventuale uso biologico della tripla perché se il terzo filamento dovesse competere *in vivo* per lo stesso bersaglio con una proteina, quest'ultima potrebbe prevalere cineticamente nell'interazione e impedire la formazione della tripla.

Formazione e possibile funzione di H-DNA «in vivo»

Nei genomi degli organismi superiori sono presenti sequenze puriniche-pirimidiniche con una simmetria a specchio, tale da permettere potenzialmente la formazione della struttura a tripla elica intramolecolare (struttura H). Molti studi sono stati eseguiti per verificare: 1) se la struttura H si forma *in vivo* e 2) quali processi innescano la eventuale formazione di questa struttura.

Alla prima domanda si può rispondere con sufficiente sicurezza in modo positivo. L'uso di sonde chimiche in grado, come illustrato in precedenza, di determinare la presenza di triplex e l'uso di anticorpi contro la struttura a tripla elica hanno permesso l'identificazione di questa struttura in svariati sistemi.

Molto più difficile è rispondere in maniera univoca alla seconda domanda. Risultati contraddittori sono stati ottenuti sulla influenza della struttura H nella replicazione e nella trascrizione del DNA, per cui al momento è opportuno sospendere il giudizio e attendere altri dati più convincenti per confermare o escludere l'ipotesi di un diretto coinvolgimento della struttura H nel controllo di alcuni processi di rilevante importanza biologica.

Controllo genico mediante oligonucleotidi che formano triple eliche

La presunzione e la speranza di quei ricercatori che studiano la formazione e la stabilità della tripla elica è quella che essa si formi *in vivo* a seguito della cattura (*uptake*) da parte delle cellule di oligonucleotidi di lunghezza e sequenza opportuna.

Prima di esaminare cosa potrebbe fare una tripla elica *in vivo* è opportuno prendere in considerazione due problemi la cui soluzione costituisce la premessa per un uso terapeutico dei farmaci informazionali. Essi sono: 1) la capacità

degli oligonucleotidi di entrare nelle cellule e 2) la loro stabilità chimica *in vivo*.

È ormai abbondantemente provato che gli oligonucleotidi, nonostante la loro carica negativa che dovrebbe essere un impedimento all'attraversamento del doppio strato lipidico delle cellule per diffusione passiva, non hanno grande difficoltà ad entrare fino ad una lunghezza di alcune decine di basi. La loro internalizzazione sembra avvenire mediante un processo di endocitosi mediata da recettori. Una volta entrati essi si distribuiscono sia nel citoplasma che nel nucleo. L'aggiunta agli oligonucleotidi di gruppi terminali può modificare la loro distribuzione all'interno della cellula. Tempi dell'ordine di grandezza di ore sono necessari per saturare le cellule. Recentemente si è tentato di aumentare sia la velocità che la quantità di *uptake* usando dei liposomi come trasportatori, essendo stata provata la capacità dei liposomi di fondersi con le pareti cellulari.

Molto più serio dell'*uptake* è il problema della stabilità degli oligonucleotidi. Essi sono facilmente soggetti all'attacco delle endo- e delle esonucleasi presenti un po' dappertutto sia all'interno che all'esterno delle cellule e nel sangue. Gli oligoribonucleotidi sono più attaccabili degli oligodeossinucleotidi per la maggior presenza e diffusione delle RNasi rispetto alle DNasi. Per questa ragione l'idrolisi enzimatica degli oligoDNA è forse il maggior ostacolo al possibile uso di queste sostanze come farmaci. La strategia usata per superarlo è quella di cercare di proteggerle al massimo senza modificarne sostanzialmente le proprietà. La protezione consiste nell'aggiunta di svariati gruppi chimici ai terminali della catena (per evitare l'attacco delle esonucleasi) e nel modificare chimicamente i gruppi fosfati per inibire le endonucleasi. Numerose modifiche sono state proposte, ma tra esse le più significative sono la sostituzione di un atomo di ossigeno del gruppo fosfato con un atomo di zolfo (fosforotioati), preservando così la carica negativa del gruppo, oppure la trasformazione del gruppo fosfato in fosfonato per sostituzione di un ossigeno con, per esempio, un gruppo metile. Così facendo si sopprime la carica del fosfato. Queste due modifiche, se da una parte stabilizzano gli oligonucleotidi, interferiscono con la formazione delle triple eliche e/o con l'ingresso nelle cellule. L'uso dei liposomi come trasportatori, oltre a favorire l'ingresso nelle cellule, potrebbe essere un mezzo efficace per proteggere gli oligonucleotidi dall'attacco nei liquidi extracellulari. Tuttavia alcuni risultati sperimentali evidenziano che i liposomi suscitano una risposta immune nell'organismo e inoltre sembrano indirizzarsi prevalentemente verso alcuni organi (ad es., fegato) a scapito di altri.

Un oligonucleotide della giusta lunghezza e sequenza, una volta entrato nel nucleo di una cellula e aver interagito con la sequenza bersaglio nel DNA formando una tripla elica, può interferire con la trascrizione di uno specifico gene in vari modi.

La fig. 8 (a) mostra in maniera schematica un complesso di trascrizione in un organismo eucariota. Un gene per essere trascritto necessita del legame della RNA polimerasi in corrispondenza del suo inizio. Al contrario dei procarioti, negli eucarioti tale legame si forma solo se preventivamente tutta una serie di proteine si lega al cosiddetto promotore. L'insieme di queste proteine (che sono fattori di trascrizione basali e fattori di trascrizione specifici) forma un complesso che è unico per il dato gene. In seguito alla formazione di questo complesso la RNA polimerasi è ora in grado di legarsi e di iniziare il lavoro di trascrizione. Il complesso proteico si forma anche grazie alla capacità di alcuni dei fattori di trascrizione di trovare nel DNA sequenze di basi a cui legarsi con alta affinità. Queste sequenze sono localizzate vicine e a monte del gene, ma al-

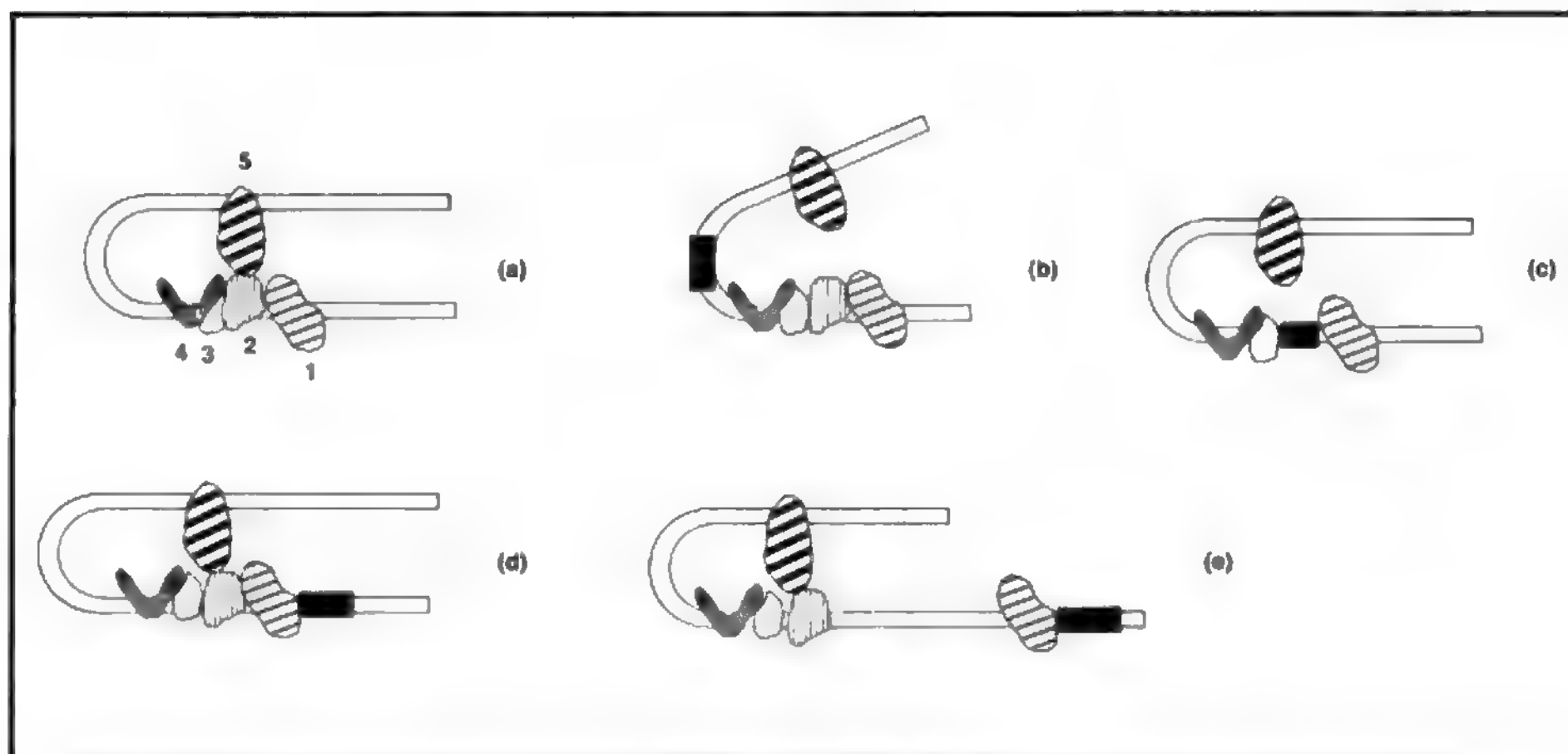


Fig. 8. Possibili effetti della tripla elica sulla trascrizione di un gene. *a)* Complesso di trascrizione schematicizzato nella sua configurazione normale. La proteina contrassegnata con il numero 1 è la RNA polimerasi. Le proteine contrassegnate con gli altri numeri sono fattori di trascrizione basali o gene specifici. *b)* La presenza della tripla nel tratto curvo di DNA ne impedisce la normale piegatura e quindi inibisce la formazione del complesso. La tripla è rappresentata dal rettangolo scuro. *c)* La presenza della tripla elica in un tratto di DNA a cui deve legarsi una delle proteine del complesso ne impedisce il legame e quindi la formazione del complesso. *d)* La presenza della tripla elica nel sito di inizio della trascrizione impedisce l'apertura del DNA e la formazione della bolla di trascrizione. *e)* La presenza della tripla elica all'interno del gene impedisce lo scorrimento della RNA polimerasi e quindi blocca la trascrizione.

cune sono localizzate anche migliaia di coppie di basi distanti (potenziatori). In questo caso il complesso proteico si forma per la capacità che ha il DNA di curvarsi e permettere a proteine legate vicino al gene e a quelle legate lontano dal gene di interagire tra loro.

Nella fig. 8 (*b*) la formazione della tripla elica nel tratto di DNA che deve piegarsi può impedire la curvatura grazie alla maggiore rigidità del triplex rispetto al duplex ed impedire così al complesso di formarsi.

La fig. 8 (*c*) mostra invece come lo stesso complesso possa essere inibito per la formazione della tripla elica nel tratto di DNA dove una qualsiasi delle proteine partecipanti al complesso (compresa la RNA polimerasi) ha il suo specifico sito di legame.

Nella fig. 8 (*d*) è mostrata la formazione della tripla in corrispondenza del sito di inizio della trascrizione, subito dopo la RNA polimerasi. In questo caso la presenza del triplex può impedire l'apertura della bolla di trascrizione per la maggiore stabilità del triplex rispetto al duplex.

La fig. 8 (*e*) mostra invece l'effetto della presenza della tripla all'interno del gene: quando la RNA polimerasi arriva, il suo scorrimento è impedito dalla presenza di questa nuova conformazione. La trascrizione si interrompe e si ottiene un RNA messaggero più corto del dovuto, mentre nei casi precedenti la trascrizione è impedita fin dall'inizio.

Altri meccanismi più sofisticati, come la perturbazione della struttura della cromatina o dei nucleosomi, da parte di tratti a tripla elica, potrebbero ugualmente influenzare il livello di trascrizione ma sarebbero probabilmente meno efficaci e comunque meno specifici, mentre la specificità è l'obiettivo principale della strategia anti-gene.

Alcuni dei meccanismi mostrati nella fig. 8 sono stati sperimentalmente verificati su modelli *in vitro* e su colture

cellulari con risultati più o meno soddisfacenti. Tra i risultati ottenuti *in vitro* sono da ricordare il sostanziale blocco della trascrizione dei geni *c-myc*, *DHFR*, *H-ras* e del gene del recettore α dell'interleuchina 2 quando oligonucleotidi della giusta sequenza, corrispondenti al sito di legame di un fattore di trascrizione, sono stati aggiunti al sistema acellulare.

Un numero crescente di indicazioni che gli oligonucleotidi possano agire come soppressori della trascrizione in colture cellulari sta aparendo in letteratura. Tali effetti, pur non essendo spettacolari (l'inibizione della trascrizione non è mai completa e raramente supera il 50-60%), sono evidenti specialmente se gli oligonucleotidi usati sono protetti contro la degradazione e contengono come coniugati molecole intercalanti come derivati acridinici o psoralene. In quest'ultimo caso la preventiva irradiazione delle cellule porta ad effetti inibitori particolarmente elevati. Tra i casi studiati in colture cellulari rivestono particolare importanza il blocco parziale dei geni del recettore α dell'interleuchina 2, del *c-myc* e del gene della *multidrug resistance* (MDR; v. *6343). È questo l'unico caso riportato finora di blocco parziale ottenuto con la formazione di una tripla elica all'interno del gene invece che nel promotore.

Inibizione della replicazione da parte di triple eliche

L'uso della formazione della tripla per il blocco della replicazione del DNA è molto meno studiato di quello per il blocco della trascrizione. In linea di principio la formazione della tripla potrebbe interferire con l'azione delle DNA polimerasi e delle elicasi necessarie alla replicazione. Tuttavia i dati raccolti *in vitro* sono contraddittori, salvo quando gli oligo sono coniugati con lo psoralene e le cellule sono

irradiate, nel qual caso un blocco della replicazione è accertato.

Altri effetti prodotti da oligonucleotidi

Recentemente è stato riportato in letteratura un uso completamente diverso degli oligonucleotidi. La tecnica usata, se si dimostrerà efficace anche in altri casi oltre quello riportato, servirà per correggere in maniera mirata un difetto genetico ereditario. Questa sarebbe una variante della terapia genica attualmente usata. Oggi infatti nella versione corrente della terapia genica (v.*; v.***) non si corregge il difetto ereditario sul gene colpito ma si aggiungono una o più copie funzionali del gene nelle cellule nelle quali il difetto si manifesta o nei loro precursori. Le copie di questi geni si integrano più o meno casualmente nel genoma delle cellule trattate dando luogo a risultati imprevedibili per quanto riguarda il livello e i tempi della loro espressione. Le prime applicazioni della terapia genica sono state effettuate sulle patologie causate da difetti ereditari sulle cellule del sangue per la facile accessibilità di questo tessuto. Una di queste malattie molto diffusa è l'anemia falciforme (v. EMOGLOBINOPATIE [v.; v.*; v.**]). Essa è causata da una mutazione puntiforme nel gene della β -globina. Un gruppo di ricercatori di Filadelfia ha trattato le cellule linfoblastoidi di un individuo affetto da questa patologia con uno speciale oligonucleotide misto DNA-RNA, che ha la capacità di legarsi al tratto di DNA contenente il difetto genetico e di catalizzare la ricombinazione omologa tra l'oligonucleotide e il DNA bersaglio, correggendo così il difetto originario. L'oligonucleotide usato è un filamento di DNA circolare, contenente due tratti di RNA che fiancheggiano il segmento di DNA contenente la sequenza corretta, che dopo ricombinazione sostituisce la sequenza errata nel DNA genomico. La sequenza dell'oligonucleotide circolare è tale da dare luogo ad un duplex DNA-RNA. La protezione nei confronti delle nucleasi è ottenuta sia con la circolarizzazione (che evita l'azione delle esonucleasi) che con la protezione dell'ossidrilico in 2' dei tratti di RNA (fig. 9). L'oligonucleotide veniva introdotto nelle cellule per mezzo di liposomi. La correzione del difetto genetico (peraltro non completa) veniva rivelata mediante l'uso dell'enzima di restrizione *Bsu* che è in grado di tagliare il DNA quando in esso è presente la sequenza corretta del gene ma non ne è più capace quando si è in presenza del DNA mutato. Una ulteriore conferma dell'avvenuta correzione si è avuta

sequenziando il DNA dopo il trattamento con l'oligonucleotide.

Un gruppo indipendente ha confermato che la tecnica descritta funziona operando sia su cellule epatiche in coltura che *in vivo* su topi e avendo come bersaglio il gene del Fattore IX della coagulazione che risultava alla fine mutato in una significativa percentuale di cellule e quindi i tempi della coagulazione risultavano allungati (Kren *et al.*, 1998). Questi risultati aprono alla speranza di correggere i difetti genetici non solo ereditari ma anche quelli presenti nei geni delle cellule tumorali (oncogeni [v. ONCOGENI E PROTONCOGENI**]) avviando così una nuova terapia dei tumori.

Un altro potenziale uso degli oligonucleotidi è quello di interferire con l'attività delle proteine. È noto infatti che a seguito della trasformazione cancerosa di una cellula alcune proteine sono iperespresse. L'obiettivo è quello di trovare oligonucleotidi che interagiscano in maniera specifica con queste proteine inibendone l'attività proliferativa (aptameri). Questa linea di ricerca è attivamente perseguita.

Ribozimi

Alcune molecole naturali di RNA hanno attività catalitica: sono cioè in grado di tagliare in punti precisi altre molecole di RNA o sé stesse. Tali molecole sono state chiamate *ribozimi* dalla unione dei termini ribonucleotidi + enzimi. La specificità dell'azione catalitica è determinata dalla capacità del ribozima di appaiarsi con i nucleotidi vicino al sito di taglio nell'RNA bersaglio e dalla conformazione che il ribozima assume in vicinanza del sito di taglio. Con queste premesse possono essere costruiti ribozimi artificiali capaci di adattarsi e quindi di tagliare qualsiasi RNA bersaglio, considerato che il sito di taglio non richiede sequenze particolarmente complesse. Se in particolare quest'ultimo è un RNA messaggero di una proteina indesiderata, la sua degradazione riduce o al limite abolisce completamente la proteina nella cellula.

Si possono costruire due tipi di ribozimi: il primo è definito a «testa di martello» e il secondo «a forcina», a seconda della forma che essi hanno (fig. 10). In ambedue i casi una porzione di questi ribozimi può essere modellata con una sequenza tale da adattarsi alla sequenza bersaglio contenente il sito di taglio. Il ribozima si comporta come un vero e proprio enzima e quindi può essere riciclato (fig. 11).

Essendo i ribozimi molecole di RNA, essi possono essere prodotti direttamente mediante trascrizione all'interno della

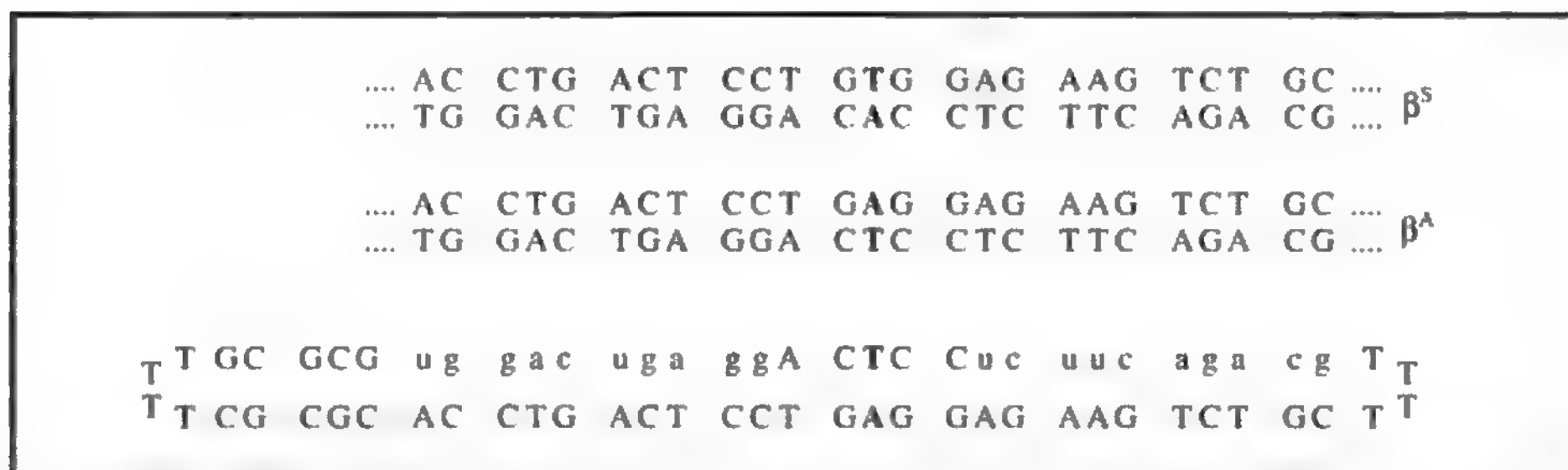


Fig. 9. Sequenza del tratto di DNA corrispondente al gene mutato della β -globina che causa l'anemia falciforme (β^S) e del tratto normale (β^A). In neretto è riportato il sito della mutazione. In basso è riportata la sequenza dell'oligonucleotide circolare misto DNA-RNA contenente la sequenza normale che per ricombinazione omologa corregge la sequenza mutata nelle cellule linfoblastoidi dell'individuo affetto da anemia falciforme. In maiuscolo sono riportate le sequenze di DNA, in minuscolo quelle dei tratti di RNA. I tratti di RNA hanno un metile che protegge l'ossidrilico in posizione 2'. Le linee verticali rappresentano i legami idrogeno Crick e Watson.

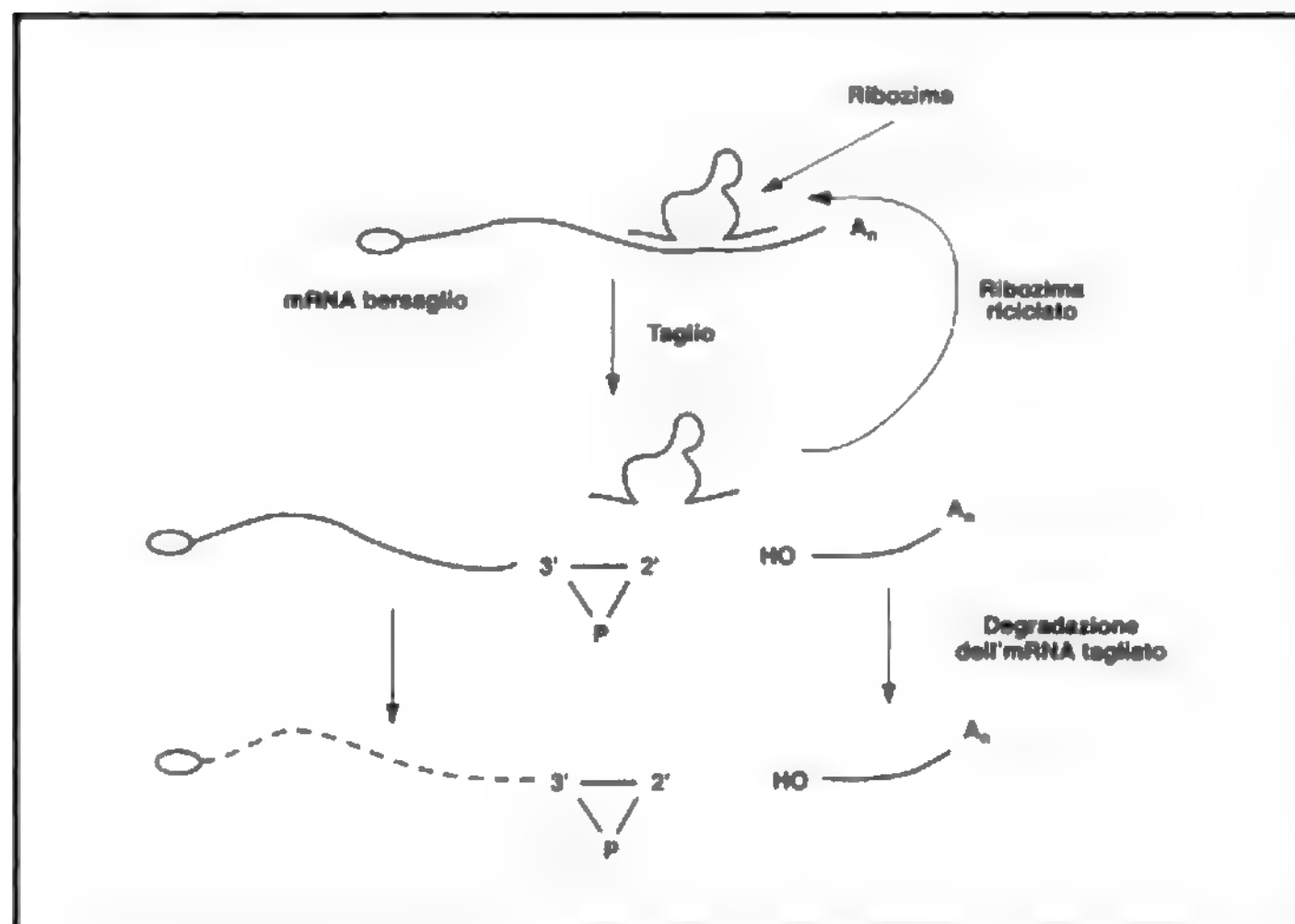


Fig. 11. Il meccanismo di azione di un ribozima. Il ribozima trascritto nella cellula si lega con la sua sequenza complementare all'RNA messaggero bersaglio e lo taglia. L'RNA messaggero tagliato va incontro successivamente ad una ulteriore degradazione da parte delle ribonucleasi endogene. Il ribozima viene riciclato per tagliare ulteriori molecole di RNA messaggero specifico. Il fosfato terminale in 3' fa un estere ciclico con gli ossidrili in 2' e 3'.

gonucleotidi nelle cellule, non sufficientemente alta stabilità delle triple *in vivo*, alto costo degli oligonucleotidi) i risultati finora conseguiti fanno ragionevolmente sperare in una futura applicazione terapeutica della strategia antigene, almeno in alcuni casi favorevoli. Speranze più concrete si hanno per l'uso dei ribozimi.

Bibliografia

Cohen, J. S., *Towards a new chemotherapy: oligodeoxynucleotide analogues as informational drugs*, in Huber B. E. ed., *Cancer*

therapy in the twenty-first century, Vol. I, *Molecular & Immunological Approaches*, 1994, Futura Publishing Co., Mount Kisco.
Cole Strauss A. et al., *Science*, 1996, **273**, 1386-1389.
Couture L. A., Sincheomb D. T., *Trends in Genetics*, 1996, **12**, 510-515.
Frank-Kamenetski M. D., Mirkin S. M., *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 65-95.
Kren B. T. et al., *Nature Medicine*, 1998, **4**, 285-290.
Seaggiante B. et al., *FEBS Letters*, 1994, **352**, 380-384.
Thuong N. T., Hélène C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, **32**, 606-690.

FRANCO QUADRIFOGLIO

OBESITÀ [v. vol. X, coll. 1349-1392; Agg. I, coll. *5497-5502]

SOMMARIO

ETIOPATOGENESI. NOTE DI CLINICA E TERAPIA

col. 4085

Definizione e classificazione (col. 4085). - **Etiopatogenesi. Basi genetiche dell'obesità** (col. 4086). - **Assunzione di calorie**. - **Consumo energetico**. - **Evoluzione clinica** (col. 4088). - **Terapia e prevenzione** (col. 4088).

TERAPIA CHIRURGICA DELL'OBESITÀ GRAVE

col. 4090

Introduzione (col. 4090). - **Indicazioni** (col. 4092). - **Procedimenti chirurgici** (col. 4092): *Bypass digiuno-ileale*. - *Bypass gastrico*. - *Bendaggio gastrico*. - *Gastroplastica verticale anellata*. - *Diversione biliopancreatica*. - **Risultati della chirurgia** (col. 4100). - **Conclusioni** (col. 4102).

ETIOPATOGENESI. NOTE DI CLINICA E TERAPIA

Definizione e classificazione

L'obesità [o.] è una condizione eterogenea caratterizzata da un aumento della quantità di tessuto adiposo o più in generale del grasso corporeo, che è associata ad aumentata morbilità e mortalità. Tale situazione si può realizzare attraverso un aumento del volume delle cellule adipose (*o. ipertrofica*) o mediante un incremento del numero degli adipociti (*o. iperplastica*). Di solito l'*o. iperplastica* si verifica nel bambino e nell'adolescente a causa di un aumento da tre a cinque volte del numero delle cellule adipose. Invece la forma ipertrofica è tipica dell'età adulta e della gravidanza ed è dovuta ad una maggiore deposizione di lipidi all'interno dell'adipocita. Nelle forme estreme di *o.* esiste un aumento sia del numero che del volume delle cellule adipose (*o. mista*).

L'avvento di tecniche sofisticate, quali la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN), ha permesso un'ulteriore classificazione dell'*o.* sulla base della topografia del grasso corporeo. Infatti, l'accumulo del grasso può verificarsi a livello addominale e/o mediastinico realizzando la cosiddetta *o. viscerale* o può interessare la

regione gluteo-femorale nell'*o. sottocutanea*. Studi epidemiologici controllati hanno attribuito alla forma viscerale una maggiore morbilità e mortalità rispetto a quella sottocutanea.

La mancanza di mezzi idonei alla misurazione della quantità di grasso corporeo ha reso difficile per diverso tempo la valutazione quantitativa e comparativa dell'*o.* Inizialmente, i limiti di peso corporeo fissati dalle compagnie di assicurazione americane (*Metropolitan Life Insurance Company*) sulla base dei livelli di mortalità verificatisi tra gli assicurati negli Stati Uniti hanno costituito gli unici valori di riferimento. Solo recentemente le maggiori organizzazioni sanitarie hanno riconosciuto all'*indice di Quetelet* o di massa corporea (BMI = *Body Mass Index*) la validità di indicatore della quantità di grasso (v. anche: **COMPOSIZIONE CORPOREA****). Il BMI, che è il rapporto tra peso corporeo in chilogrammi e il quadrato dell'altezza in metri (kg/m^2), viene pertanto attualmente utilizzato per quantificare l'*o.* Ad esempio, l'Organizzazione mondiale della Sanità (WHO = *World Health Organization*) ha definito il «cut-off» tra normale peso corporeo e *o.* il valore di BMI pari a 30. Una posizione analoga è stata presa dai partecipanti alla Conferenza Italiana sull'*o.* tenutasi a Roma nell'aprile 1991.

Studi epidemiologici hanno indicato che soprattutto nei paesi industrializzati l'*o.* è una condizione frequente ed in aumento. Ad es., negli Stati Uniti il 24% degli uomini e il 27% delle donne sono obesi. Una prevalenza simile è stata riscontrata anche in studi effettuati in Italia. Inoltre, la frequenza di *o.* è raddoppiata in questo secolo. Nei paesi suddetti l'*o.* è presente maggiormente nelle minoranze etniche e nei ceti socioeconomici più bassi. La frequenza del disordine aumenta con l'età soprattutto nelle donne, fino ad arrivare a valori superiori al 60% nelle donne afro-americane di età compresa tra 45 e 75 anni.

Etiopatogenesi. Basi genetiche dell'obesità

L'*o.* è considerata in maniera semplicistica il risultato di una eccessiva alimentazione e/o di uno stile di vita sedentario. Per tale motivo questa condizione è spesso stigmatizzata e ritenuta tipica dei «ghiottoni» e/o di individui con problemi psicologici o alterato comportamento alimentare.

Invece le ricerche più recenti hanno dimostrato che l'entità del grasso corporeo viene determinata da una complessa interazione di fattori *genetici* e *ambientali*, che attraverso la mediazione di stimoli nervosi, ormonali e metabolici, sono deputati al mantenimento dell'omeostasi energetica dell'individuo. L'alterazione del *bilancio energetico*, cioè del rapporto tra assunzione di calorie e loro consumo, determina lo sviluppo dell'o.

Assunzione di calorie

L'eccessiva assunzione o introito di calorie (*iperalimentazione*) è la causa principale ed essenziale per lo sviluppo di o. È noto che l'individuo obeso consuma una grande quantità di cibo in breve tempo con grande difficoltà ad interrompere il pasto. La palatabilità e varietà del cibo, la disponibilità di nutrienti ad alto contenuto di grassi e i condizionamenti derivanti dalla pubblicità di alimenti ipercalorici, così come fattori sociali, culturali e psicologici contribuiscono all'insorgenza di tale condizione. L'importanza etiologica di tali fattori è dimostrata, tra l'altro, dall'osservazione che i giapponesi emigrati in California hanno una tendenza a divenire obesi 2-3 volte maggiore rispetto ai loro connazionali che vivono in Giappone.

Tuttavia, studi epidemiologici controllati indicano che sia il numero delle cellule adipose che la distribuzione del grasso corporeo sono determinati geneticamente. Infatti, l'aumento del numero delle cellule adipose è irreversibile e non viene corretto neanche dal trattamento più aggressivo. È pertanto ipotizzabile che l'influenza o *predisposizione genetica* venga attenuata o esacerbata dall'azione di fattori ambientali con conseguente sviluppo di un fenotipo eterogeneo caratterizzato da diverse modalità di distribuzione del grasso corporeo.

Consumo energetico

Il consumo energetico, che comprende quello basale o a riposo, quello indotto dall'esercizio fisico, dagli alimenti e dalla termogenesi, ha una notevole importanza nello sviluppo dell'o. Infatti, tale condizione è maggiormente presente in individui con occupazione di tipo sedentario. Inoltre, la diffusione e l'abuso dei mezzi di trasporto, dei comandi a distanza e dei *computers* ha ridotto notevolmente il consumo energetico dell'individuo.

Tuttavia, anche il consumo energetico ha un'importante componente genetica. Sebbene i dati disponibili siano limitati, appare verosimile che il genotipo sia responsabile delle differenze individuali in una proporzione maggiore del 40%. Inoltre, studi longitudinali hanno dimostrato che individui con ridotto consumo energetico tendono ad accumulare una maggiore quantità di grasso.

Una recente scoperta ha costituito un importante progresso nella conoscenza dell'etiopatogenesi dell'o. È stato identificato il gene *ob* (*obese*) murino, localizzato a livello del cromosoma 6, la cui mutazione determina la comparsa di o. nel topo. Tale gene è responsabile della produzione di una proteina, denominata *leptina*, che regola l'assunzione e il consumo di calorie. La leptina è stata sintetizzata mediante la tecnica del DNA ricombinante e somministrata al topo mutante obeso. I risultati di tale sperimentazione sono stati spettacolari, poiché l'iniezione giornaliera intraperitoneale di leptina nel topo obeso ha determinato una diminuzione di circa il 50% del grasso corporeo dopo appena un mese di trattamento. Ciò si è verificato in conseguenza di una drastica diminuzione dell'assunzione di cibo e aumento dell'attività fisica.

Il gene *ob* è stato identificato anche nell'uomo a livello della cellula adiposa (Lönngqvist *et al.*, 1995). È stato pertanto ipotizzato che il suo prodotto, la leptina, sia l'ansa di

un *feedback* tra tessuto adiposo e una specifica zona del cervello deputata al controllo dell'introito di calorie e/o del consumo energetico. In altre parole, quando la quantità di grasso corporeo aumenta, il tessuto adiposo in eccesso produce una maggiore quantità di leptina che costituisce il segnale per il cervello, che a sua volta induce il soggetto a mangiare di meno e bruciare più calorie. Infatti è stata dimostrata una maggiore attività del gene *ob* nel tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale di individui obesi rispetto ai non obesi.

La conoscenza delle basi genetiche dell'o. è in evoluzione ed è prevedibile che nel prossimo futuro vengano individuati *markers* genetici che possano chiarire definitivamente l'origine di tale condizione.

Evoluzione clinica

L'o. costituisce una grave condizione di rischio per la salute dell'individuo. Infatti, il soggetto obeso presenta un'aumentata morbidità e mortalità rispetto alla popolazione generale. Ciò è dovuto anche a una maggiore incidenza negli uomini di carcinoma prostatico e del colon-retto, e nelle donne di carcinoma dell'utero, dell'ovaio e della mammella. Inoltre si possono verificare complicazioni meccaniche a carico dell'apparato respiratorio che sono responsabili della comparsa di insufficienza respiratoria globale.

L'o., soprattutto *viscerale*, si associa frequentemente a diabete, ipertensione ed iperlipidemia configurando la cosiddetta *sindrome X* (v. anche: ANGINA PECTORIS*, *481; ANGINA PECTORIS**, **334), che ha conseguenze catastrofiche sul sistema cardiovascolare, potendo determinare infarto del miocardio ed *ictus* cerebrale. La sindrome X viene iniziata da modificazioni metaboliche che si verificano in corso di o. Infatti, nell'individuo con o. *viscerale* è presente una lipolisi esagerata con conseguente maggiore disponibilità di acidi grassi che favoriscono lo sviluppo di iperglicemia (diabete). L'iperglicemia a sua volta stimola la secrezione di insulina, e la risultante iperinsulinemia determina l'insorgenza di ipertensione, poiché da un lato incrementa il riassorbimento renale di sodio e dall'altro aumenta la volemia e la gittata cardiaca mediante la stimolazione del sistema nervoso simpatico. Inoltre, l'iperinsulinemia e l'aumentata disponibilità di acidi grassi favoriscono lo sviluppo di iperlipemia mediante la stimolazione della sintesi epatica delle lipoproteine.

Terapia e prevenzione

L'elevata morbosità e mortalità legata all'o. rendono indispensabile il trattamento di tale condizione attraverso il raggiungimento di obiettivi terapeutici, quali la riduzione del grasso corporeo e la prevenzione di recidive. In tal modo, è possibile ottenere il miglioramento e/o la prevenzione delle complicazioni legate all'o.

Tali obiettivi possono essere perseguiti con mezzi *non farmacologici*, quali dieta ipocalorica, esercizio fisico e modificazioni del comportamento alimentare, soprattutto in individui con BMI compreso tra 30 e 35. Tuttavia, l'approccio dietetico e comportamentale, anche associato ad esercizio fisico, non è sufficiente a garantire una riduzione ponderale, per un periodo di tempo adeguato, nella maggior parte degli individui obesi. D'altra parte, esiste la dimostrazione che una diminuzione pari al 10% del peso corporeo possa determinare un miglioramento dei fattori di rischio vascolare (ipertensione, iperlipemia, intolleranza glicidica), comunemente associati all'o. Per questi motivi, esiste il razionale all'impiego di agenti farmacologici allo scopo di facilitare il raggiungimento e mantenimento del peso desiderabile negli individui obesi.

Il farmaco ideale per il trattamento dell'o. dovrebbe promuovere una diminuzione di peso proporzionale alla dose

impiegata, permettere all'individuo di mantenere l'obiettivo ponderale raggiunto, essere privo di rischi e non determinare assuefazione. Tuttavia, l'armamentario farmacologico attualmente disponibile risponde solo parzialmente a queste caratteristiche. Infatti, la farmacoterapia dell'o. comprende da un lato gli agenti *anoressizzanti*, che agiscono a livello cerebrale determinando una diminuzione dell'introito calorico, e dall'altro gli agenti *lipolitici*, che stimolano il consumo energetico, ma sono ancora in fase di sperimentazione.

Nell'ambito dei farmaci anoressizzanti (v. ANORESSICI FARMACI [v.; v.*]), non è consigliabile l'impiego dell'anfetamina e della fenmetrazina poiché causano assuefazione, mentre i derivati *feniletilaminici* (fenilpropanolamina) sono responsabili di fastidiosi effetti simpaticomimetici, come ansia, irritabilità, insonnia ed agitazione. Gli agonisti serotoninergici, quali la *dexfenfluramina*, l'isomero attivo della fenfluramina, e la *fluoxetina* (v. FLUOXETINA E ANALOGHI**) inducono una diminuzione dell'introito calorico attraverso una modificazione a livello ipotalamico del controllo serotoninergico dell'appetito. Solitamente non danno assuefazione anche se determinano frequentemente secchezza delle fauci, nausea e diarrea all'inizio del trattamento e più raramente sonnolenza, stordimento e depressione reattiva. Ciò ha determinato un largo impiego degli agonisti serotoninergici nella terapia farmacologica dell'o.

Tuttavia, la metanalisi degli studi controllati a medio termine ha dimostrato che la riduzione ponderale netta, determinata dalla dexfenfluramina, è modesta, dato che non supera i 4 kg di peso corporeo. Inoltre, facendo seguito a sporadiche segnalazioni, è stata resa nota un'indagine prospettica sul rapporto tra uso di anoressizzanti e una grave e letale malattia, l'*ipertensione arteriosa polmonare* (v.***) *primitiva* (Abenhaim *et al.*, 1996).

In particolare, è stato segnalato un aumentato rischio di sviluppare questa malattia in individui obesi in terapia con anoressizzanti (soprattutto dexfenfluramina) in modo continuativo e per un periodo superiore a tre mesi. Al tempo stesso, è stata notata una preoccupante associazione tra uso di dexfenfluramina e valvulopatia cardiaca, soprattutto aortica. Per tali motivi la dexfenfluramina è stata definitivamente ritirata dal commercio.

Due nuovi farmaci, la *sibutramina* e l'*orlistat*, saranno presto disponibili per l'impiego nella terapia dell'o. La sibutramina (Meridia®) inibisce la ricaptazione della noradrenalina e della serotonina e, pertanto, agisce su entrambi le componenti che regolano l'introito calorico. Dosi terapeutiche di sibutramina determinano una riduzione ponderale superiore a 5 kg dopo un periodo di trattamento di 6 mesi. I principali effetti collaterali sono rappresentati da stipsi, secchezza delle fauci e insonnia. Sebbene si siano verificate modeste diminuzioni della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca, in generale il farmaco è ben tollerato alle dosi comunemente impiegate (Ryan *et al.*, 1995).

L'*orlistat* (Xenical®) costituisce il capostipite di una nuova categoria di farmaci che hanno la capacità di inibire l'attività delle lipasi intestinali. Ne deriva un'incompleta digestione della maggior parte dei lipidi alimentari e, quindi, una riduzione di circa il 30% dell'assorbimento dei grassi ingeriti. Dato che l'azione dell'*orlistat* si esplica a livello intestinale, il farmaco non viene assorbito e, pertanto, non presenta effetti collaterali di tipo sistemico. L'*orlistat* viene somministrato in coincidenza con i pasti principali e la sua efficacia aumenta in associazione a una dieta moderatamente ipocalorica. In tal modo, si è ottenuta in studi controllati una riduzione significativa del peso corporeo in individui obesi dopo un anno di trattamento con *orlistat*, che è stata maggiore di circa 4 kg rispetto al placebo. Inoltre, i soggetti che

hanno continuato il trattamento per un altro anno, associato a una dieta di mantenimento, hanno presentato un lieve incremento ponderale, che è risultato la metà di quello osservato nel gruppo trattato con placebo (Davidson *et al.*, 1999; Hollander *et al.*, 1998). Inoltre, l'*orlistat* ha migliorato il profilo lipidico attraverso una diminuzione dell'assorbimento di colesterolo e trigliceridi alimentari (Sjöström *et al.*, 1998). Tuttavia, sono stati osservati un ridotto assorbimento di vitamine liposolubili e disturbi gastrointestinali correlati all'impiego del farmaco.

Il trattamento chirurgico, ma solo quello di bendaggio gastrico regolabile, che può essere effettuato per via laparoscopica in centri specializzati, è raccomandato nell'o. di grado elevato con BMI superiore a 40 (v. sotto: *terapia chirurgica dell'obesità grave*).

Tuttavia, nessuno di questi approcci terapeutici risulta attualmente efficace in modo risolutivo. Ciò è dimostrato dal fatto che circa il 30% della popolazione dei paesi economicamente sviluppati ha un peso superiore al 20% rispetto al peso corporeo ideale. Tale condizione determina un rischio di mortalità di circa il 20% maggiore rispetto al resto della popolazione. Inoltre, i costi sanitari per le complicazioni associate all'o., quali ipertensione, diabete ed iperlipemia, sono elevati. Pertanto l'o. può considerarsi una condizione ad elevato impatto sociale e come tale può essere prevenuta con strategie di intervento sulla popolazione. Queste comprendono: il controllo della promozione di prodotti alimentari ad alto contenuto di grassi e/o carboidrati; la limitazione nella vendita e la tassazione di alimenti ipercalorici; stimolazione dell'attività fisica; programmi di educazione alimentare. È auspicabile che l'attuazione di queste misure di tipo preventivo possa garantire una diminuzione della prevalenza di o. fino a quando non sarà disponibile un trattamento di tipo etiologico di questa condizione.

Bibliografia

- Abenhaim L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335** (9), 609.
 Björntorp P., Brodoff B. N., *Obesity*, 1992, Lippincott, Philadelphia.
 Crepaldi G. *et al.*, *International J. Obesity*, 1991, **15**, 781.
 Davidson M. H. *et al.*, *JAMA*, 1999, **281**, 235-242.
 Goldstein D. J., Potvin J. H., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1994, **60**, 647.
 Halaas J. L., *Science*, 1995, **269**, 543.
 Hollander P. A. *et al.*, *Diabetes Care*, 1998, **21**, 1288-1294.
 Lonnqvist F., *Nature Medicine*, 1995, **1**, 950.
 Ryan D. H. *et al.*, *Obes. Res.*, 1995, **3**, 553.
 Sjöström *et al.*, *Lancet*, 1998, **352**, 167.

GABRIELE PERRIELLO

TERAPIA CHIRURGICA DELL'OBESITÀ GRAVE

Introduzione

I primi interventi chirurgici per l'o. patologica risalgono a poco più di 25 anni, ma da molto meno possono essere eseguiti con una certa tranquillità e sicurezza di successo. È solo da quando si è cominciato a comprendere che l'o. non è tanto un problema estetico quanto una vera e propria malattia, che la *chirurgia bariatrica* (chirurgia dell'eccesso di peso corporeo) è stata vista nella sua reale dimensione, ossia come un efficace presidio terapeutico a cui si può ricorrere per migliorare la qualità di vita del paziente e per aumentarne l'attesa di vita.

L'o. è una condizione morbosa diffusa soprattutto nel mondo industrializzato, ma in aumento anche nei paesi cosiddetti sottosviluppati dell'Asia e dell'Africa. Essa interessa in modo prevalente il sesso femminile e gli strati socioeconomici più bassi. La sua etiologia non è stata ancora completamente chiarita, anche se è ormai scontata la presenza di fattori ereditari la cui importanza supera quella dei fattori non genetici (abitudini alimentari, vita sedentaria, problemi psicologici, etc. [v. sopra]).

Quando si può parlare di o.? Come già riferito nel capitolo precedente (v. sopra: *Etiopatogenesi. Note di clinica e terapia*), attualmente si utilizza per valutare l'eccesso del peso corporeo il BMI (*Body Mass Index*). Si possono così distinguere vari gradi di o.:

- o. di primo grado, con un BMI superiore a 30;
- o. grave, definita anche o. patologica, con un BMI superiore a 40;

— più recentemente è stata riconosciuta un'altra categoria denominata *superobesità*, con un BMI superiore a 50.

Quali sono i presupposti che giustificano l'intervento chirurgico nel trattamento dell'o. grave, tenuto conto del fatto che fino a non molti anni fa non solo era neppure lontanamente pensabile una chirurgia del sovrappeso, ma anzi l'obeso veniva sottoposto con riluttanza a qualunque trattamento chirurgico e solo se assolutamente necessario? L'intervento chirurgico si giustifica essenzialmente per due ordini di fattori: da un lato i deludenti risultati a distanza delle terapie incruente; dall'altro, i maggiori rischi di morbidità e mortalità ai quali è sottoposto l'obeso.

La quasi totalità delle indagini consegnate alla letteratura circa gli effetti della dieta, dell'esercizio fisico, della terapia farmacologica e della psicoterapia comportamentale (*behavioural therapy*) riguardano studi a breve termine con controlli non oltre l'anno, con una perdita di peso che non oltrepassa quasi mai 10 kg. Le poche ricerche a più lungo termine (5-10 anni) documentano un completo insuccesso nella grande maggioranza dei pazienti: dopo 4 anni una perdita inferiore al 30% dell'eccesso di peso in circa il 50% degli obesi; dopo 10 anni una perdita di 10-15 kg nella metà circa dei pazienti. Pertanto, la quantità di peso che nell'o. grave dovrebbe essere persa, e la perdita mantenuta, per ottenere un risultato tangibile va molto al di là di questi dati. Si può quindi ragionevolmente affermare che le modificazioni del comportamento alimentare associate alla terapia dietetica, per quanto valide teoricamente, non sono ancora in grado di influire in maniera sostanziale nell'o. grave. Forse la psicoterapia comportamentale potrebbe aumentare e mantenere i benefici a lungo termine ottenuti con la terapia chirurgica.

I risultati negativi della terapia dietetica sono documentati anche da un altro fenomeno. Infatti, recentemente è stato segnalato che il controllo del peso mediante terapia incruenta può provocare il cosiddetto fenomeno dello «yo-yo», ossia del *peso oscillante*: ad ogni riduzione dell'eccesso di peso fa seguito entro breve termine, dopo sospensione della terapia dietetica, un guadagno ponderale quasi sempre superiore al peso perduto, con conseguente ulteriore aumento dell'eccesso di peso. Il fenomeno del peso oscillante accentua il rischio dei processi morbosi associati all'o., in particolare di quelli cardiovascolari.

È ormai universalmente accettato che la grave o. aumenta, nel sesso maschile e in quello femminile, il rischio di morbidità e di mortalità. I dati pubblicati dalle compagnie di assicurazione statunitensi mostrano:

negli individui con peso superiore a 115 kg e di età inferiore ai 40 anni una mortalità doppia di quella della popolazione generale;

una mortalità che cresce in proporzione geometrica rispetto all'aumento di peso;

nella o. grave un significativo aumento dei sintomi invalidanti e un altrettanto significativo aumento della morbidità dopo interventi chirurgici sull'addome;

una maggiore incidenza di morti improvvise senza alcuna apparente emorragia;

una speranza di vita pari a quella della popolazione generale soltanto in un obeso su sette.

L'o. si associa frequentemente con l'ipertensione arte-

riosa, il diabete mellito non insulino dipendente (NIDDM), la cardiomiopatia ipertrofica, le artropatie degenerative, l'iperlipidemia, l'insufficienza respiratoria, l'apnea ostruttiva notturna (sindrome di Pickwick [v. PICKWICK, SINDROME DI: v.; v.**]), le difficoltà psico-sociali. Anche l'incidenza del carcinoma dell'endometrio, della mammella e del colon è più alta nei soggetti obesi, in particolare in quelli con distribuzione adiposa di tipo androide. Infatti, studi recenti hanno dimostrato che il rischio di mortalità è in rapporto con la distribuzione corporea della massa adiposa. Quest'ultima, come noto, tende ad avere una diversa distribuzione nei due sessi. Nell'uomo prevale il grasso addominale (o. androide); nella donna l'accumulo è maggiore nei glutei, nei fianchi e nelle cosce (o. ginoide).

Indicazioni

L'inefficacia a lungo termine della terapia incruenta e i pericoli delle oscillazioni ponderali (peso oscillante) nella terapia dietetica hanno contribuito ad allargare le *indicazioni all'intervento chirurgico* nell'o. patologica. I criteri classici che orientano verso la scelta chirurgica sono i seguenti:

- 1) esclusione delle o. dipendenti da disturbi endocrini (sindrome di Cushing, ipotiroidismo);
- 2) peso corporeo superiore del 100% o di 45 kg al peso corporeo ideale;
- 3) o. presente da almeno 5 anni;
- 4) insuccesso della terapia incruenta;
- 5) età inferiore ai 55 anni;
- 6) assenza di alcolismo e di disturbi psichiatrici gravi.

Attualmente i punti 3 e 4 non sono più strettamente vincolanti, poiché la terapia incruenta risulta inefficace a lungo termine in più del 95% degli obesi e contribuisce ad aggravare, per il fenomeno del peso oscillante, le patologie associate cardiovascolari e metaboliche. Anche l'età non è strettamente vincolante in quanto sono riportati in letteratura buoni risultati nei pazienti anziani. La presenza, infine, di patologie associate, lungi dal rappresentare una controindicazione all'intervento, costituisce un ulteriore motivo per l'orientamento chirurgico, poiché la riduzione permanente del peso corporeo è seguita costantemente da un miglioramento notevole della patologia associata all'o. Non esiste invece un orientamento univoco per quanto riguarda gli obesi con età inferiore ai 18 anni.

La scelta chirurgica (e il tipo di procedimento chirurgico) è motivata da una sostanziale e duratura riduzione del peso a seguito dell'intervento, da morbidità e mortalità molto basse, da una minima presenza di sequele a lungo termine.

Procedimenti chirurgici

La diminuzione del peso corporeo si realizza mediante una contrazione dell'apporto energetico che si può ottenere con diverse modalità.

- 1) Riduzione della superficie intestinale assorbente (malassorbimento): *bypass digiuno-ileale*.
- 2) Riduzione della capacità e dello svuotamento gastrici con limitazione alimentare (restrizione e partizione gastrica): *bypass gastrico*, *gastric banding*, *gastroplastica verticale*.
- 3) Riduzione dell'alimentazione da ridotta capacità gastrica e da maldigestione-malassorbimento intestinale: *diversione biliopancreatica*.

Bypass digiuno-ileale

Il *bypass digiuno-ileale* (fig. 1), di cui si conoscono numerose varianti, determina un marcato dimagrimento (> 80% del sovrappeso iniziale), però al prezzo della comparsa di

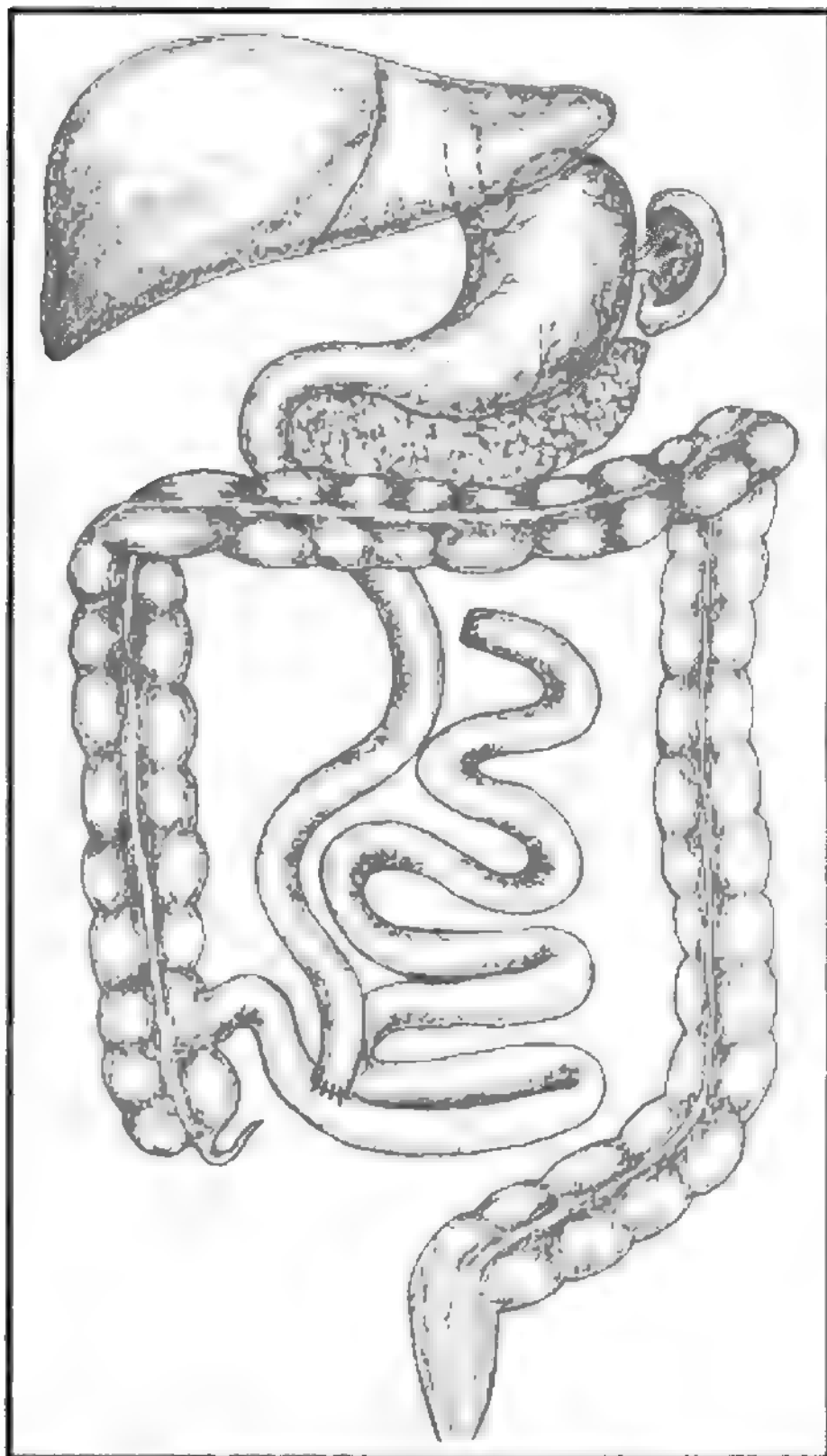


Fig. 1. *Bypass digiuno-ileale secondo Payne*: i primi 35 cm di digiuno vengono anastomizzati agli ultimi 10 cm dell'ileo. Si esclude così dal transito alimentare un lunghissimo tratto intestinale, la cui estremità prossimale viene chiusa a fondo cieco.

una sindrome da malassorbimento globale e massivo con frequenti e gravi complicanze: diarrea intensa, squilibri elettrolitici, malnutrizione proteica, deficit vitaminici, insufficienza epatica, colelitiasi, urolitiasi, sindrome dell'ansa cieca (v. VII, 2370), demineralizzazione ossea.

La mortalità operatoria non trascurabile (4%), la gravità delle complicanze che impongono frequenti ricoveri ospedalieri e la necessità in 1/4 degli operati di ripristinare chirurgicamente la situazione *quo ante*, giustificano ampiamente il completo abbandono del procedimento da parte di quasi tutti i chirurghi.

Bypass gastrico

Il *bypass gastrico* (fig. 2) consiste nel confezionamento con suturatrici meccaniche di un neoserbatoio gastrico prossimale di un volume di circa 30 ml, anastomizzato con un'ansa digiunale ad Y con un diametro dell'anastomosi di 10-12 mm. La riduzione della capacità gastrica e l'ostacolo allo

svuotamento dello stomaco per i cibi semisolidi determinano una precoce e durevole sensazione di sazietà con conseguente limitazione alimentare. A questa si aggiunge spesso una *dumping syndrome* (il precoce passaggio di contenuto gastrico nell'intestino attraverso l'anastomosi si accompagna a nausea, debolezza, sudorazione, palpitazioni, etc.) (v. XV, 997), con intolleranza per gli zuccheri e forse anche un diminuito assorbimento dei carboidrati provocato dall'esclusione duodenale.

Il calo ponderale è considerevole (60% del peso in eccesso), la mortalità operatoria contenuta, i problemi nutrizionali scarsi e facilmente correggibili. Sono descritte carenze di ferro, di folati, di vitamine del gruppo B, di elettroliti. Anche le complicanze postoperatorie sono rare: ulcera peptica anastomotica, esofagite da reflusso, perforazione gastrica precoce, vomito da stenosi dell'anastomosi, *dumping syndrome* marcata, deiscenza tardiva delle suture fra le due cavità gastriche.

I risultati relativamente soddisfacenti ottenuti con il *bypass gastrico* ne hanno fatto il procedimento più diffuso dopo la gastroplastica (v. sotto), specialmente fra i chirurghi nordamericani. Tuttavia, un inconveniente non di poco conto è rappresentato dal fatto che il *bypass gastrico* rende tutto lo stomaco distale al neoserbatoio inesplorabile sia endoscopicamente che radiologicamente; e ciò potrebbe costituire una grossa remora, soprattutto nei paesi dove il carcinoma dello stomaco è ancora abbastanza diffuso.

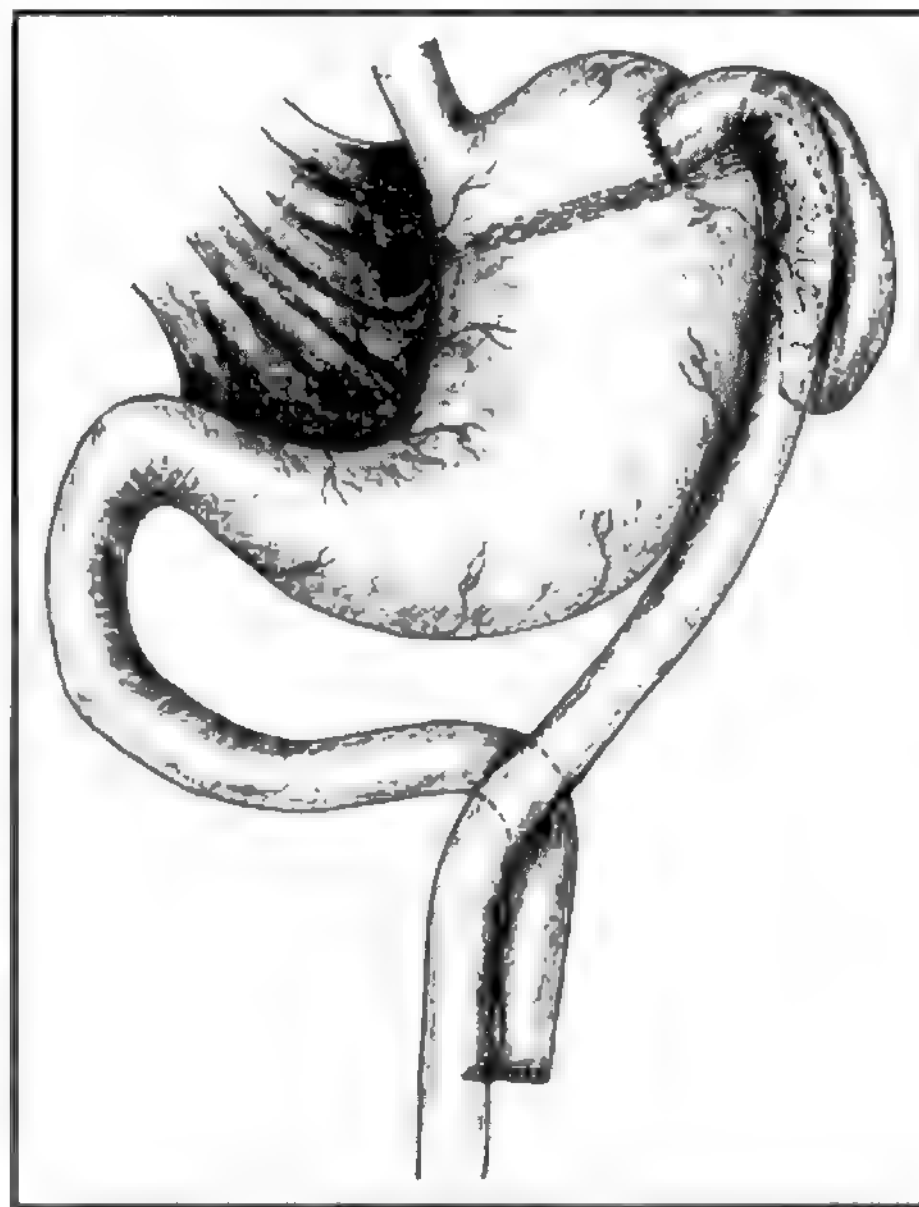


Fig. 2. *Bypass gastrico*: con una sutratrice lineare a 4 fili di sutura si crea una piccolissima tasca gastrica prossimale (30 ml) che comunica, mediante una anastomosi di 10-12 mm di diametro, con un'ansa digiunale montata ad Y (alla Roux). La grande cavità gastrica distale ed il duodeno sono esclusi dal transito alimentare.

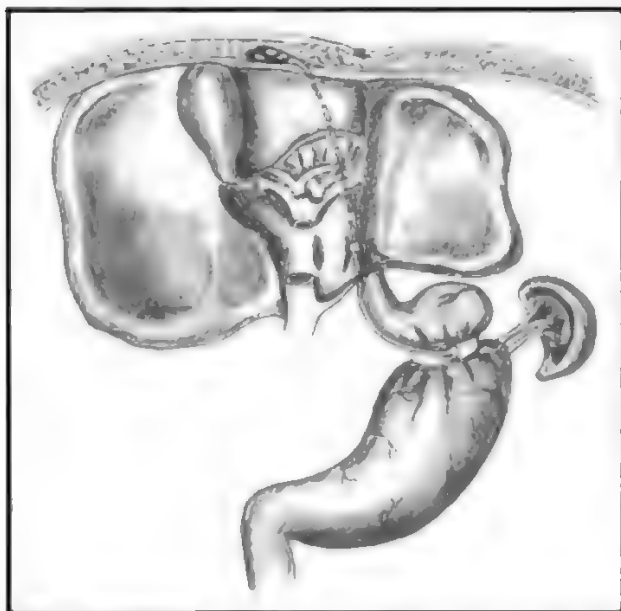


Fig. 3. Bendaggio gastrico: *Adjustable Silicone Gastric Banding* (ASGB). La restrizione e la partizione gastrica si realizzano mediante un anello di silicone che, posto a livello del fondo gastrico, crea una strozzatura calibrata dello stomaco sottocardiaco. Il diametro interno dell'anello di silicone (e quindi il diametro della strozzatura) è regolabile dall'esterno mediante l'iniezione percutanea in un serbatoio posto nello spessore del muscolo retto e collegato con un tubicino ad una camera circolare situata all'interno dell'anello.

Bendaggio gastrico

Il bendaggio gastrico (fig. 3) è senza dubbio, fra tutti gli interventi di restrizione gastrica, quello più semplice e meno invasivo, che non comporta né suture né sezioni dello stomaco ma soltanto il posizionamento di una benderella (di Marlex, Dacron, silicone, etc.) attorno alla parte più craniale del viscere. Si crea quindi una piccola cavità gastrica prossimale (< 30 ml) comunicante con lo stomaco distale attraverso uno stretto passaggio del diametro di 12 mm. La tecnica attualmente utilizzata è quella di Kurmak che ha ideato un band gonfiabile in silicone, collegato ad un reservoir posto in una tasca sottocutanea (ASGB: *Adjustable Silicone Gastric Banding*). In tal modo è possibile regolare nel postoperatorio, attraverso il serbatoio, il diametro della comunicazione fra le due porzioni di stomaco. In questi ultimi anni l'intervento è stato realizzato anche per via laparoscopica.

Buoni sono i risultati in termini di morbilità e di mortalità operatorie, così come quelli relativi alla perdita di peso. È però ancora alta l'incidenza dei reinterventi dovuti a scioglimento del bendaggio, stenosi dello stomaco, erosioni dello stomaco da parte del band, infezioni e perdita dal serbatoio. Queste sono in parte le ragioni per le quali questo intervento non si è ancora sufficientemente diffuso.

Gastroplastica verticale anellata

La *gastroplastica verticale anellata* è considerata oggi una delle procedure più efficaci nella terapia chirurgica dell'obesità e pertanto è la più largamente utilizzata. Essa consiste nella creazione di una neotasca gastrica di volume pari a 30-40 ml, comunicante con la grande cavità gastrica mediante un passaggio ristretto (neopiloro).

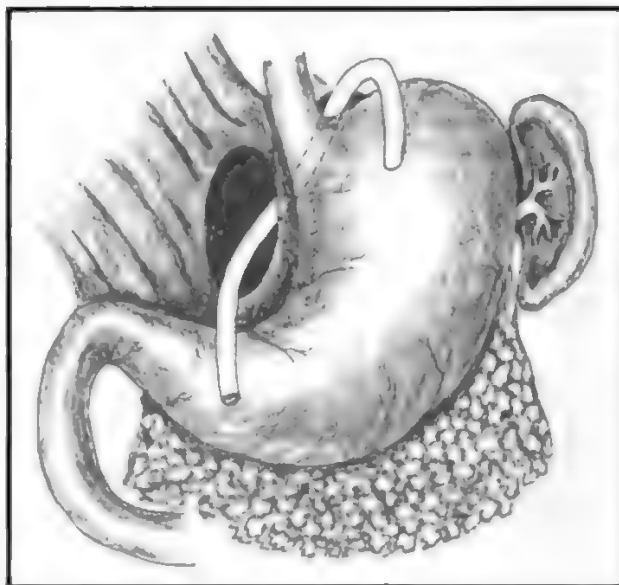


Fig. 4. Gastroplastica verticale (*vertical banded gastroplasty* secondo Mason; cfr. figg. 4-8). Apertura del ligamento gastroepatico: liberazione, per via smussa, di una piccola porzione di parete posteriore dello stomaco e del fondo gastrico juxtacardiaco (angolo di His).

I principali tempi dell'intervento sono i seguenti (figg. 4-8): isolamento attraverso il piccolo epiploon di una piccola porzione di fondo gastrico adiacente all'angolo di His; creazione, a circa 9 cm dalla giunzione esofago-gastrica e a 3 cm dalla piccola curva, di una finestra gastrica mediante

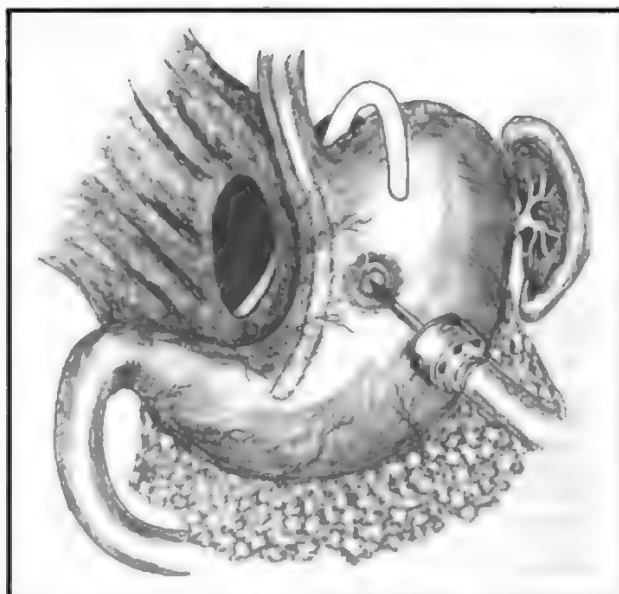


Fig. 5. Gastroplastica verticale. Introduzione nello stomaco (*per os*) di un catetere di diametro esterno di 11 mm, contemporaneamente, a 3 cm dalla piccola curva e a 9 cm dall'angolo di His, creazione di una finestra gastrica mediante suturatrice circolare (diametro 25 mm) attraverso la parete anteriore e posteriore dello stomaco.

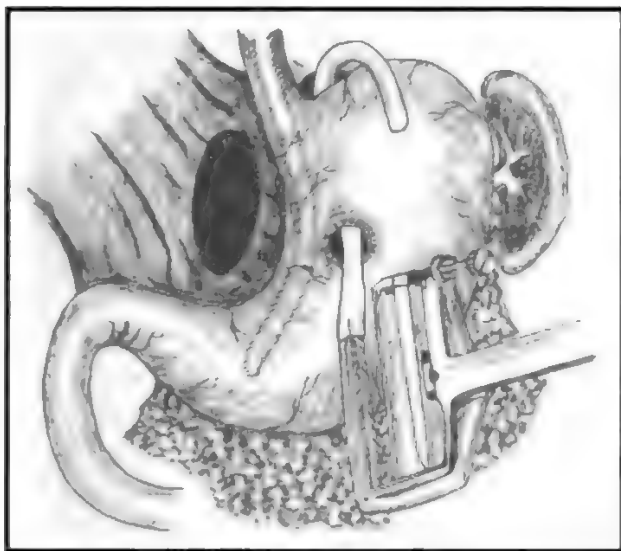


Fig. 6. Gastroplastica verticale. Introduzione, attraverso la finestra gastrica e sulla guida di un tubo di silicone, di una suturatrice lineare a 4 file di punti, fino all'angolo di His.

suturatrice circolare (diametro 25 mm); introduzione attraverso la finestra gastrica di una suturatrice lineare a 4 file di suture; partizione dello stomaco con la costituzione di una neocavità gastrica di 30-40 ml; calibratura del passaggio tra le due cavità gastriche mediante una benderella di materiale protesico, cosicché il neopiloro abbia un diametro di 11 mm.

In questi ultimi anni l'intervento è stato effettuato anche per via laparoscopica con la variante della separazione completa mediante suturatrice (endoGIA) tra la grande e

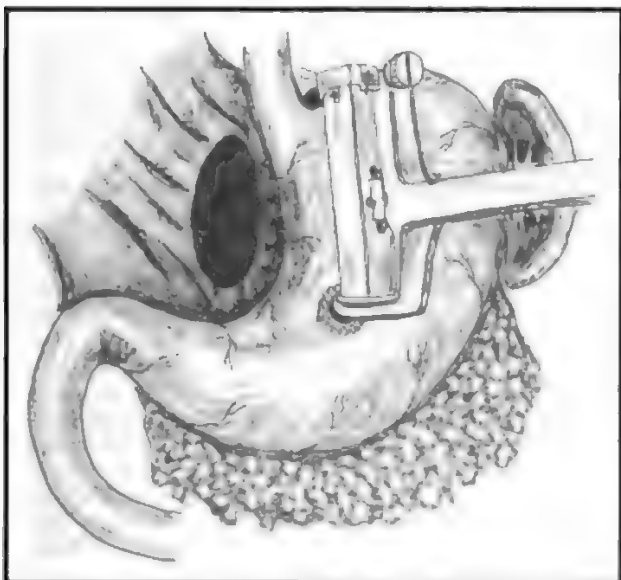


Fig. 7. Gastroplastica verticale. Chiusura della suturatrice lineare e partizione dello stomaco con la creazione di una neocavità gastrica di 30-40 ml.

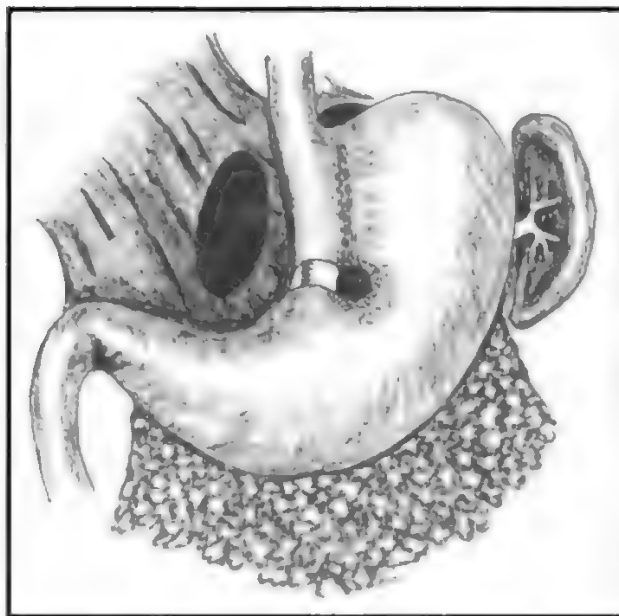


Fig. 8. Gastroplastica verticale. Calibratura su catetere gastrico, precedentemente introdotto, del passaggio tra le due cavità gastriche mediante una benderella di materiale protesico (Goretex®) in modo che il neopiloro abbia un diametro di 11 mm.

la piccola cavità gastrica, ma la casistica è ancora poco numerosa con un breve *follow-up*, per cui un giudizio definitivo su questo procedimento non è per ora possibile.

I risultati della gastroplastica verticale sono nel complesso più che soddisfacenti. In mani esperte la mortalità operatoria è accettabile (0,3%; nulla nella casistica personale di 320 pazienti). Anche le complicanze postoperatorie sono rare: la discesa gastrica precoce, la perforazione gastrica tardiva, le complicanze peptiche gastroesofagee, le emorragie, la stenosi del neopiloro, la dilatazione della *pouch* gastrica prossimale, la discesa parziale o totale delle linee di sutura verticali, la ripresa del peso, il vomito, la malnutrizione.

Per quanto riguarda il calo ponderale, i risultati sono nel complesso più che buoni. È difficile valutare il successo della chirurgia bariatrica, perché non esistono criteri standard, cosicché i risultati delle diverse casistiche non sono sempre comparabili. È opinione comune, però, che in termini di calo ponderale un obiettivo accettabile è la perdita almeno pari al 50% del peso in eccesso. A questo livello si evitano molti dei pericoli legati all'ob.

La maggior parte dei contributi consegnati alla letteratura documentano per la gastroplastica verticale una riduzione di peso pari al 50%-60% di quello originariamente in eccesso a 2-3 anni dall'intervento.

L'analisi della casistica personale mostra un residuo di sovrappeso pari al 33% di quello iniziale dopo 18 mesi dall'intervento, con un lieve recupero nei mesi successivi fino a raggiungere, dopo 36 mesi, il 44% del sovrappeso iniziale (fig. 9).

Una ulteriore analisi della casistica consente di suddividere i pazienti operati in 4 gruppi sulla base dei risultati ottenuti:

- 1) risultato *ottimo* (sovrappeso residuo = 1-20%): 15% dei pazienti;
- 2) risultato *buono* (sovrappeso residuo pari a 21-40%): 48% dei pazienti;

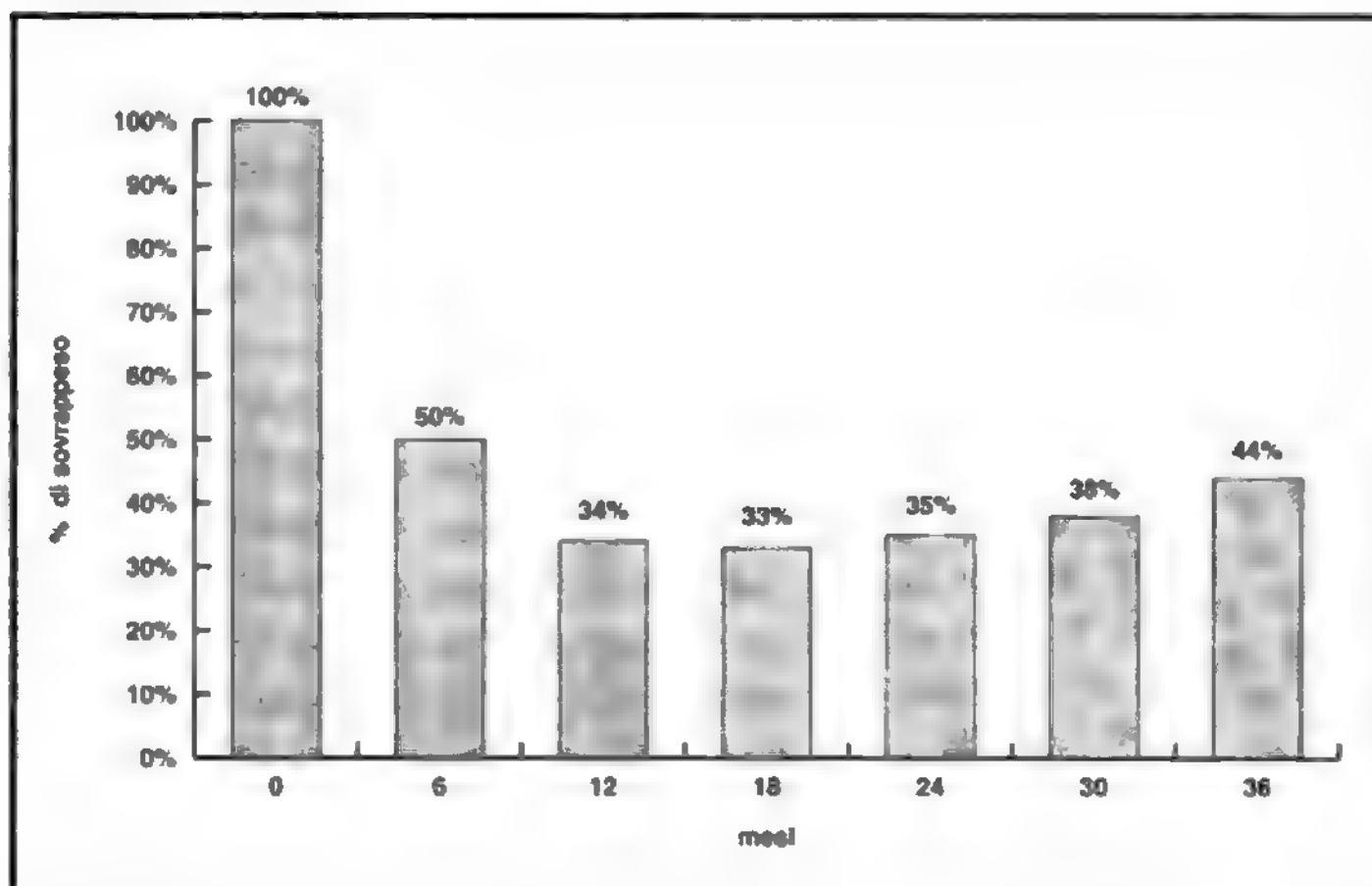


Fig. 9. Percentuale di sovrappeso residuo dopo gastroplastica verticale. (Osservazione personale).

3) risultato *mediocre* (sovrappeso residuo pari a 41-50%): 22% dei pazienti;

4) risultato *cattivo* (sovrappeso residuo > 50%): 15% dei pazienti.

I risultati non soddisfacenti riguardano innanzitutto i pazienti superobesi (BMI > 50) e quelli che, per motivi psicologici, non si sono adattati al nuovo regime alimentare che la gastroplastica impone.

È quindi opportuna, prima di porre l'indicazione operatoria alla gastroplastica verticale, una accurata valutazione psicologica preoperatoria allo scopo di selezionare fra i candidati a questa procedura solo quelli veramente disposti ad accettare questo tipo di intervento. Il paziente deve essere adeguatamente informato che l'obiettivo del dimagrimento sarà raggiunto con una drastica riduzione dell'introito alimentare e che la nuova situazione fisiopatologica creata dall'intervento altro non serve se non a facilitare il proposito e renderlo attuabile. Se il paziente non è psicologicamente disposto ad accettare le nuove regole alimentari, presto cercherà e troverà nuove alternative al proprio stato che necessariamente invalideranno i risultati sperati. Il paziente potrà, quindi, accorgersi che i cibi semisolidi a elevato contenuto calorico (ad es., la crema) non trovano alcun ostacolo, oppure imparare che può consolarsi con abnormi quantità di caramelle, cioccolatini e gelati. È come se scoprisse la fessura del salvadanaio o riconoscesse la chiave di una porta più piccola che permette ugualmente di entrare in casa. Può essere infine indotto ad ingerire, anche provando dolore, eccessive quantità di cibo con conseguente pericolo di cedimento delle suture della neotasca gastrica.

Interessante è a questo proposito ricordare gli studi che paragonano, in *trial* randomizzato prospettivo, i risultati della gastroplastica verticale e del *bypass* gastrico. I dati sono a favore di quest'ultimo, ma l'osservazione più interessante è quella che la maggior efficacia del *bypass* rispetto alla gastroplastica verticale si riferisce in particolare ai «sweet eaters» ovvero ai pazienti nei quali l'introito calorico è costituito in gran parte da zuccheri. Questi sono presto indotti dalla *dumping syndrome* conseguente al *bypass* gastrico ad astenersi dai cibi ad alto contenuto in carboidrati.

Diversione biliopancreatica

La *diversione biliopancreatica* consiste in una resezione gastrica con ricostruzione su una lunga ansa distale ad Y (250 cm). Su tale ansa viene a sua volta anastomizzata, a circa 50 cm dalla valvola ileo-cecale, l'ansa di tenue prossimale che reca le secrezioni bilio-pancreatiche (fig. 10). Nella nuova situazione anatomica il contenuto alimentare e le secrezioni biliari e pancreatiche percorrono due differenti segmenti intestinali e anziché incontrarsi a livello duodenale, per avere poi a disposizione tutto l'intestino per la digestione e l'assorbimento, si incontrano soltanto a 50 cm dalla valvola ileo-cecale. Tale notevole riduzione dello spazio e del tempo di contatto degli alimenti con gli enzimi digestivi comporta una maldigestione e quindi un malassorbimento.

Con la *diversione biliopancreatica* si può ottenere un ottimo calo ponderale, anche nei superobesi; a 5 anni dall'intervento la riduzione percentuale media del sovrappeso è su valori dell'80%. Si deve, però, ricordare che la *diversione biliopancreatica* offre difficoltà tecniche maggiori rispetto a quelle degli interventi di restrizione gastrica e pertanto più alte sono la mortalità e la morbidità operatoria.

Numerose sono le complicanze (malnutrizione proteica, diarrea intensa, anemia, demineralizzazione ossea, ulcera anastomotica, neuropatie, etc.), che richiedono più ricoveri ospedalieri e, in oltre il 10% dei casi, una revisione chirurgica per ridurre il malassorbimento, allungando il tratto di tenue comune (fino a 100-150 cm), o addirittura per ripristinare la continuità originale.

Per tutte queste ragioni, l'intervento di *diversione* non ha avuto una larga diffusione al di fuori dell'Italia. Esso viene comunemente riservato ai superobesi con enorme eccesso ponderale, a quelli in cui non sono risultati efficaci i procedimenti di partizione gastrica e a quelli nei quali non è indicata la gastroplastica verticale (*sweet eaters*).

Risultati della chirurgia

La perdita di peso dopo interventi sullo stomaco per l'o. patologica si realizza in massima parte nei primi 12 mesi, dopodiché tende a stabilizzarsi con una lieve tendenza al recupero ponderale nei mesi successivi. Dopo 2-3 anni dall'intervento la percentuale di sovrappeso residuo oscilla tra

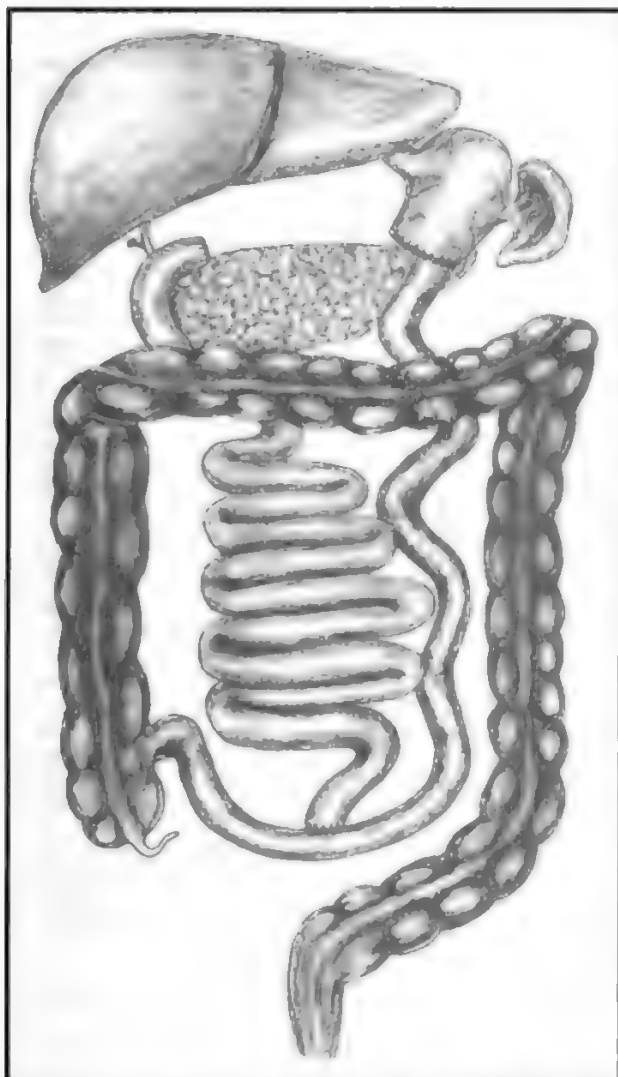


Fig. 10. Diversione biliopancreatica secondo Scopinaro. Ampia resezione gastrica distale e colecistectomia. Ricostruzione della continuità gastrointestinale su una lunga (250 cm) ansa distale a Y, sulla quale viene anastomizzata, a circa 50 cm dalla valvola ileocecale, l'ansa di tenue prossimale che reca le secrezioni biliopancreatiche.

il 30% ed il 40% del peso ideale. La riduzione postoperatoria del peso è più modesta (10%-20%) dopo gastroplastica verticale rispetto al *bypass* gastrico con ansa ad Y alla Roux; probabilmente perché in questo intervento si sommano gli effetti della restrizione gastrica con quelli di un lieve malassorbimento. I risultati meno soddisfacenti della gastroplastica si verificano in particolare nei superobesi (BMI > 50) e in quelli che, dopo l'intervento, non si attengono alle prescrizioni dietetiche ma si alimentano con grandi quantità di glicidi.

La gastroplastica verticale richiede un approccio multidisciplinare che coinvolge dietisti e psicologi, in quanto impone maggiori restrizioni del comportamento alimentare e richiede pertanto che siano individuati i pazienti che non vogliono sottostare alle regole alimentari. Questi pazienti rappresentano il 15-20% di tutti gli obesi candidati all'intervento e comprendono anche i superobesi. In questi pa-

zienti è preferibile ricorrere al *bypass* gastrico o alla diversione biliopancreatica, pur tenendo presenti gli inconvenienti poc'anzi descritti a cui potranno andare incontro gli operati, soprattutto quelli sottoposti alla diversione.

Nella grande maggioranza dei casi (80-85%) l'intervento di scelta dovrebbe essere la gastroplastica verticale anelata, perché è un procedimento più semplice e quindi è gravato da minore morbidità e mortalità, preserva la continuità gastroduodenale, consente l'esplorazione diagnostica della restante cavità gastrica, evita i rischi della deficienza nutrizionale e della *dumping syndrome*, ha un minor numero di complicanze tardive. Tra queste ultime, oltre alle rare deficienze micro- e macronutrizionali, va ricordato il vomito, nella maggioranza dei casi legato ad un abnorme comportamento alimentare e a instabilità emotiva e solo raramente sostenuto da lesioni organiche (ad es., stenosi del neopiloro) che richiedono l'indagine endoscopica ed eventualmente il reintervento.

In questi ultimi anni numerosi lavori hanno focalizzato gli effetti a lungo termine degli interventi bariatrici sulle condizioni di salute degli obesi e sulle modificazioni delle patologie associate all'o. In particolare si è indagato se esistono rapporti di causa ed effetto tra perdita di peso ed il controllo delle malattie legate all'o. Si è visto così che dopo (2-3 anni) *bypass* gastrico o gastroplastica verticale le patologie associate scompaiono o migliorano nella grande maggioranza dei casi: il diabete mellito non insulino-dipendente e l'alterata tolleranza al glicoso (90% dei casi); l'ipertensione arteriosa (65%); l'ispessimento del ventricolo sinistro e del setto interventricolare si riducono, con miglioramento della funzione ventricolare; aumentano le lipoproteine ad alta densità e diminuiscono il colesterolo totale e i trigliceridi; migliorano i parametri della funzionalità respiratoria (aumento della Pa_{O_2} , e diminuzione della Pa_{CO_2}); si riducono le apnee notturne (*sleep apnea*) e l'ipoventilazione polmonare; diminuisce la pressione dell'arteria polmonare; migliorano la funzione muscolo-scheletrica e le artropatie degenerative.

Conclusioni

Le malattie legate alla grave o, costituiscono un grosso rischio per la salute di una larga maggioranza di pazienti. Tutti quelli con o. marcata che sono gravati da una seria co-morbidità e quelli che si sono sottoposti senza successo a terapie mediche e comportamentali per la riduzione del peso dovrebbero essere considerati candidati all'intervento chirurgico, consistente nella gastroplastica verticale o in via subordinata nel *bypass* gastrico o nella diversione biliopancreatica (superobesi con BMI superiore a 50, soggetti con alterato comportamento alimentare, psichicamente instabili).

L'indicazione chirurgica non può prescindere da un approccio multidisciplinare (medico, nutrizionale, comportamentale). L'intervento chirurgico gravato da una accettabile morbidità e da una bassissima mortalità (0,3% circa) induce una notevole riduzione dell'eccesso di peso che si mantiene in maniera soddisfacente nel tempo (5 anni). La diminuzione del peso, a sua volta, è responsabile del controllo o del miglioramento delle gravi condizioni morbose legate all'o. È auspicabile che ulteriori indagini nei pazienti sottoposti a terapia chirurgica per grave o, possano confermare che il controllo ponderale è in grado a lungo termine di migliorare anche la speranza di vita degli obesi.

Bibliografia

- Ashley S., Bird D. L., Sugden G., Royston C. M. S., *Brit. J. Surg.*, 1993, 80, 1421.
- Benotti P. N., Forse R. A., *Am. J. Surg.*, 1995, 169, 361.

- Brolin R. E., Robertson L. B., Kenler H. A., Cody R. P., *Ann. Surg.*, 1994, 220, 782.
 Charuzi I., Paretz L., Peiser J., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55, 594.
 Colditz G. A., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55, 503.
 Conti A., *Arch. Soc. It. Chir.*, 1994, 1, 8.
 Cowan G. S. M., *Obesity Surg.*, 1992, 2, 169.
 Doldi S. B., *Arch. Soc. It. Chir.*, 1992, 6, 25.
 Foley E. F., Benotti P. N., Borlase B., *Am. J. Surg.*, 1992, 163, 294.
 Gleysteen J. J., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55, 591.
 Hess D. W., Hess D. S., *Obesity Surg.*, 1994, 4, 44.
 Kral G. J., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55, 552.
 Mac Gregor A. M. L., Rand C., *Arch. Surg.*, 1993, 128, 1153.
 MacLean L. B., Rhode B. M., Sampalis J., *Am. J. Surg.*, 1993, 165, 155.
 Morino F., Toppino M., Fronda G. et al., *Obesity Surg.*, 1992, 2, 69.
 Morino M., Toppino M., Garrone C., Morino F., *Brit. J. Surg.*, 1994, 81, 1169.
 Poirer W. J., Swanson M. S., Mac Donald K. G., Long S. B., *Ann. Surg.*, 1995, 222, 339.
 Sagar P. M., *Brit. J. Surg.*, 1995, 82, 732.
 Salmon P. A., *Obesity Surg.*, 1993, 3, 391.
 Scopinaro N., Giannetta F., Friedman D. et al., *Arch. Soc. It. Chir.*, 1992, 6, 39.
 Sjöström L., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1992, 55, 516.
 Smith C. D., Behms K. E., Herkes S. B. et al., *Ann. Surg.*, 1993, 218, 207.

ANGELO CONTI

OCCHIO [v. vol. X, coll. 1392-1423; Agg. I, coll. *5502-5508]

SOMMARIO GENERALE

ANESTESIA IN OCULISTICA	col. 4103
IL TRAPIANTO IN OFTALMOLOGIA	col. 4110

ANESTESIA IN OCULISTICA

SOMMARIO

Introduzione (col. 4103). - **Anestesia retrobulbare** (col. 4105). - **Anestesia peribulbare** (col. 4105). - **Anestesia topica** (col. 4107): **Tecnica**. - **Vantaggi**. - **Svantaggi e controindicazioni**. - **Complicanze**. - **Anestesia sottotenoniana** (col. 4109): **Vantaggi**. - **Svantaggi**.

Introduzione

Gli interventi di oftalmochirurgia interessano non solo i piani cutanei, ma anche quelli profondi muscolari ed endorbitari. Raramente si rende necessario un intervento sul piano osseo. Al di fuori di quest'ultimo caso, la maggior parte degli interventi può essere effettuata in anestesia loco-regionale, sia pure in stretta collaborazione con l'anestesista. Ciò è molto importante soprattutto per il tipo di paziente che in genere necessita di questi interventi: soggetti anziani, affetti da turbe metaboliche, cardiache e respiratorie.

L'impiego dell'anestesia locale facilita da un lato la routine operatoria, mentre dall'altro incide meno sulle condizioni generali del paziente (v. anche: **ANESTESIA CHIRURGICA** [v. v.*; v.**]). Occorre però notare che fino ad alcuni anni fa una limitazione notevole era data dalla breve durata dell'anestesia rispetto al tempo piuttosto lungo spesso necessario per effettuare gli interventi. Questa limitazione è stata superata dall'introduzione e dalla diffusione nella pratica clinica della mepivacaina (Carbocaina®) e della bupivacaina (Marcaina®) (tab. I; v. **ANESTETICI, anestetici locali** [v.*; v.**]). Altra limitazione può essere legata alla imbibizione locale dei tessuti, che ostacola una perfetta individuazione dei piani chirurgici, anche se ne facilita lo scollamento. A questo secondo inconveniente si può ovviare con l'esecuzione dei blocchi tronculari associati tra di loro, minimizzando, quando necessita, l'infiltrazione loco-regionale.

Lo sviluppo e il perfezionamento di farmaci e delle tecniche ha contribuito all'ampia diffusione dell'impiego del-

TAB. I. ANESTETICI LOCALI COMUNEMENTE UTILIZZATI IN OCULISTICA

Farmaco	Proprietà principali e modalità di impiego
Cocaina	Troppo tossica per essere utilizzata in altro modo che non sia l'uso per applicazioni topiche, come soluzione al 2-4% per indurre anestesia durante chirurgia oculare
Procaina	Praticamente priva di effetto se applicata topicamente, è efficacissima quando venga usata per l'anestesia infiltrativa o per i blocchi nervosi. Ha una breve durata d'azione, perché viene biotrasformata rapidamente, il che spiega anche la sua bassa tossicità. Comunemente vengono utilizzate soluzioni allo 0,25-1%; non si deve mai superare la dose di 1000 mg/kg
Tetracaina	È circa 10 volte più potente della procaina, sia per la sua azione anestetica sia per la sua tossicità sistemica. Può essere utilizzata per anestesia topica, infiltrativa, regionale
Lidocaina	È l'anestetico locale più usato in tutto il mondo, per la sua potenza intrinseca, per la sua capacità di penetrazione, rapidità di azione ed efficacia. Per i blocchi nervosi periferici spesso è sufficiente una soluzione all'1-1,5% per produrre un buon blocco motorio; sono utilizzabili anche soluzioni al 2-4%. Sembra che sia la più frequente causa di «allergia ad anestetici locali»
Mepivacaina	Strutturalmente correlata alla lidocaina, con la quale condivide la modalità di azione, ha nel complesso una durata di azione lievemente maggiore, che può essere ulteriormente aumentata con l'aggiunta di adrenalina
Bupivacaina	Circa 4 volte più potente e più tossica della lidocaina, ha uno sviluppo d'azione lento (da 5 a 20 min), ma una durata d'azione da 4 a 6 h. Si lega moltissimo alle proteine plasmatiche (90%). Si usa in soluzioni allo 0,25-0,75%, e la dose massima non deve superare i 150 mg
Ropivacaina	È un farmaco a lunga durata d'azione in corso di studio

l'anestesia in oculistica e alla diminuzione delle complicanze e degli effetti collaterali. L'etiopatogenesi di queste complicanze è da ricercarsi in fattori anatomici e fisiologici, su cui deve convergere la nostra attenzione per trasformare l'anestesia locale in una tecnica sicura, priva di complicazioni.

La chirurgia della cataratta (v. v.*; v.**), ad es., può essere condotta in anestesia locale o generale, ma la prima metodica è di più largo impiego, per la scarsa percentuale di rischi ad essa associata (Khurana et al., 1994). L'anestesia locale, infatti, ha sicuramente dei vantaggi: non provoca gravi alterazioni metaboliche e sistemiche, come confusione post-operatoria, ipotensione posturale e vomito (Hodgkins et al., 1992).

I requisiti fondamentali richiesti all'anestesia locale per condurre con successo l'intervento di cataratta sono rappresentati da: acinesia orbicolare, acinesia oculare, anestesia del globo e dell'orbita, ipotensione oculare.

Con l'impiego dell'anestesia locale è stato possibile il confronto con il post-operatorio, a differenza di quanto avviene per l'anestesia generale.

Gli svantaggi dell'anestesia locale rispetto a quella generale sono il minor controllo dell'acinesia, dell'ipotonia e dell'analgesia (Hachet et al., 1987).

Per quanto riguarda l'anestesia generale, i farmaci dispo-

nibili e le tecniche in uso, i vantaggi e i rischi e quant'altro concerne questo argomento si rinvia il lettore alla voce ANESTESIA CHIRURGICA (v.; v.*; v.**). La presente voce espone le principali notizie relative all'impiego dell'anestesia loco-regionale in oculistica. In questo campo possiamo distinguere i seguenti tipi di anestesia: *anestesia retrobulbare*, *anestesia peribulbare*, *anestesia topica*, *anestesia sottoteniana*.

Anestesia retrobulbare

L'iniezione retrobulbare di sostanze anestetiche provoca l'acinesia dei muscoli estrinseci dell'o., bloccando il III, il IV e il V nervo cranico, e l'anestesia della congiuntiva, della cornea e dell'uvea, bloccando i nervi ciliari. Questi effetti dell'anestesia retrobulbare, combinati con l'acinesia del muscolo orbicolare, consentono di eseguire la maggior parte degli interventi oculistici, in particolare quelli sulla cornea, camera anteriore e cristallino.

Sono sufficienti 2-4 ml di anestetico locale: si può scegliere qualunque agente, ma molti optano per una combinazione di bupivacaina e di lidocaina.

L'esecuzione del blocco retrobulbare può produrre ansietà e dolore al paziente, che possono essere ridotti al minimo da una premedicazione con 25-50 mg di idrossizina idrocloruro (Atarax®) 1 h prima dell'intervento.

Nella tab. II sono riassunte le varie tecniche per questo tipo di anestesia.

Tra le complicanze si annoverano: perforazione del bulbo; emorragia retrobulbare (la complicanza più frequente, rilevabile nell'1-2% dei casi); atrofia ottica ed occlusione vascolare retinica; iniezione dell'anestetico a livello delle guaine del nervo ottico e sua diffusione nel S.N.C.; riflesso oculocardiaco (che può portare a bradicardia, aritmie ed anche ad asistolia); ptosi; acinesia palpebrale; ematoma retrobulbare (ad etiologia traumatica; rappresenta una controindicazione al proseguimento dell'intervento [Motolese *et al.*, 1994]); diplopia transitoria; emorragie vitreali (per debolezza congenita della parete dei neo-vasi [Labelle *et al.*, 1996]); perdita di coscienza (Mandelcorn *et al.*, 1996); reazioni allergiche (rare).

Anestesia peribulbare

Questa tecnica, che dall'A. che la introdusse (Kelman, 1967) fu descritta come un'iniezione retrobulbare modificata, ha come elemento innovativo l'iniezione dell'anestetico al di fuori del cono muscolare e rappresenta oggi la

TAB. II. TECNICHE E CARATTERISTICHE DELL'ANESTESIA RETROBULBARE

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi
(Van Lint, 1914) Blocco distale delle fibre del nervo faciale a livello del bordo laterale dell'orbita	Paralisi immediata e completa del muscolo orbicolare	Rigonfiamento e distorsione palpebrale. Dolore durante l'esecuzione. Cattiva cinesia dell'orbicolare
(Havener, 1974) Tecnica di Van Lint modificata	L'ago viene introdotto una sola volta	
(O'Brien, 1964) Blocco di conduzione prossimale del nervo faciale all'altezza del condilo mandibolare	Semplice esecuzione nei soggetti magri. Non provoca rigonfiamento	Negli obesi può essere difficile trovare il punto di reperi. Dolore post-operatorio all'atto della masticazione. Paralisi totale o parziale
(Nadbath e Rehman, 1963) Blocco prossimale totale del nervo faciale	Esordio rapido. Poco traumatizzante. Non provoca rigonfiamento peri-orbitario. Richiede scarsa quantità di anestetico	Punto di reperi difficile da individuare
(Spaeth, 1976) Simile alla Nadbath. Blocco di conduzione prossimale del nervo faciale prima della sua divisione	Blocco dopo circa 30 sec	
(Atkinson, 1961) Blocco distale del nervo faciale	Punto di reperi di facile individuazione. Richiede poco anestetico	Stessi rischi della O'Brien. Dolore e possibilità di danneggiare i vasi pre-auricolari

metodica più utilizzata negli interventi a carico del segmento anteriore. Essa si pone come alternativa più valida all'anestesia retrobulbare (Zahl e Meltzer, 1990). In questi ultimi anni il suo impiego si è diffuso, particolarmente negli

TAB. III. TECNICA E CARATTERISTICHE DELL'ANESTESIA PERIBULBARE

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Complicanze
Iniezione di 5 ml di bupivacaina 0,5%, mepivacaina 3% e 0,5 ml di una fiala di ialuronidasi 300 U.I., all'unione del 1/3 laterale con i 2/3 mediali della palpebra inferiore, sopra il bordo orbitario, fino a oltrepassare l'equatore bulbare. Iniezione di altra soluzione anestetica (1 ml) per bloccare l'attività del muscolo orbicolare. Avere una pressione intraoculare e una pressione vitreale bassa è auspicabile ed è stata dimostrata l'efficacia della compressione oculare (Constable <i>et al.</i> , 1993; Ropo <i>et al.</i> , 1990).	Scarsa reazione dolorosa iniziale. Riabilitazione rapida nel post-operatorio, in quanto l'acinesia è circoscritta al m. orbicolare. Si evita la formazione di ematoma.	Ritardo con cui si raggiunge l'anestesia (Pirazzoli, 1993).	Echimosi palpebrale (Khurana <i>et al.</i> , 1994), che può essere evitata se l'approccio avviene tramite i fornici congiuntivali. Diplopie verticali. Amaurosi nel 5% dei casi (Davies e Mandel, 1990). Emorragie retrobulbari. Ptosi persistente (0-13%). Rara la perforazione della sclera. Danni evitabili al S.N.C. (Ropo <i>et al.</i> , 1990).

Stati Uniti, perché a parità d'effetto riduce i rischi (in particolare, la lesione del nervo ottico) rispetto all'anestesia retrobulbare e assicura un buon controllo della spinta vitreale. Essa richiede una tecnica perfetta ed il rispetto delle dosi e del tempo di azione (tab. III).

Anestesia topica

In questi ultimi anni è stata proposta una nuova tecnica anestesiológica che utilizza soltanto anestetici per via topica nella chirurgia del segmento anteriore e in particolar modo nella chirurgia della cataratta eseguita con la tecnica di faciemulsificazione (v. CATARATTA [v. 1°; v. 2°]; Fichman e Grabow, 1992; Williamson e Shimizu, 1993). Recentemente l'anestesia topica è stata citata come un'alternativa possibile all'anestesia retro- e peribulbare (Strobel e Hühnerman, 1996). È adatta per interventi di breve durata, in casi non complicati e con pazienti in grado di collaborare. È una tecnica sicura e, da sola o in combinazione, può essere usata per tutte le necessità di anestesia locale durante un intervento intraoculare. In alcuni casi, l'anestesia topica è stata associata all'immissione di spugnette imbevute di anestetico, posizionate nel fornice congiuntivale superiore ed inferiore circa mezz'ora prima dell'intervento. Essa si avvale solo di colliri anestetici, anche se il farmaco ideale per l'anestesia topica non è ancora stato definito.

Tecnica

1. *Anestesia della cornea.* - Si realizza in 1-2 min con l'instillazione di colliri: ossibuprocaina (benoxinato) 0,4% (novesina) (durata dell'effetto: 10 min, moderatamente epiteliotossica); tetracaina 0,5-2% (durata: 10-20 min, epiteliotossica); proparacaina (prossimetacaina) 0,5% (durata: 10-25 min, epiteliotossica); cocaina 1-4% (durata: 10 min, altamente epiteliotossica, midriatica, proptotica, vasocostrittore, ipotensiva, eccitante); lidocaina 4% in monodose; in alternativa, lidocaina 4% per 30-60 min prima dell'intervento con blocco Van Lint e successivamente cloridato di lidocaina 2%, per attenuare gli spasmi dell'orbicolare (Abdel-Khalek e Refaat, 1995).

Si richiedono instillazioni ripetute, ma non eccessive, pena la perdita dell'effetto analgesico, la chiusura delle palpebre, la possibile disepitelizzazione dell'epitelio corneale causa di riduzione della visibilità delle strutture sottostanti. L'occhio controlaterale va mantenuto aperto.

2. *Anestesia della congiuntiva bulbare.* - L'innervazione congiuntivale è duplice. Una zona perilimbare, larga circa 3 mm, è tributaria dei nervi ciliari; al di là di questa fascia, i nervi palpebrali provvedono all'innervazione della congiuntiva tramite i rami congiuntivali. Pertanto, per anestetizzare tutta la congiuntiva occorrerebbe combinare all'instillazione, sufficiente per l'area perilimbare, l'infiltrazione sottocongiuntivale (Scassellati *et al.*, 1992). Rosenthal (1995) ha introdotto una nuova tecnica utilizzando un batuffolo di cotone o di spugna impregnato di lidocaina 4% inserito nei fornici congiuntivali, contemporaneamente all'instillazione di tetracaina, previa somministrazione intravenosa di midazolam: l'effetto è una rapida anestesia, paragonabile a quello ottenuto con l'anestesia peribulbare o retrobulbare. Inoltre, è disponibile una tecnica combinata di iniezione sottocapsulare paracorneale e anestesia topica (Pallan *et al.*, 1995): 5 min prima dell'intervento si instillano tetracaina 0,5 e bupivacaina 0,75%; successivamente, si iniettano lentamente lidocaina 2% e adrenalina nello spazio subcongiuntivale; al termine dell'atto operatorio si iniettano, tobramicina, desametasone e pilocarpina 1%, con trattamento antibiotico prolungato per qualche giorno.

Vantaggi

L'anestesia topica permette la riabilitazione del paziente in tempi più brevi con un vantaggio estetico eccellente (Manners e Burton, 1996). Gli altri vantaggi sono: assenza dei rischi legati all'iniezione para- e retrobulbare, analgesia paragonabile a quella ottenuta con le altre tecniche, assenza di acinesia postoperatoria ed infine, assenza di emorragia o

congestione congiuntivale e di ptosi postoperatoria precoce.

Inoltre, con questo tipo di anestesia viene eliminato il fenomeno di Bell, ovvero il fastidioso meccanismo che, contemporaneamente alla contrazione dell'orbicolare palpebrale, fa ruotare superiormente il bulbo (v. FACCIALE NERVO, VI, 622, fig. 7).

Recentemente Sebastiani *et al.* (1994), sulla base dei risultati ottenuti dall'impiego dell'anestesia topica in 170 interventi di cataratta con faciemulsificazione o di trabeculectomia, hanno effettuato una valutazione dei vantaggi di questo tipo di anestesia rispetto all'anestesia tradizionale. I vantaggi sono essenzialmente legati all'assenza di complicanze dovute all'anestesia tradizionale e ad errori di tecnica, ptosi, diplopia indotta, parestesie da blocco del facciale periferico o da lesioni del nervo, interruzione della visione. A questo proposito si deve sottolineare che nel caso dell'anestesia topica il recupero visivo è pressoché immediato, non appena cessa l'abbagliamento da luce del microscopio operatorio, con enorme vantaggio psicologico per il paziente, che oltretutto non necessita di un bendaggio oculativo.

Ultimo ma non meno importante aspetto è il decorso postoperatorio che si ha con l'utilizzo di questo tipo di anestesia: la rapida ripresa delle funzioni potrebbe permettere un ricovero in regime di *day-hospital* con notevole risparmio di costi sociali.

Svantaggi e controindicazioni

L'anestesia topica necessita di una buona collaborazione da parte del paziente, proprio perché si è in presenza di movimenti volontari e involontari del bulbo, dovuti all'acinesia incompleta indotta dall'anestesia.

Un altro svantaggio dell'anestesia topica può essere rappresentato dalle sensazioni del paziente di avvertire un corpo estraneo e dalla lacrimazione riflessa dell'occhio controlaterale ed è per questo motivo che è consigliato instillare l'anestetico anche nell'occhio adelfo, nonché evitarne il bendaggio.

Questo tipo di anestesia è controindicato nel caso di patologie oculari caratterizzate da disturbo della fissazione (cataratta densa, maculopatie, patologie dei muscoli extraoculari), che non consentono al paziente di fissare bene la luce del microscopio operatorio, per cui l'occhio tenderà a muoversi durante l'intervento. In questi casi può essere utile associare all'anestesia topica quella sottotenoniana.

Altre controindicazioni sono rappresentate da pazienti particolarmente ansiosi ed emotivi che potrebbero lasciarsi prendere dal panico e rendere sicuramente più difficile l'intervento con movimenti inconsulti dell'occhio.

Gli aspetti più controversi relativi all'anestesia topica sono correlabili all'insorgenza di complicanze intraoperatorie.

Complicanze

Tutti gli effetti secondari all'agente topico sono dose dipendenti (Maurice e Singh, 1985): quello principale è il rallentamento della guarigione del difetto epiteliale causato da inibizione della divisione e della migrazione cellulare. Questa tossicità non permette una somministrazione prolungata e/o ripetuta a causa dell'effetto cumulativo.

Durante l'intervento, disidratazione e trauma della cornea possono essere minimizzati, prevenendo la desquamazione dell'epitelio.

La cocaina è nota per la sua tossicità corneale e per la desquamazione dell'epitelio corneale che produce. Questi effetti possono essere osservati se le precauzioni non sono state attuate rigorosamente: in particolare, la reazione al-

lergica a questo agente anestetico non è rara (Richard e Wilson, 1992).

Le complicanze sistemiche sono limitate all'uso della cocaina.

Anestesia sottotenoniana

Rappresenta una nuova metodica di anestesia locale molto utile, più facile, più sicura ed efficace di altre tecniche (anestesia retrobulbare e peribulbare) (Bergman *et al.*, 1993). Ne è stata, tuttavia, limitata la diffusione dal fatto che questa tecnica prevedeva l'uso di un ago cannula metallico, con il pericolo di perforare un bulbo miopico stafilomatoso, evento raro ma disastroso. Altro inconveniente è anche l'uso consigliato di dosaggi particolari (non più di 1,5-2 cc), nonché di una miscela equivalente di bupivacaina (5 mg/ml) e lidocaina (20 mg/ml) o solo lidocaina. Questa grande quantità di liquido iniettato a livello parabulbare può portare ad edema e chemosi congiuntivale rendendo l'intervento notevolmente più difficoltoso per l'operatore. Utilizzando, però, la cannula flessibile di Greenbaum, per la chirurgia del segmento anteriore, si sono ottenuti buoni risultati sia in termini di anestesia, sia in termini di ridotta incidenza di complicanze intraoperatorie (Aleman, 1996). La nostra esperienza tende a farci utilizzare unicamente una cannula rigida d'irrigazione, smussa.

Vantaggi

L'anestesia sottotenoniana presenta i seguenti vantaggi: facilita il passaggio verso tecniche chirurgiche che possono utilizzare l'anestesia topica; elimina il pericolo di perforazione del bulbo oculare, complicanza specifica dell'anestesia retro e/o peribulbare; riduce il rischio di insorgenza di emorragia retrobulbare; consente un minor rischio anestesiológico in pazienti in terapia anticoagulante; diminuisce la possibilità di danni alla muscolatura oculare estrinseca; riduce la quantità di anestetico necessaria all'intervento chirurgico; riduce l'esigenza di blocco del nervo faciale o di sedazione del paziente; rende in molti casi non necessario il blocco secondo Van Lint e O'Brein del faciale e delle palpebre (utilizzo di adeguati blefarostati); rende possibili chirurgie associate (ad es., chirurgia filtrante del glaucoma); rende possibile affrontare i casi di miosi serrata, che in caso di anestesia topica comportano un disagio eccessivo per il paziente (utilizzazione degli uncini di Gresauber).

Svantaggi

Il più significativo è l'emorragia sottocongiuntivale, che si verifica nel quadrante utilizzato e può tendere a propagarsi. È un inconveniente unicamente di tipo estetico, che può essere sgradevole per il paziente e perdurare per qualche giorno (a volte anche 7-10 giorni).

Bibliografia

- Abdel-Khalek M. N., Refaat R. F., *Eur. J. Implant. Refract. Surg.*, 1995, 7, 338-341.
 Aleman L., *World Atlas series di Chirurgia Oftalmica. Progress e nuove acquisizioni in Oftalmologia*. Ed. Italiana, Highlights of Ophthalmology, 1996, 1.
 Atkinson W. S., *Am. J. Ophthalmol.*, 1961, 1, 51.
 Bucci M. G. *et al.*, *Anestetici locali*, in Donego F., Orzalesi N., *Farmacologia oculare*, 1998, UTET, Torino, pp. 35-46.
 Constable P. H., Porter E. J. B., *Eye*, 1993, 7, 731.
 Davis D. B., Mandel M. R., *J. Cataract. Refract. Surg.*, 1990, 16, 527.
 Fichman H. L., Grabow R., *Am. J. Ophthalmol.*, 1992, 101, 688.
 Hachet E., Parant J. M., Hekler G. *et al.*, *Bull. Soc. Ophthalmol. France*, 1987, 87, 129-135.
 Hodgkins P. R., Luff A. J., Morrel A. J. *et al.*, *Br. J. Ophthalmol.*, 1992, 76, 323.
 Kelman C. D., *Am. J. Ophthalmol.*, 1967, 64, 23.
 Khurana A. K., Sachdeva R. K., Gomber K. K., Ahluwalia B. K., *Acta Ophthalmol.*, 1994, 72, 727.

- Labelle P. F., Lapoint A., Boucher M. C., *Can. J. Ophthalmol.*, 1996, 31, 21-24.
 Mandelcorn M. S., Ananthanarayan C., Cole D., Rolbin S. H., *Can. J. Ophthalmol.*, 1996, 31, 24-26.
 Manners T. D., Burton R. L., *Royal College of Ophthalmologists*, 1996, 10, 367.
 Maurice D. M., Singh T., *Am. J. Ophthalmol.*, 1985, 99, 691.
 Motolese E., Addabbo G., D'Aniello B., *Boll. Ocul.*, 1994, 73 (2), 331.
 Nadbath R. P., Rehman I., *Am. J. Ophthalmol.*, 1963, 55, 143.
 O'Brien H. D., *Am. J. Ophthalmol.*, 1964, 57, 751.
 Pirazzoli G., *Boll. Ocul.*, 1993, 2, 289.
 Richard P., Wilson M. D., *International Ophthalmology Clinics. Complication of ocular surgery*, 1992, 4, 1.
 Ropo A., Ruusuvaara P., Paloheimo M. *et al.*, *Arch. Ophthalmol.*, 1990, 68, 227.
 Rosenthal K. J., *J. Cataract. Refract. Surg.*, 1995, 21, 499-503.
 Scassellati M. *et al.*, *Am. J. Ophthalmol.*, 1992, 3, 44.
 Sebastiani F., Guffi S., Camoli A. M. *et al.*, *Boll. Ocul.*, 1994, 73, Suppl. 6, 63-69.
 Strobel J., Hünnerman M., *Arch. Ophthalmol.*, 1995, 6, 52.
 Williamson N., Shimizu R., *Am. J. Ophthalmol.*, 1993, 2, 74.
 Zahl K., Meltzer M., *Anestesia regionale per la chirurgia intraoculare. Oftalmologia clinica del Nord America*, 1990, Verduci Ed., Roma, p. 105.

RAFFAEL NUZZI E CRISTINA FAVRO

IL TRAPIANTO IN OFTALMOLOGIA

SOMMARIO

Introduzione (col. 4110). - **Trapianto di occhio in toto** (col. 4111). - **Trapianto di retina in toto** (col. 4111). - **Trapianto di cellule dell'epitelio pigmentato retinico** (col. 4111). - **Trapianto intraretinico di retina** (col. 4111). - **Trapianti sperimentali di retina** (col. 4112). - **Trapianto di nervo ottico** (col. 4112). - **Trapianto di sclera** (col. 4112).

Introduzione

Le strutture oculari suscettibili di trapianto sono: la cornea, la sclera, l'iride, la retina e il nervo ottico.

La tecnica del trapianto ha fornito notevolissimi risultati per quanto riguarda la cornea (v. CHERATOPLASTICA [v.; v.*; v.**]); perché, priva di vascolarizzazione, questa parte è da considerarsi un «sito privilegiato» e il trapianto di cornea è l'unico che attecchisca alloplasticamente.

Molto diverso è il discorso riguardante il trapianto di retina: essendo un tessuto del S.N.C., data la sua derivazione embriologica dal neuroectoderma, presenta le stesse difficoltà rigenerative (Blair *et al.*, 1990).

Anni di ricerca hanno dimostrato che non è tanto la struttura nervosa incapace a rigenerare, ma l'ambiente circostante sfavorevole che non crea le condizioni adatte all'attecchimento: tale considerazione ha riacceso le speranze di ricercatori e chirurghi. Analizzando attentamente le strutture che creano l'ambiente in cui si trova la retina troviamo: il corpo vitreo, l'epitelio pigmentato, il coriocapillare, la Membrana di Bruch.

L'integrità, l'efficienza metabolica e funzionale e la corretta disposizione anatomica di tali strutture si sono rivelate d'importanza fondamentale per un funzionamento corretto della retina stessa. Si può presumere quindi che siano altrettanto fondamentali nell'attecchimento di un trapianto.

Vi sono diversi approcci al trapianto di retina, non tanto per quanto riguarda la tecnica chirurgica, che pur presenta particolari difficoltà, quanto per il tipo di tessuto trapiantato, che rimangono ancora nell'ambito della sperimentazione e precisamente il trapianto di occhio *in toto*, il trapianto di retina *in toto*, il trapianto di cellule dell'epitelio pigmentato retinico, il trapianto di retina intraretinico.

L'età, sia dell'ospite che del donatore, si è rivelata fondamentale per l'attecchimento del trapianto. Sono stati utilizzati modelli sperimentali molto vari: il tessuto donato è stato prelevato da embrioni, neonati e adulti (Del Cerro *et al.*, 1985). Per quanto riguarda i donatori adulti alcuni AA.

hanno osservato una rapida necrosi della retina trapiantata e segni di infiammazione intraoculare (Aramant e Turner, 1988); altri hanno riportato una lunga sopravvivenza del trapianto senza particolari reazioni dell'ospite.

Certamente vi è un declino graduale del tempo di sopravvivenza del trapianto con l'aumento dell'età del donatore, risultando più idonea la retina embrionale rispetto a quella matura. Probabilmente una certa importanza è rivestita anche da una «massa critica» di cellule trapiantate che non deve essere inferiore ad un certo valore (Del Cerro, 1989).

Riguardo alle condizioni dell'ospite, è fondamentale la sua capacità di formare connessioni sinaptiche con il tessuto trapiantato (Bebe *et al.*, 1979); questa caratteristica è influenzata fortemente dalla presenza di fattori di crescita nei tessuti che accolgono il trapianto.

Trapianto di occhio *in toto*

Il trapianto di occhi interi di embrione in camera anteriore di animali adulti ha permesso di mantenere intatti i rapporti tra retina e strutture adiacenti, mostrando un maggior grado di differenziazione e di sviluppo della retina (Klassen *et al.*, 1994). È stato proposto l'utilizzo di conigli, anziché di topi, perché pur mostrando una maggior reattività immunologica, i conigli presentano una camera anteriore di dimensioni maggiori, quindi più facilmente accessibile e visibile.

Trapianto di retina *in toto*

Nel 1959 fu effettuato il primo trapianto di retina su animale (Royo e Quay, 1959): un lembo di retina fetale di topo venne trapiantato nella camera anteriore dell'occhio materno, con un discreto successo; il tessuto infatti attecchì e migrò, stabilendo delle connessioni vascolari, lungo il residuo dell'arteria ialoidea fino alla testa del nervo ottico.

Successivamente si provò a trapiantare lembi di retina di differenti gradi di maturità (fetale, neonatale) in camera vitrea, anche in animali non consanguinei (Del Cerro, 1986; Del Cerro, 1987; Del Cerro, 1989).

Trapianto di cellule dell'epitelio pigmentato retinico

Questo trapianto è stato effettuato in topi con un deficit genico delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico che le rendeva incapaci di fagocitare il segmento esterno dei fotorecettori sofferenti (Fishman, 1988). Questi topi, selezionati presso il Royal College of Surgeons (RCS), sono stati largamente impiegati nella ricerca in tutto il mondo. Cellule dell'epitelio pigmentato retinico di topi sani sono state introdotte negli spazi sottoretinici in topi RCS con degenerazioni retiniche: molte di queste cellule hanno attecchito legandosi in maniera più o meno regolare alla membrana di Bruch, andando non solo ad aumentare il tempo di sopravvivenza dei fotorecettori, ma anche a stimolare la rigenerazione del segmento esterno dei fotorecettori sofferenti. La sopravvivenza di tale trapianto si mantiene stabile per un periodo che va dai due mesi all'anno.

Trapianto intraretinico di retina

Frammenti di tessuto retinico e cellule fetali o perinatali di retina sono state trapiantate sia in soggetti riceventi con retina sana, sia in riceventi con retina ampiamente danneggiata.

I trapianti effettuati su retina sana sono cresciuti e si sono differenziati in una struttura pluristratificata simile a quella della retina normale e sono sopravvissuti per almeno quattro settimane. Si è visto che si forma una certa continuità, a livello dello strato plessiforme, tra il tessuto trapiantato e quello del ricevente, tale osservazione istologica

indicherebbe la retina sana come un ambiente favorevole per lo sviluppo delle cellule retiniche immature (Turner e Blair, 1986; Ehinger *et al.*, 1988; Seiler *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda i trapianti effettuati su retina danneggiata sono stati usati fondamentalmente due tipi di ospiti: retina danneggiata da una continua esposizione a forti fonti di luce oppure danneggiata geneticamente mediante la mutazione di un gene *rd* che produce una degenerazione rapida e precoce dei bastoncelli e una più lenta dei coni associata ad una diminuzione del flusso ematico.

Anche in questo caso si è osservata una certa differenziazione del tessuto trapiantato, anche se più lenta rispetto a quella ottenuta nel trapianto su tessuto sano. Inoltre vi è una reazione gliale più compatta (Sidman *et al.*, 1965; Carter-Dawson *et al.*, 1978; Bellhorn *et al.*, 1980; Jiang e Del Cerro, 1989).

Trapianti sperimentali di retina

Una sorta di coltura *in situ* è rappresentata da modelli sperimentali in cui frammenti di retina fetale sono stati trapiantati in cervello di ratti neonati o adulti. Si è potuto ottenere in tal modo un riflesso pupillare alla luce, indice della formazione di connessioni nervose tra il trapianto e l'ospite (Klassen e Lund, 1990).

Trapianto di nervo ottico

In casi di sezioni del nervo ottico in mammiferi adulti, è stato trapiantato un segmento di nervo sciatico (Fukuda *et al.*, 1993) e si è visto che gli assoni delle cellule ganglionari della retina sono ricresciuti attraverso il trapianto ed hanno formato connessioni sinaptiche con cellule nervose a livello del collicolo superiore. Le connessioni sinaptiche si sono venute a creare grazie alla presenza delle cellule di Schwann che creano una via di conduzione per le fibre nervose. Inoltre è stato condotto uno studio su criceti adulti per dimostrare la possibilità della discriminazione tra luce e ombra in seguito a ricostruzione della via retino-collicolare mediante trapianto di nervo sciatico: alcuni degli animali trapiantati hanno dimostrato, con il loro comportamento, di discriminare la luce rispetto al buio.

Questo tipo di trapianto è stato effettuato anche nell'uomo ottenendo buoni risultati grazie all'utilizzo di NGF (*Nerve Growth Factor*).

Trapianto di sclera

Sono stati effettuati trapianti di sclera a livello corneale (Maurice e Singh, 1986): questi studi sono stati fatti su conigli sia trapiantando bottoni sclerali a tutto spessore, sia utilizzando lamelle di sclera.

Si è potuto notare che la sclera trapiantata in cornea subiva un processo di «rischiamento». Al microscopio elettronico si è visto che le fibre collagene della sclera si rompevano per lasciare spazio a fibrille più sottili proprie del tessuto corneale.

Bibliografia

- Aramant B., Turner J. E., *Dev. Brain Res.*, 1988, **41**, 303.
 Beebe B. K., Mellgrd K., Bjorklund A. *et al.*, *Brain Res.*, 1979, **167**, 391.
 Bellhorn R. W., Burns M. S., Benjamin J. V., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1980, **19**, 584.
 Blair J. R., Gaur V., Laedtke T. W. *et al.*, *Prog. Ret. Res.*, 1990, **10**, 69.
 Carter-Dawson L., La Vail M. M., Sidman R. L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1978, **17**, 489.
 Del Cerro M., Gash D. M., Rao G. N. *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1985, **26**, 182.
 Del Cerro M., Gash D. M., Notter M. F. *et al.*, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1986, **15**, 561.
 Del Cerro M., Gash D. M., Rao G. N. *et al.*, *Neurosci.*, 1987, **21**, 707.
 Del Cerro M., *Prog. Ret. Res.*, 1989, **9**, 229.

- Ehinger B., Aramant B., Seiler M. et al., *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1988, 14, 1275.
 Fishman G. A., *Arch. Ophthalmol.*, 1998, 106, 667.
 Fukuda J., Sasaki H., Inoue T. et al., *Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1993, 19, 43-99.
 Jiang L. Q., Del Cerro M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989, 56, 121.
 Klassen H., Lund R. D., *J. Neurosci.*, 1990, 10, 578.
 Klassen H., Klassen M. K., Chaudhry N., Liggett P., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1994, 35, 1256.
 Maurice D. M., Sigh T., *Cornea*, 1996, 15, 2, 204.
 Royo P. E., Quay W. B., *Growth*, 1959, 23, 313.
 Seiler M., Aramant B., Ehinger B. et al., *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1988, 14, 1275.
 Sidman R. L., Green M. C., Appel S. H., *Catalog of the neurological mutants of the mouse*, 1965, Harvard University Press, Cambridge.
 Turner J. E., Blair J. R., *Dev. Brain Res.*, 1986, 26, 91.

RAFFAELE NUZZI E CATERINA BOGETTO

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

Sin.: arteriopatie ostruttive periferiche; arteriopatie obliteranti periferiche. - **F.** *artériopathies occlusives périphériques*. - **I.** *occlusive peripheral arterial diseases*. - **T.** *arteriöse pñrphäre okklusionen*. - **S.** *oclusiones arteropaticas periféricas*.

SOMMARIO

Inquadramento e definizione (col. 4113). - **Epidemiologia** (col. 4114): *Incidenza e prevalenza*. - **Etiologia** (col. 4115): *Arteriosclerosi*. - *Fumo di sigaretta*. - *Iperensione*. - *Iperlipidemia*. - *Apolipoproteine*. - *Acidi grassi essenziali e carenza di agenti antiossidanti*. - *Fattori emostatici*. - *Intolleranza ai carboidrati*. - *Altri fattori di rischio*. - **Storia naturale** (col. 4119): *Morbosità secondaria alla malattia locale*. - *Morbosità secondaria alla generalizzazione della malattia*. - *Mortalità*. - **Fisiopatologia** (col. 4121). - **Diagnosi clinica** (col. 4121): *Sintomi dell'occlusione cronica*. - *Esame fisico*. - **Diagnosi strumentale** (col. 4124): *Arteriografia*. - *Ecografia Doppler*. - *Pletismografia*. - *Micro-capillaroscopia*. - **Terapia** (col. 4128): *Occlusione arteriosa acuta*. - *Terapia delle ostruzioni croniche*. - *Arteriopatie ostruttive periferiche nei pazienti diabetici*. - **Malattia di Buerger o tromboangiite obliterante** (col. 4136).

Inquadramento e definizione

Le occlusioni arteriopatiche periferiche [o.a.p.] possono essere classificate in: *acute e croniche*.

Le *acute* possono verificarsi su arterie sane o su arterie ateromasiche: da *embolia* (pazienti con cardiopatia dilatativa, fibrillazione atriale, valvulopatie metareumatiche, aneurismi aortici, aneurismi iliaci o femorali o poplitei o più raramente succlavi o ulnari, cardiopatia ischemica) o da *trombosi*, quasi invariabilmente su placca ateromasica, ma talvolta *ex novo* su vaso sano: trombofilie (v.**; ad es.: sindrome APA/LAC [anticorpi antifosfolipidi/Lupus Anti Coagulante], APC-res [resistenza alla PC attivata], deficit di PS, deficit di PC, deficit di AT-III [antitrombina III]); iperomocisteinemia (v. OMOCISTEINA**); ARTERIOSCLEROSI**); sindrome da «*entrapment popliteo*», sindrome dell'egresso toracico (v. NEUROVASCOLARI SINDROMI; SCALENO ANTERIORE, SINDROME DELLO); arteriti; traumi o manovre invasive come cateterismi arteriosi; degenerazione cistica avventiziale; flebotrombosi (con meccanismo di trombosi retrograda, come nella *phlegmasia coerulea dolens*, o per compressione estrinseca in corso di sindrome compartimentale data dall'edema imponente secondario alla trombosi venosa profonda (v. TROMBOSI VENOSE PROFONDE**)).

Le *croniche* riconoscono come causa esclusiva l'arteriosclerosi; la malattia di Buerger, che rientra nelle croniche, sarà discussa separatamente a causa delle peculiarità clinico-epidemiologiche ed anatomico-patologiche (v. sotto; v. anche TROMBOANGIOITE OBLITERANTE).

La forma preponderante di o.a.p. (per peso epidemiologico e quindi sociale) è l'o.a.p. cronica data dalla localizza-

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

zione dell'arteriosclerosi a livello delle arterie degli arti, soprattutto inferiori (v. AORTO-ILIACHE OCCLUSIONI**), ed è per questo che la *definizione* usuale di o.a.p. è la seguente: *malattia caratterizzata da un ridotto apporto ematico agli arti, secondario a patologia parietale ostruttiva di natura ateromasica*. Per eventuali approfondimenti circa le principali teorie chiamate in causa per spiegare la genesi del danno ateromasico (come quella della risposta endoteliale alla lesione, o quella dell'infiltrazione lipidica) si rimanda alla VOCE ARTERIOSCLEROSI (v.; v.*; v.**).

Le manifestazioni cliniche dell'o.a.p. sono: la *claudicatio intermittens* (v.), il dolore a riposo e le lesioni trofiche.

Epidemiologia

Nonostante la ricerca epidemiologica delle malattie vascolari sia stata prevalentemente indirizzata allo studio della cardiopatia ischemica e delle vasculopatie cerebrali, negli ultimi anni l'interesse per l'o.a.p. si è accresciuto grazie anche all'avvento di nuove tecniche diagnostiche e di nuove terapie. Il primo grande programma di sorveglianza comprendente l'o.a.p. ebbe inizio nel 1949 negli U.S.A. con lo studio Framingham: una popolazione di 5209 soggetti selezionati tra gli abitanti della città venne sottoposta a prolungato *follow-up* dopo un'iniziale valutazione basale. Altri studi prospettici su vaste popolazioni sono stati successivamente condotti in Svizzera, Finlandia, Danimarca, Stati Uniti e, più recentemente, in Scozia.

Grazie a questi studi è oggi disponibile una grande quantità di dati relativi all'o.a.p.: incidenza, prevalenza, fattori di rischio associati, storia naturale. Le o.a.p. costituiscono una causa rilevante della morbosità di tutta la popolazione generale e soprattutto di quella più anziana; la determinazione dei fattori etiologici e della storia naturale è quindi rilevante sia per una corretta pianificazione dei servizi sanitari finalizzati sia, soprattutto, per incrementare le conoscenze sulla malattia coronarica e sulle vasculopatie cerebrali.

Incidenza e prevalenza

La presenza dell'o.a.p. nella popolazione generale è stata valutata seguendo due modalità: mediante il rilievo di sintomi suggestivi di *claudicatio intermittens*, oppure attraverso tecniche strumentali in grado di stimare la perfusione ematica. Il primo approccio è più rapido e semplice e per tale motivo è stato utilizzato più diffusamente, nonostante comporti una sottostima della reale prevalenza.

1. *O.a.p. sintomatica*. - La *claudicatio intermittens* è il primo sintomo dell'ischemia degli arti inferiori e la relativa prevalenza nella popolazione generale è un ottimo indicatore del grado di morbosità dato dalla malattia. Tuttavia, dal momento che la maggior parte dei soggetti con *claudicatio* non afferrisce alla struttura ospedaliera fintanto che non è richiesta una procedura di rivascolarizzazione, la reale prevalenza della *claudicatio* può essere ottenuta soltanto attraverso un programma di sorveglianza della popolazione. Il questionario di rilevazione della *claudicatio* adottato dall'O.M.S. (Rose; OMS) per i programmi di sorveglianza finalizzati alla diagnosi dell'o.a.p. è uno strumento molto specifico ma soltanto moderatamente sensibile: cionondimeno per la sua ampia utilizzazione, rimane ancora quello più idoneo per raffrontare i diversi dati di prevalenza ottenuti nelle popolazioni mondiali. La tab. I illustra le differenze di prevalenza dell'o.a.p. rilevate in alcuni tra i principali studi epidemiologici.

Tali dati sono stati ottenuti in campioni di soggetti di sesso maschile con età compresa tra 40 e 60 anni, selezionati dalla popolazione generale. L'estrema variabilità (dallo 0,9% del Nord America al 6,9% della Russia) riflette solo in parte una reale differente prevalenza e ciò a causa di

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

TAB. I. PREVALENZA DELLE ARTERIOPATIE OSTRUTTIVE PERIFERICHE

Stati Uniti	0,9%
Israele	1,4%
Belgio	1,5%
Svezia	2,8%
Finlandia	2,9%
Scozia	3,0%
Germania	3,4%
Canada	4,2%
Danimarca	5,8%
Russia	6,9%

probabili distorsioni che non rendono perfettamente comparabili i vari studi. È comunque corretto dire che la *claudicatio* aumenta con l'aumentare dell'età e che risulta più comune nella popolazione maschile rispetto a quella femminile.

L'altro importante sintomo dell'o.a.p. è il *dolore a riposo*, che è peraltro specifico dell'*ischemia critica dell'arto* (la forma clinica più grave dell'o.a.p. e che si configura come un'emergenza medica).

La prevalenza del dolore a riposo non è stata mai indagata in alcuno studio di sorveglianza e ciò probabilmente per la difficoltà di ottenere una sua corretta valutazione mediante semplice questionario e soprattutto a causa della sua scarsa specificità (è infatti sintomo facilmente confondibile con quello causato dalle malattie osteo-articolari e dalle malattie venose). Tuttavia, dal momento che quasi tutti i pazienti con ischemia critica vengono ospedalizzati, è stato possibile ottenere alcuni dati dai registri ospedalieri: sulla base del numero delle amputazioni è stato stimato che l'incidenza dell'*ischemia critica* degli arti oscilla tra 500 e 1000 × milione di individui/anno (senza considerare che un considerevole numero di soggetti muore prima dell'amputazione e che un altro considerevole numero risolve lo stadio di ischemia critica mediante le varie procedure di rivascolarizzazione chirurgica e non chirurgica).

2. *O.a.p. asintomatica.* – Al fine di rilevare le forme lievi dell'o.a.p. (che non causano ancora sintomi), sono stati effettuati numerosi studi di sorveglianza su estese popolazioni impiegando semplici test strumentali non invasivi. Il più comunemente impiegato è la misurazione dell'indice pressorio caviglia/braccio, ma è stata utilizzata anche la morfologia dell'onda rilevata al Doppler, il test dell'ipermia reattiva con pletismografia e la valutazione morfologica dell'arteria poplitea mediante ecografia (studio ARIC).

Purtroppo proprio a causa della mancanza di una standardizzazione non è stato possibile effettuare un rigoroso confronto: è stato comunque evidenziato che la prevalenza dell'o.a.p. rilevata con questi metodi è circa tripla della *claudicatio intermittens* e mantiene una simile distribuzione relativamente a sesso ed età. Ovviamente la più accurata documentazione delle dimensioni dell'o.a.p. asintomatica può essere ottenuta mediante studi autoptici. Questi ultimi hanno dimostrato che circa il 15% degli uomini ed il 5% delle donne presenta un grado di o.a.p. abbastanza severo da produrre una stenosi di oltre il 50% in almeno un'arteria mentre praticamente nessun soggetto risulta completamente esente da placche aterosclerotiche.

Etiologia

Arteriosclerosi

Come abbiamo detto, è l'arteriosclerosi, nella sua localizzazione a livello delle arterie degli arti, la causa esclusiva delle

o.a.p. croniche (v. sopra; v. ARTERIOSCLEROSI [v.; v.*; v.**]). Dobbiamo però tenere gran conto dei *fattori associati* allo sviluppo delle o.a.p. Questi sono emersi da numerosi studi di tipo *trasversale* e *caso-controllo* ma l'evidenza definitiva di un ruolo specifico dei singoli fattori di rischio richiede ancora studi prospettici di sorveglianza sufficientemente protratta e su coorti sufficientemente ampie arruolate nella popolazione generale. Il numero di questi studi attualmente disponibile è purtroppo ancora esiguo per fornire dati definitivi, ma sufficiente a dire che il fumo di sigaretta, l'iperlipidemia e l'ipertensione sono i fattori più importanti.

Fumo di sigaretta

In un recente lavoro epidemiologico pubblicato negli U.S.A. viene enunciato che «il fumo di sigaretta è il più potente singolo fattore di rischio per l'o.a.p.». Infatti gli studi trasversali nella popolazione generale suggeriscono che il rischio relativo di sviluppare l'o.a.p., per gli individui fumatori, varia da 1,4 a 15. Inoltre nonostante le numerose differenze di criteri adottate nei singoli studi riguardanti la tipologia della popolazione studiata, la definizione di fumatore e le modalità di diagnosi della malattia arteriosa, l'analisi multivariata indica che il fumo di sigaretta ha un effetto indipendente che è più rilevante di tutti gli altri fattori di rischio e che risulta essere molto più importante per l'o.a.p. che non per la cardiopatia ischemica. L'entità con cui il fumo contribuisce allo sviluppo della malattia è deducibile solo da studi trasversali nei quali l'abitudine al fumo sembra contribuire alla malattia in misura compresa tra il 14% ed il 53%; se vengono inclusi anche gli ex-fumatori la percentuale diventa ancora più grande. Nello studio Framingham una sorveglianza di 16 anni suggerì che il 78% dei casi di malattia poteva essere ascrivibile al fumo (v. TABAGISMO*; RESPIRATORIO APPARATO**, *fattori di rischio delle malattie respiratorie*).

Iipertensione

È risultata associata con lo sviluppo dell'o.a.p. sia in studi *trasversali* che in studi *caso-controllo* ed in particolare i dati suggeriscono che quella maggiormente implicata sia l'ipertensione sistolica. Lo studio Framingham ha riportato un incremento del rischio di sviluppare la malattia nell'arco di 26 anni pari a 3 volte ed una correlazione più significativa per la pressione sistolica rispetto alla diastolica. Sebbene in altri studi siano emersi risultati discordanti o addirittura nessuna associazione, tali dati sono statisticamente meno consistenti e comunque l'importanza dell'ipertensione come singolo fattore di rischio rimane ancora non chiaramente dimostrata. D'altronde la stessa ipertensione potrebbe essere secondaria all'o.a.p.

Iperlipidemia

Numerosi studi clinici ed epidemiologici hanno analizzato il ruolo del colesterolo, dei trigliceridi e delle lipoproteine nel determinismo dell'o.a.p. e più recentemente sono stati invocati quali possibili fattori di rischio anche la carenza di acidi grassi essenziali o di agenti antiossidanti. Come regola generale un'iperlipidemia si osserva più frequentemente negli anziani, nei diabetici e negli obesi, ma il ruolo specifico dei singoli lipidi deve essere analizzato in maggior dettaglio.

1. *Ipertrigliceridemia.* Studi tratti da registri ospedalieri hanno identificato elevati livelli di trigliceridi in pazienti affetti da o.a.p.; altrettanti studi condotti nella popolazione generale hanno confermato questo dato sebbene un minore numero di studi l'abbia negato. Comunque, effettuando un'analisi multivariata finalizzata all'aggiustamento del peso degli altri lipidi nonché degli altri fattori

di rischio, non è stata dimostrata una relazione indipendente tra l'o.a.p. ed il livello di trigliceridemia. La relazione longitudinale tra livelli serici di trigliceridi e futuro sviluppo di o.a.p. è stata analizzata in 2 differenti studi: nel I studio 2759 pazienti sono stati sorvegliati per 5 anni: in quest'arco di tempo 174 soggetti hanno sviluppato o.a.p. e di questi il 59% presentava ipertrigliceridemia. Nel II studio i livelli di ipertrigliceridemia a digiuno, misurati all'età di 50 anni, sono risultati ben correlati con l'indice pressorio misurato 10 anni più tardi. Tuttavia anche in questi casi la correlazione scompariva allorché veniva eseguita un'analisi multivariata aggiustata per il fumo, l'ipertensione e l'ipercolesterolemia. Uno studio recente proveniente dalla Gran Bretagna dimostra che la stretta relazione univariata tra trigliceridi ed o.a.p. può essere perlopiù spiegata dalla correlazione tra trigliceridi e colesterolo LDL. E pertanto i dati attualmente disponibili indicherebbero che la relazione tra trigliceridemia e l'o.a.p. è del tutto sovrapponibile a quella esistente tra trigliceridemia e cardiopatia ischemica.

2. Ipercolesterolemia. - L'associazione tra questo fattore e l'o.a.p. è un rilievo quasi costante negli studi provenienti da registri ospedalieri: negli studi trasversali condotti nella popolazione generale i risultati sono discordanti ma in 2 studi prospettici longitudinali (il Framingham e quello Danese) è stata dimostrata un'associazione positiva tra o.a.p. ed ipercolesterolemia: infatti nel I studio i livelli di colesterolo sono risultati essere un lieve ma significativo fattore di rischio mentre nel II studio essi, misurati all'età di 50 anni, si sono correlati come fattore indipendentemente con l'ABI (*ankle-brachial index*; v. sotto). Esiste pertanto una sufficiente evidenza che l'ipercolesterolemia costituisca un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di o.a.p. Più recentemente l'interesse per il colesterolo nella patogenesi dell'aterogenesi si è concentrato nello studio delle singole subfrazioni lipoproteiche. Un ridotto valore di HDL costituisce il rilievo prevalente nei pazienti affetti da o.a.p. ospedalizzati rispetto ai soggetti di controllo ed è inoltre anche correlato con il grado di severità della malattia. Una riduzione di HDL può essere anche ascrivibile al fumo di sigaretta e ad una ridotta attività fisica. Complessivamente è stata tuttavia dimostrata una forte correlazione inversa tra livelli di HDL e *claudicatio intermittens*, anche dopo l'aggiustamento conseguente alla contemporanea valutazione degli altri fattori.

Apolipoproteine

Una subfrazione delle LDL, nota come lipoproteina (a), è stata identificata in elevate concentrazioni in quei soggetti con familiarità positiva per cardiopatia ischemica a precoce insorgenza, ed è un noto fattore di rischio indipendente per l'infarto del miocardio e per la morte coronarica; è verosimilmente fattore predittivo per la risteno di *bypass* aorto-coronari. Dati relativi all'associazione tra questo fattore e l'o.a.p. sono tuttora in corso di definizione. Anche l'apoB è correlata positivamente con la cardiopatia ischemica e studi caso-controllo la fanno correlare anche con l'o.a.p. Sono state inoltre rilevate significative differenze nel *locus* per il gene apoB dei pazienti malati di o.a.p. rispetto ai controlli sani ed infatti è stato ipotizzato che le apolipoproteine possano essere il migliore strumento (più utile pertanto, dei livelli dei lipidi o delle lipoproteine) al fine di discriminare i pazienti affetti da o.a.p. dai soggetti sani.

Acidi grassi essenziali e carenza di agenti antiossidanti

Gli acidi grassi essenziali derivano da 2 molecole: l'acido linoleico e l'acido alfa-linolenico. Dalle prime osservazioni di carenza di acido linoleico nei pazienti affetti da arteriosclerosi coronarica o o.a.p., tutti gli studi successivi hanno confermato un rapporto inverso tra livelli plasmatici di questo acido grasso, probabilità di sviluppo della malattia coronarica e grado di severità della stessa. Più recentemente è stata descritta una carenza di antiossidanti naturali (specialmente Vit. E e Vit. A) in pazienti affetti da malattia coronarica e da o.a.p. Gli antiossidanti (v.**) proteggono gli acidi grassi polinsaturi dalla perossidazione e i perossidi lipidici sono noti da anni per essere correlati con il grado di severità dell'ateromatosi aortica. In un recente studio sono

stati trovati livelli di perossidi significativamente più elevati in soggetti affetti da cardiopatia ischemica o da o.a.p. rispetto a soggetti sani. Il deficit di antiossidanti può agire pertanto come evento promotore l'aterosclerosi sia riducendo i livelli di acidi grassi essenziali e sia portando all'incremento dei perossidi.

Fattori emostatici

La concentrazione di fibrinogeno è ritenuta un fattore di rischio particolarmente importante nello sviluppo della malattia arteriosclerotica dal momento che in numerosi studi caso-controllo effettuati in pazienti con *claudicatio intermittens* sono stati evidenziati livelli di fibrinogenemia significativamente più elevati. In studi di sorveglianza, l'iperfibrinogenemia è risultata correlata con il fumo di sigaretta (anche con normalizzazione dei livelli dopo sospensione del fumo). È stato inoltre evidenziato un incremento del rischio di o.a.p. nei soggetti che presentano una variazione del *locus* genico per il beta-fibrinogeno. L'iperviscosità ematica è risultata significativamente maggiore nei soggetti con *claudicatio* rispetto ai controlli sani ed un'analoga correlazione è stata evidenziata anche per l'ematocrito (sebbene tale parametro non sia risultato rilevante nello studio Framingham). Nei soggetti malati di o.a.p. è stato descritto un incremento del tempo di lisi del fibrinogeno, una ridotta attività fibrinolitica, un incremento del fattore VIII, del fattore XIII, del plasminogeno e della alfa-2 antiplasmina. Non è stata invece descritta alcuna alterazione quantitativa dell'AT-III. Tra dati discordanti è stato inoltre descritto un'incremento dell'aggregabilità piastrinica ed una riduzione della sopravvivenza piastrinica. La beta-tromboglobulina, *marker* della fase di rilascio piastrinico, è stata descritta come incrementata nei soggetti affetti da o.a.p., analogamente ai livelli di uricemia (che può amplificare a sua volta l'aggregabilità piastrinica). Tutti questi dati suggeriscono che i pazienti affetti da o.a.p. presentano una tendenziale trombofilia ma il meccanismo attraverso il quale i vari fattori emostatici possano contribuire al determinismo della patologia cronica della parete arteriosa non è ancora affatto chiaro.

Intolleranza ai carboidrati

L'o.a.p. è una complicanza nota e peraltro molto frequente del diabete mellito. In uno studio finlandese comprendente soggetti di età compresa tra 30 e 59 anni, la prevalenza, aggiustata per età, della *claudicatio intermittens* è risultata 3,4 volte maggiore negli uomini diabetici e 5,7 volte maggiore nelle donne diabetiche. In un altro studio finlandese prospettico con *follow-up* di 5 anni, l'incidenza di o.a.p. è risultata significativamente più elevata nei soggetti diabetici rispetto a quelli non diabetici. In uno studio prospettico israeliano con *follow-up* di 5 anni il tasso di incidenza di o.a.p. è risultato doppio nei soggetti cui era stato precedentemente diagnosticato un diabete o una ridotta tolleranza al glicoso. Nello studio Framingham l'incidenza di o.a.p. valutata a 20 anni di *follow-up* è risultata del $12,6 \times 1000/\text{anno}$ per i soggetti diabetici del $3,3 \times 1000/\text{anno}$ nei soggetti non diabetici ed ogni indicatore di ridotta tolleranza ai carboidrati era associato ad un incrementato rischio di sviluppare o.a.p. E, come evento atteso, in 3 altri studi europei trasversali è stato trovato che la ridotta tolleranza al glicoso è più frequente nei soggetti con *claudicatio*. Cionondimeno altri studi epidemiologici dimostrano che l'intolleranza al glicoso non risulta fattore di rischio nella popolazione generale e, nonostante i risultati dello studio Framingham, nel complesso i dati disponibili non fanno dell'intolleranza al glicoso un chiaro fattore di rischio per la popolazione generale, almeno relativamente all'o.a.p.

Altri fattori di rischio

L'associazione tra tipologia di personalità e rischio di o.a.p. non è stata sufficientemente indagata come invece è stato fatto per la cardiopatia ischemica sebbene nei pochi studi significativi i soggetti con *claudicatio intermittens* sembrano esprimere un maggior numero di caratteristiche attribuibili alla personalità di tipo A (caratterizzata da forte atteggiamento competitivo, aggressività, fretta esagerata, profondo impegno nel lavoro [Mann, 1984]). In uno studio europeo i soggetti affetti da malattia arteriosa periferica hanno presentato un uso di alcol significativamente più elevato dei controlli e la significatività permaneva anche dopo un'analisi bilanciata per sesso, età e per i livelli di altri principi nutritivi. C'è comunque una certa evidenza che l'uso di alcol in piccole quantità costituisce un fattore di rischio negativo per lo sviluppo di o.a.p., sebbene un lieve incremento di questo minimo introito quotidiano vada a rapido detrimento del beneficio (un effetto che è molto probabilmente mediato dalle conseguenti alterazioni sulla pressione arteriosa, sui livelli lipidemici e sul sistema coagulativo). Altri fattori di rischio che sono stati chiamati in causa nel determinismo delle malattie vascolari sono: una leucocitosi e un incremento dei livelli di ferritina. L'esercizio fisico è un noto fattore di miglioramento dei sintomi della *claudicatio* (probabilmente attraverso la normalizzazione di alcuni parametri emoreologici), tuttavia la mancanza di attività fisica (ovvero una vita sedentaria) non si è ancora dimostrata essere un fattore di rischio per l'insorgenza di o.a.p.

Storia naturale

Numerosi sono i dati pubblicati relativi ai risultati a breve e lungo termine del trattamento chirurgico e non chirurgico dell'ischemia periferica, mentre esiguo è il numero di informazioni circa la maggior parte dei pazienti con o.a.p. che non sono sottoposti ad interventi terapeutici. Alcune informazioni a tal proposito possono essere fornite dagli studi prospettici a tutt'oggi realizzati (Framingham Study, Basle Study, London WhiteHall Study, Denmark Study e Finland Study), sebbene poco si sappia circa la storia naturale di ogni singola lesione aterosclerotica. La possibilità di uno studio morfologico accurato e non invasivo, reso oggi possibile grazie all'impiego dell'ecografia-Doppler e della RMN, potrà chiarire in futuro anche questi aspetti.

Morbosità secondaria alla malattia locale

Il tasso di morbosità associato all'o.a.p. è ottenibile sia misurando il tasso di amputazioni, sia stabilendo il grado dei sintomi. I risultati provenienti da 7 studi longitudinali relativi a pazienti ospedalizzati affetti da *claudicatio intermittens* evidenziano che: 1) non c'è relazione diretta tra percentuale di peggioramento e durata dell'osservazione; 2) c'è qualche evidenza che il peggioramento è minore nei soggetti non sottoposti ad interventi chirurgici (probabilmente perché tali forme sono quelle meno gravi); 3) la malattia si stabilizza dopo la diagnosi in circa il 75% dei soggetti mentre nel 25% si osserva un significativo peggioramento; 4) il miglioramento soggettivo dei sintomi non indica necessariamente una regressione della malattia ma può semplicemente rappresentare un'adattamento fisiologico all'ischemia, grazie anche allo sviluppo di circoli collaterali; 5) il tasso di amputazioni è di circa il 7% dopo 6 anni ed è minore nei soggetti non sottoposti a procedure di rivascularizzazione. Negli studi effettuati sulla popolazione generale (non ospedalizzata) il tasso di amputazione è risultato dell'1,6%, ma dell'1,8% nei soggetti che hanno sviluppato *claudicatio intermittens*. L'amputazione è più comune se i soggetti sono forti fumatori al momento della diagnosi, se continuano a fumare o se sono diabetici e, meno frequentemente, se presentano ipertensione sistolica maggiore di 180 mmHg.

Comunque dal momento che soltanto una percentuale compresa tra il 3 ed il 22% dei soggetti claudicanti che si

presenta a strutture sanitarie va poi incontro ad interventi chirurgici, la maggioranza dei pazienti può presentare un miglioramento dei sintomi senza alcun intervento chirurgico. L'ottimismo relativo alla situazione locale si scontra tuttavia con la probabilità che i pazienti con *claudicatio* hanno di morire prematuramente a causa di una arteriosclerosi generalizzata.

Morbosità secondaria alla generalizzazione della malattia

In pazienti che esordiscono con un sintomo di ischemia degli arti inferiori la prevalenza di concomitante coronaropatia oscilla tra il 19 ed il 47%. In uno studio che ha valutato angiograficamente il contemporaneo interessamento coronarico, questo è risultato del 90% dei soggetti con o.a.p. La prevalenza di concomitante vasculopatia cerebrale varia in relazione ai criteri di rilievo della stessa: in uno studio che ha impiegato la metodica Doppler è risultata del 52%. Alla luce di questi dati non meraviglia che in questi pazienti vi sia un'elevata incidenza di eventi cardiovascolari. E infatti in un'estesa analisi prospettica, dopo 11 anni di *follow-up* il 16% dei soggetti con o.a.p. ha presentato eventi cardiaci non fatali mentre il 12% ha manifestato accidenti cerebrovascolari. Analoghi sono i risultati di un altro studio condotto su un gruppo di claudicanti non selezionati.

Mortalità

Il tasso di mortalità complessiva a 5 anni nei soggetti affetti da *claudicatio intermittens* varia dal 4,8% al 17%, è generalmente maggiore negli uomini che nelle donne e aumenta con l'aumentare dell'età. Il rischio relativo di morte è comunque analogo per ambo i sessi e si aggira intorno a 2 dopo 5 anni, e intorno a 2,5 dopo 10 anni e si riduce con l'aumentare dell'età. L'incremento del tasso di mortalità si associa al fumo di sigaretta: i soggetti fumatori hanno un rischio relativo di morte che è compreso tra 1,5 e 3 rispetto ai soggetti non fumatori e i soggetti che smettono di fumare registrano una migliore sopravvivenza. Solo alcuni studi hanno dimostrato un incremento del rischio di mortalità con l'aumentare della pressione arteriosa, dei livelli di colesterolemia e con il diabete mellito. Riepilogando, quindi, i soggetti claudicanti hanno una più alta probabilità di morire precocemente se confrontati con i soggetti sani, ma soltanto pochi decedono a causa dell'o.a.p. La causa prevalente di morte è la cardiopatia ischemica che è responsabile di circa il 50% di tutte le cause di mortalità. In una percentuale compresa tra il 7 ed il 17% la causa è un accidente cerebrale e nel 10% la causa è imputabile ad eventi vascolari non cardiaci né cerebrali. Studi prospettici hanno inoltre dimostrato che i soggetti con *claudicatio* presentano, rispetto alla popolazione generale, un rischio triplo di morire a causa della cardiopatia ischemica e circa doppio di morire a causa di accidenti cerebrovascolari.

In conclusione: la distribuzione dell'o.a.p. nella popolazione generale è simile a quella della cardiopatia ischemica e della vasculopatia cerebrale e pertanto costituisce un utile indicatore dell'arteriosclerosi generalizzata. Le conclusioni circa l'etiologia dell'o.a.p. possono essere soltanto ipotizzate attraverso gli studi trasversali dal momento che il nesso causale potrà essere trovato solo attraverso numerosi ed estesi studi prospettici. Lo sviluppo di tecniche diagnostiche non invasive sempre più sofisticate ed accurate offrirà l'opportunità di ricerche epidemiologiche in grado di conoscere con sempre maggiore esattezza la prevalenza dell'o.a.p. sintomatica e soprattutto di quella asintomatica nell'ambito della popolazione generale.

Fisiopatologia

Le conseguenze di un'ostruzione arteriosa dipendono strettamente dalla rapidità con cui essa si realizza. Infatti in corso di ostruzione (con occlusione) di natura embolica il processo ischemico va oltre le possibilità dei meccanismi di compenso ed evolve rapidamente verso la necrosi del territorio non più perfuso. Al contrario, nelle forme ostruttive che conducono molto lentamente all'occlusione arteriosa (come nelle o.a.p. di natura aterosclerotica), i fenomeni compensatori permettono di conservare la funzione dell'arto a livelli accettabili e garantiscono una relativa stabilizzazione del quadro clinico; in tal modo il processo atero-trombotico (associazione tra un processo che si sviluppa lentamente nel tempo, l'aterosclerosi, e un fenomeno che si realizza in modo rapido, la trombosi) può decorrere in forma asintomatica anche per un lungo periodo di tempo.

Nella zona ischemica, soprattutto se l'ischemia data da lungo tempo, si assiste allo sviluppo di un circolo collaterale caratterizzato dall'apertura (o dalla formazione *ex novo* per mezzo di fattori di angiogenesi) di una rete microcircolatoria che si interpone come elemento di congiunzione tra il settore arterioso a monte e quello arterioso (o capillare) a valle dell'ostruzione. La riabilitazione che si verifica talvolta a valle di un'occlusione arteriosa acuta è da riferirsi all'apertura di vasi anatomicamente preesistenti ma fino a quel momento esclusi dalla circolazione; nelle ostruzioni croniche invece, è possibile ipotizzare una neo-angiogenesi che appare inducibile anche con programmi di esercizio fisico.

I fattori che condizionano la tipologia della circolazione collaterale sono la localizzazione del processo ostruttivo, la rapidità dello stesso, il calibro e la distribuzione dei canali collaterali preesistenti nonché le necessità metaboliche del distretto dipendente. Il rilevante calo del flusso attraverso il segmento stenotico appare il momento caratterizzante la circolazione collaterale: in tal caso si registra infatti una caduta della pressione arteriosa a livello della stenosi con lo sviluppo di un anormale gradiente pressorio. La richiesta dell'apertura di una circolazione anastomotica è determinata pertanto non solo dalla presenza di una stenosi di per sé, ma dalle ripercussioni che essa ha sul flusso, sia a riposo che dopo sforzo; il che dipende strettamente dal calibro del vaso e quindi dalla sede dell'ostruzione.

L'esempio classico è quello della stenosi dell'arteria iliaca che in condizioni di riposo fornisce un flusso che, seppure ridotto in valore assoluto, è sufficiente alle esigenze metaboliche dell'arto. Durante sforzo il lavoro muscolare (che normalmente comporta una riduzione delle resistenze delle arterie ed arteriole distali col significato omeostatico di garantire un sufficiente flusso ematico muscolare) si realizza un incremento del gradiente pressorio prossimale-distale ed una conseguente richiesta di maggiore flusso; la stenosi a questo punto diventa «emodinamicamente significativa» dal momento che essa non può permettere quel necessario incremento di portata ematica. A questo punto il paziente diventa sintomatico e presenta il sintomo più frequente dell'o.a.p. che è la *claudicatio intermittens*. Al determinismo del dolore contribuisce l'ipossia stagnante secondaria ad una riduzione della pressione di perfusione muscolare a sua volta conseguente da un lato, alla fisiologica riduzione delle resistenze periferiche e dall'altro al mancato incremento della portata dovuto al tratto stenotico a monte. L'ipossia stagnante porta all'ischemia del parenchima muscolare con successiva produzione di metaboliti responsabili anche del dolore muscolare.

Diagnosi clinica

Nell'o.a.p. i rilievi anamnestici e l'esame clinico hanno già da soli un'elevata sensibilità diagnostica. Tra i rilievi anamnestici oltre a quelli emergenti dai dati epidemiologici sopra descritti (compresa la tipologia di vita, sedentaria o no) è opportuno dare rilievo alla contemporanea presenza di sintomi che si riferiscono alla pluridistrettualità della malattia vascolare (*angina abdominis*, *impotentia erigendi*, *precordialgie*, *pregressi accidenti cerebrovascolari*).

Sintomi dell'occlusione cronica

Sul piano soggettivo i sintomi prodotti dall'o.a.p. dipendono da numerosi fattori tra cui il grado e l'estensione della compromissione vasale, le sedi, la rapidità di instaurazione,

la presenza e l'entità della circolazione collaterale vicariante. I sintomi condizionavano la vecchia classificazione in 3 stadi dell'o.a.p.: *claudicatio intermittens*, dolori a riposo, turbe trofiche; la successiva classificazione formulata da Fontaine e tuttora utilizzata, ha introdotto anche una fase asintomatica della malattia che costituisce appunto il I stadio.

Il I stadio è caratterizzato da assenza di sintomi o da disturbi vari e mal definiti (senso di pesantezza, parestesie o ipoestesie, sensazione di freddo delle estremità alla minima diminuzione della temperatura ambientale); questo stadio necessita sempre di conferme strumentali.

Il II stadio è quello della *claudicatio intermittens*; il paziente riesce a camminare liberamente soltanto per un certo tratto perché ad un intervallo di marcia (detto intervallo libero di marcia), peraltro alquanto riproducibile, subentra il dolore crampiforme che lo costringe a zoppicare o a fermarsi; la lunghezza del tragitto percorribile ed il tempo necessario perché il dolore scompaia (detto tempo di recupero) sono indici abbastanza attendibili per valutare l'entità dell'ischemia e la riserva funzionale assicurata dal compenso dato dal circolo collaterale. A tal fine il II stadio è distinto in IIA e IIB a seconda che l'intervallo libero di marcia sia rispettivamente superiore o inferiore ai 100 metri. Nelle fasi più iniziali del II stadio la *claudicatio* potrebbe essere riferita anche come estremamente episodica dal momento che compare solo per attività fisiche inusuali (deambulazioni protratte in salite ripide o l'ascesa di numerose scale). La localizzazione del dolore da *claudicatio intermittens* (gluteo, coscia, ginocchio, gamba, caviglia e piede) fornisce già chiare indicazioni sulla sede dell'ostruzione più rilevante e sebbene il dolore venga poi sempre riferito distalmente, la presenza del dolore anche in sedi più prossimali nonché la sequenza temporale con cui i vari segmenti sono interessati, deve far parte dell'indagine anamnestica.

Il III stadio è quello del dolore a riposo (che costituisce peraltro il sintomo unico e caratteristico dell'o.a.p. acuta da embolia o trombosi occludenti); in questo stadio il paziente riferisce un'intolleranza per il letto in quanto il decubito orizzontale condiziona un'ulteriore riduzione dell'apporto ematico, il dolore si attenua soltanto quando il paziente si alza per camminare o quando pone l'arto in posizione declive rispetto al piano del letto. Questo dolore è localizzato caratteristicamente nei distretti più distali, perché meno irrorati, dell'arto e pertanto alle dita, all'avampiede o al piede. Sempre al III stadio i frequenti disturbi sensitivi concomitanti (parestesie o ipoestesie) sono legati alla sofferenza anossica dei tronchi nervosi sensitivi.

Al IV stadio compaiono le alterazioni trofiche cutanee (ulcerazioni e gangrena). I pazienti affetti da o.a.p. possono passare da uno stadio all'altro sia in senso migliorativo — reale o soltanto soggettivo — (grazie per esempio all'esercizio fisico, ad una terapia farmacologica efficace, ad un cambiamento delle abitudini di vita) e sia in senso peggiorativo. V. anche AORTO-ILIACHE OCCLUSIONI**.

Un paziente viene definito in fase di *ischemia critica* se: a) presenta dolore a riposo da più di 2 settimane e pressioni sistoliche ≤ 40 mmHg alla caviglia e/o ≤ 30 mmHg all'alluce (*toe pressure*), oppure se b) presenta ulcera o gangrena da più di 2 settimane e pressioni sistoliche ≤ 60 mmHg alla caviglia e/o ≤ 30 mmHg all'alluce (II Consensus Document, 1991).

Esame fisico

L'ispezione può far rilevare una variazione del colorito della cute in relazione all'entità del circolo ematico nella rete capillare; il pallore da ischemia è localizzato a tutto il

segmento corporeo a valle dell'ostruzione e l'entità e l'estensione del pallore sono in relazione alla *rapidità* di instaurazione dell'ischemia. In caso di *ischemia acuta* (che può costituire un evento altamente drammatico: v. AORTO-ILIACHE OCCLUSIONI**) infatti il pallore è intenso (cadaverico, marmoreo) ed è nettamente demarcato mentre in corso di *o.a.p. cronica* l'entità, l'estensione e la demarcazione del pallore sono ridotti: la cianosi (che caratteristicamente non scompare alla digitopressione) è tipica delle fasi più avanzate ed esprime una prognosi generalmente sfavorevole in quanto è premessa alle lesioni trofiche. La scarsa o assente replezione dei circoli venosi superficiali, l'edema (più tipico del III e IV stadio, di tipo molle e secondario alla protratta postura declive assunta dal paziente), e le alterazioni trofiche (disonichia, paraonichia), l'ipo- o atrofici, la cute secca, sottile, liscia, lucente, desquamante, e l'ipotrofia muscolare, sono tutti reperti tipici delle forme inveterate.

Le variazioni del colorito cutaneo vengono sfruttate nella cosiddetta *prova posturale*: le gambe del paziente, posto in posizione supina, vengono passivamente sollevate a 45°: in presenza di ostruzione arteriosa non compensata da sufficiente circolo collaterale il piede impallidisce entro 2-3 minuti e ciò può avvenire o a chiazze o limitarsi ad alcune dita del piede; il reperto è indice di circolo distale insufficiente anche in presenza di pulsatilità della tibiale posteriore e della pedidia. Dopodiché il paziente viene posto seduto con le gambe penzoloni e allora, nei territori scarsamente irrorati, compare entro alcuni minuti rossore con tonalità cianotica. Una variante di questa prova posturale è l'analoga *prova di Rathschoff* in cui al termine della prova posturale si valuta il tempo necessario alla replezione delle vene superficiali del dorso del piede.

La palpazione permette di apprezzare il trofismo cutaneo ma soprattutto la temperatura che, nei soggetti con o.a.p., è ridotta in misura variabile. I polsi rilevabili (femorali, poplitei e soprattutto tibiali posteriori, pedidi e peroneali) andranno valutati comparativamente. Un'ipo- od asfimia è indice specifico di arteriopatia con la sola eccezione della

pedidia che può presentare anomalie di decorso (maggiore profondità) od ipoplasia, da intendersi come varianti anatomiche presenti nella popolazione normale in percentuale variabile dal 10% al 20% (a tale fine è utile il rilievo, dopo una meticolosa ricerca lungo tutto il decorso anatomico, di una simmetria del reperto e soprattutto della unicità dello stesso). Più raramente può essere possibile apprezzare un fremito allorché la stenosi si verifica a livello femorale. L'auscultazione (effettuata con compressione calibrata onde evitare falsi positivi) può evidenziare la *presenza di soffi*, esclusivamente sistolici, a livello aorto-iliaco, iliaco, femorale o popliteo, con caratteri di intensità crescente passando dal dolce, all'aspro, al «getto di vapore», cui generalmente corrispondono diverse entità di stenosi. Il soffio è caratteristicamente propagato nel senso della corrente sanguigna e pertanto udibile con la massima evidenza subito a valle della stenosi. Il rilievo di un soffio è molto più sensibile del rilievo di un'iposfimia.

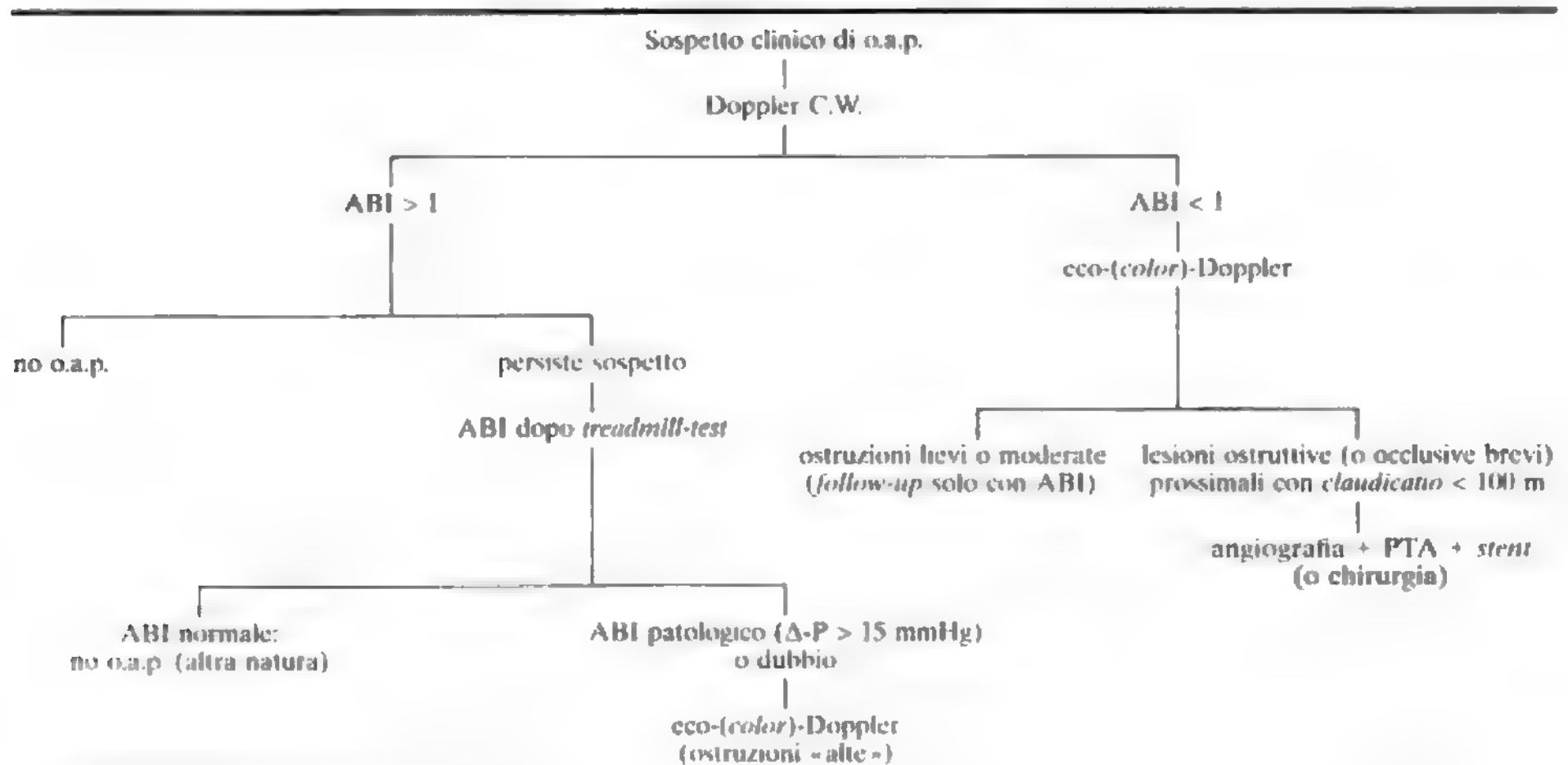
Diagnosi strumentale

Le tecniche di diagnosi strumentale possono essere classificate, a seconda che implicino la cruentazione del paziente (con introduzione di cateteri e mezzi contrastografici) oppure no, in: *a) invasive* (arteriografia) oppure: *b) non invasive* (tecniche ultrasonografiche, pletismografiche, capillaroscopiche, *treadmill-test*).

Le informazioni ottenibili con le tecniche invasive e non invasive possono essere finalizzate alla definizione morfologica (ecotomografia, capillaroscopia) oppure alla determinazione di parametri funzionali (pletismografie, Doppler, laser-Doppler) oppure di entrambe simultaneamente (ecografia-(color)-Doppler, arteriografia). I parametri funzionali possono inoltre essere ottenuti a riposo o dopo sforzo (*treadmill-test*) o dopo ischemia (test dell'iperemia reattiva).

Nella tab. II viene riportato l'algoritmo proposto nelle diagnosi strumentali delle o.a.p.

TAB. II. DIAGNOSI STRUMENTALE DI MASSIMA IN CORSO DI ARTERIOPATIE CRONICHE OCCLUSIVE: ALGORITMO PROPOSTO



ABI: ankle brachial index

TAB. III. IMPIEGO DELLA ARTERIOGRAFIA NELLE ARTERIOPATIE OCCLUSIVE PERIFERICHE

Vantaggi	Svantaggi
accurata descrizione morfologica parziale valutazione funzionale (collateralizzazione, run-off) possibilità di interventi (PTA, stent, trombolisi loco-regionale)	invasività costo elevato scarsa ripetibilità

La scelta delle varie tecniche deve sottostare al tipo di informazioni che si vogliono avere; così per esempio negli *screening* di massa e nei rilievi epidemiologici, sia trasversali che longitudinali, sarà opportuno adottare una tecnica semplice, rapida e pertanto poco costosa (come il semplice Doppler «cieco» ad onda continua o il *treadmill-test*); nel caso invece si voglia effettuare un approfondimento diagnostico o si vogliano selezionare i pazienti da sottoporre a procedure di angiografia interventistica o ancora, si vogliano effettuare ricerche su gruppi selezionati, sarà indispensabile impiegare tecniche complesse e pertanto anche costose; è questo il caso dell'eco-(color)-Doppler, della microcapillaroscopia o di alcuni tipi di pletismografia.

Arteriografia

L'arteriografia (tab. III) mantiene a tutt'oggi un ruolo fondamentale in quanto continua ad essere il test di riferimento dell'analisi morfologica del circolo arterioso. Sebbene le arteriografie diagnostiche si siano significativamente ridotte a minime indicazioni (essa infatti risulta ancora quasi invariabilmente indispensabile prima di ogni procedura chirurgico-vascolare), e ciò grazie soprattutto all'introduzione dell'eco-Doppler, il numero complessivo delle procedure è in netto incremento a causa del sorprendente sviluppo della radiologia interventistica (angioplastica percutanea transluminale [PTA], stent, trombolisi loco-regionale). L'introduzione della digitalizzazione (e della sottrazione di immagini) ha poi permesso di ridurre le quantità di mezzo di contrasto nonché i tempi stessi di esame (senza considerare l'opportunità di poter avere un archivio elettronico che è talvolta cinematografico, e quindi perfino dinamico, dell'intero esame).

Ecografia Doppler

Le metodiche strumentali non invasive più importanti sia per le potenzialità (in fase di continuo perfezionamento) che per i costi relativamente contenuti, sono certamente date dall'impiego degli ultrasuoni (v.; v. ECOGRAFIA*; v.**). Nella diagnostica vascolare essi possono essere sfruttati sia con modalità *Brightness-mode* 2D (ovvero l'ecotomografia), sia in *Doppler-mode* (ad emissione continua o pulsata) e sia ancora, in *Color-Frequency-Mode*. Il numero ed il tipo di informazioni (morfologiche o velocimetriche) è differente nelle diverse applicazioni ma tutte sono utilmente impiegate ai diversi livelli (*screening* di popolazioni estese o approfondimenti su gruppi selezionati) nella patologia vascolare.

Il Doppler ad onda continua (*continous Wave*; C.W.) è uno strumento di grande utilità (tab. IV) nello *screening* e nel monitoraggio dei pazienti con a.a.p. Attraverso il segnale Doppler l'orecchio di un operatore esperto può valutare minime alterazioni nella normale frequenza e poter stimare stenosi anche inferiori al 50%. Ma la maggiore uti-

TAB. IV. IMPIEGO DELL'ECOGRAFIA DOPPLER (C. W.) NELLE ARTERIOPATIE OCCLUSIVE PERIFERICHE

Vantaggi	Svantaggi
semplice sensibile poco costoso relativamente rapido non invasivo facilmente ripetibile (utile nel follow-up) determina ABI con elevata riproducibilità	nessuna valutazione morfologica nessuna risoluzione spaziale bassa sensibilità per lo studio del microcircolo limitato dalla presenza di sclero-calcinosi parietale

lità di questo strumento risiede nella possibilità che venga impiegato da personale non addestrato per la misurazione della pressione sistolica con un ottimale *indice K* di riproducibilità (pressoché nulla è la variabilità interoperatore e la deviazione standard è dell'ordine di pochi centesimi). In tal modo è possibile misurare l'indice pressorio (o indice caviglia-braccio o *ankle-brachial index* [ABI] o *ankle/arm pressure index* [API] o ancora, *indice di Winsor* [v. AORTOILIACHE OCCLUSIONI**]).

In condizioni di normalità, per motivi emodinamici, la pressione sistolica misurata agli arti inferiori è superiore di circa 10-20 mmHg rispetto a quella omerale. In presenza di ostruzione > del 50% o di occlusione completa, già in condizioni di riposo è possibile rilevare una calo pressorio a valle della lesione, causato dalla vasodilatazione compensatoria (omeostasi perfusionale). Per ovviare alla variabilità della pressione arteriosa considerata come valore assoluto, si misura il rapporto tra la migliore pressione misurabile ai piedi (tibiale posteriore o pedidia o peroneale) e quella sistemica (misurabile a livello di una brachiale normo-sfigmica). Normalmente il rapporto è > 1; valori < 0,86 sono certamente patologici e soprattutto lo sono proporzionalmente alla gravità; tutti i valori intermedi sono da considerare molto probabilmente patologici. L'indice pressorio è un ottimo metodo di *screening* e di *follow-up* (a tal fine sono da considerare significative modificazioni maggiori o uguali a 0,12). Tuttavia in pazienti con sclero-calcinosi parietale grave (come accade spesso nei pazienti diabetici), a causa della difficile o impossibile compressibilità vasale, l'ABI può risultare di scarsa utilità perché, rispettivamente, sovrastimato o non determinabile affatto. Nel primo caso la consapevolezza della probabile sovrastima può essere spesso ottenibile dalle caratteristiche del segnale Doppler. L'ABI dipende dalla sede delle lesioni, nel senso che risulta più sensibile alle lesioni più distali (femorali, poplitee e sottopoplitee) rispetto a quelle più prossimali (iliache). Anzi, in quest'ultimo caso, soprattutto in caso di stenosi monosegmentarie moderate, l'ABI misurato a riposo potrebbe risultare normale.

Proprio per questo motivo la sensibilità dell'ABI può essere incrementata con il *treadmill-test*. L'esercizio determina una fisiologica riduzione delle resistenze con incremento del flusso muscolare e in condizioni normali, grazie alle basse resistenze presenti a livello delle arterie di conduzione, viene incrementato il flusso complessivo dell'arto con conservazione del normale ABI. In caso di ostruzioni emodinamicamente significative l'incremento richiesto non è ottenibile e la vasodilatazione muscolare determina un furto non compensato a carico delle arterie di conduzione a livello delle quali si registra appunto un calo pressorio. Il test prevede la misurazione dell'ABI prima e dopo demambulazione su tappeto scorrevole secondo la procedura di Strandness-Bell (5 miglia/h su un piano inclinato di 12°, per 5 min); noi consigliamo come ideale, tra i protocolli a carico costante, quello che prevede una velocità di 3,0 km/h, per 5 min su un piano inclinato con una pendenza del 10%. Se il paziente è claudicante saranno determinati l'intervallo libero relativo (tempo di comparsa del dolore) e quello assoluto (fino

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

TAB. V. TREADMILL-TEST NELLE ARTERIOPATIE OCCLUSIVE PERIFERICHE

Vantaggi	Svantaggi
semplice	nessuna informazione morfologica
poco costoso	non (adeguatamente) eseguibile in tutti i soggetti
molto utile per valutare la riserva funzionale	non elevatissima specificità (falsi positivi per altre cause)
molto utile per valutare eventuali modificazioni (<i>follow-up</i>)	rileva solo l'o.a.p. «sintomatica»
molto sensibile (ABI post-test) a stenosi «alte» e/o lievi	

all'interruzione del test a causa del dolore). Se è presente un'o.a.p. il calo pressorio, misurato subito al termine del test, ed il tempo di recupero (necessario al ritorno dei normali valori pressori) sono direttamente proporzionali alla gravità dell'ostruzione. Il *treadmill-test* può essere impiegato anche da solo (cioè senza essere finalizzato alla determinazione dell'ABI dopo sforzo): è ciò che accade nei casi di dubbio o presunta *claudicatio*, in cui è determinante stabilire con esattezza se la *claudicatio* c'è e se la causa è verosimilmente vascolare (tab. V).

Nell'eco-Doppler c'è la possibilità, in un'unica apparecchiatura, di poter avere informazioni sulla morfologia vasale e soprattutto (grazie al Doppler pulsato) di poter avere informazioni velocimetriche in un punto preciso dello spazio anatomico identificato attraverso l'ecotomografia. Questo strumento costituisce la massima espressione delle tecniche non invasive potendo permettere un mappaggio sistematico dell'asse arterioso analogamente ad un'arteriografia. Rispetto a questa però, presenta lo svantaggio di un certo grado di dipendenza dall'operatore il quale deve risultare preparato sia sul piano delle conoscenze ecografiche che Doppler-velocimetriche e che pertanto deve necessariamente avere una consolidata esperienza basata su un consistente numero di raffronti arteriografici. L'ausilio di poter rilevare i flussi e poterne analizzare le frequenze mediante mappe colorate (*eco-color-Doppler*) offre inoltre il vantaggio di fornire le due informazioni, quella morfologica e quella velocimetrica, simultaneamente in tempo reale. Ciò permette la rapida repertazione dei flussi nello spazio anatomico nonché la rapida identificazione delle zone di maggiore interesse al fine di determinazioni quantitative (a mezzo dell'analisi spettrale con Doppler pulsato), dal momento che, infatti, l'informazione con scale cromatiche è soltanto semi-quantitativa. La naturale conseguenza è che il colore non porta informazioni aggiuntive rispetto al solo eco-Doppler ma ha il vantaggio di poter ridurre significativamente i tempi di esame (tab. VI).

V. ECOGRAFIA**, *eco-Doppler e color Doppler* (coll. **1723-1729).

Pletismografia

Le tecniche pletismografiche (v. PLETISMOGRAFIA [v.; v.*]) possono sfruttare principi diversi per la misurazione delle variazioni di volume; la fotopletismografia digitale permette di esplorare esclusivamente il microcircolo e pertanto nelle o.a.p. trova limitato impiego: è infatti di ausilio solo nei casi in cui la malattia sia così avanzata da compromettere anche il microcircolo, come nel caso dell'ischemia critica in cui, peraltro, l'appiattimento della curva fotopletismografica rientra nei criteri diagnostici. La *pleismografia ad impedenza* ha trovato il massimo impiego nella diagnosi di trombosi venosa profonda (v.***) ma non nelle o.a.p.

TAB. VI. ECO-(COLOR)-DOPPLER NELLE ARTERIOPATIE OCCLUSIVE PERIFERICHE

Vantaggi	Svantaggi
accurata analisi morfologica (tipo di patologia, sedi, estensione)	relativamente costosa (apparecchio ed operatore)
buona valutazione funzionale (velocimetrie, collateralizzazioni)	«time consuming»
elevata risoluzione spaziale dell'informazione velocimetrica	bassa sensibilità per il microcircolo
ripetibilità	rilevante grado di operatore-dipendenza
spesso utile ai fini di diagnostica differenziale (patologie venose, articolari o muscolari)	

dove invece la pletismografia con *strain-gauge* risulta essere l'unica metodica in grado di misurare realmente il flusso in senso propriamente detto.

Con questa metodica la misurazione del flusso a riposo si è rivelata di scarsa utilità a causa della considerevole variabilità presente non solo tra individui diversi ma anche nello stesso soggetto tra un istante e l'altro, e ciò a dispetto della più rigorosa standardizzazione dei più diversi parametri (posizione, stato muscolare, temperatura ed umidità ambientali, etc.). D'altra parte numerosi sono i meccanismi di controllo del flusso ematico a riposo ed analoghe difficoltà sono state riscontrate anche con l'utilizzo del laser-Doppler nello studio flussimetrico del microcircolo. Tuttavia grazie al test dell'iperemia reattiva (dopo ischemia indotta con pressione superiore di 30 mmHg alla pressione sistolica, mantenuta per circa 3 minuti) è determinabile il picco di flusso che costituisce un parametro utile per valutare la riserva funzionale. La tecnica, essendo l'unica tecnica flussimetrica, presenta un'utilità indiscutibile soprattutto nei programmi di ricerca; tuttavia nella pratica clinica non risulta molto diffusa a causa di una certa lunghezza e laboriosità del test che prevede spesso la necessità di ripetizioni consecutive.

Analoga estrema variabilità esiste anche con la misurazione della *pressione transcutanea di O₂* (TcPO₂) che comporta lunghi tempi di esame e scarsa riproducibilità (a dispetto dei numerosi tentativi di standardizzazione). Alcuni AA. comunque ritengono che la misurazione della TcPO₂ in corso di ischemia critica possa essere prognostica della cicatrizzazione del moncone; così per esempio, nelle amputazioni di gamba questo valore limite sarebbe di 35 mmHg.

Micro-capillaroscopia

La micro-capillaroscopia è tecnica morfologica che esplora esclusivamente lo stato del microcircolo del derma nelle sedi in cui questo risulta meglio rilevabile (letto capillare della plica ungueale); l'importanza di questa tecnica risulta chiara se si pensa che talvolta, in pazienti con o.a.p., la compromissione della cute (e pertanto le lesioni trofiche) non sono sempre correlate con quelle del macrocircolo. Al momento attuale tuttavia la microcapillaroscopia non fornisce dati quantitativi ma solo qualitativi (*classificazione di Maricq*), sebbene a scopo esclusivamente sperimentale, siano già disponibili capillaroscopi che permettono la registrazione quantitativa delle variazioni dei flussi capillari.

Terapia

Occlusione arteriosa acuta

1. *Premessa.* – Il rapido peggioramento di un'insufficienza arteriosa dovuta ad una trombosi sovrapposta ad

una lesione aterosclerotica di vecchia data si verifica nell'11% dei pazienti con patologia aorto-iliaca, nel 27% dei casi di interessamento combinato aorto-iliaco e femoro-popliteo e nel 31% dei pazienti con patologia femoro-poplitea. L'occlusione acuta costituisce la presentazione iniziale di un'o.a.p. nel 6% dei pazienti con lesioni aorto-iliache, nell'8% dei pazienti con lesioni combinate aorto-iliache e femoro-poplitee e nel 27% dei pazienti con lesioni femoro-poplitee.

La sintomatologia di una trombosi acuta a carico di un'arteria ateromasiatica varia entro uno spettro ampio ed è correlata alla rapidità del processo trombotico, alla sede e all'estensione dell'occlusione, all'adeguatezza del circolo collaterale e allo stato emodinamico del paziente. Il fattore principale determinante l'effetto di un'occlusione acuta è rappresentato dall'estensione del circolo collaterale. Il motivo per cui in alcuni individui il circolo collaterale si sviluppa più rapidamente che in altri non è ancora noto. Peraltro da tempo è stato osservato che alcuni distretti corporei possono sviluppare circoli collaterali più rapidamente di altri ed è questo il caso degli arti superiori. Nei pazienti con o.a.p. inveterata e circolo collaterale adeguato un'occlusione acuta focale può ridurre solo transitoriamente la lunghezza dell'intervallo libero di marcia o addirittura passare del tutto inosservata. Nei pazienti che presentano un letto arterioso seriamente compromesso ogni ulteriore occlusione può mettere in serio pericolo l'intero arto.

La diagnosi differenziale tra *trombosi arteriosa* ed *embolismo arterioso* è importante perché il trattamento è spesso differente. Tuttavia una netta distinzione non è sempre agevole nella pratica clinica; l'embolismo su un'arteria sana va sospettato quando un paziente non claudicante presenta sintomi gravi ed acuti di ischemia periferica e può contemporaneamente essere individuata una sorgente embolizzante. La fibrillazione atriale, generalmente secondaria a cardiopatia reumatica o ischemica, è la causa principale di embolia periferica; l'incidenza della fibrillazione atriale aumenta con l'aumentare dell'età e così in soggetti anziani è molto spesso difficile determinare la causa precisa (trombotica o embolica) dell'occlusione. Una trombosi occludente in un'arteria ateromasiatica è la diagnosi più verosimile nel caso di pazienti con storia di *claudicatio intermittens* o nel caso di pazienti che presentino ipostigmia e soffi a carico delle arterie prossimali all'occlusione o a carico dell'arto controlaterale.

2. Trattamento dell'embolismo arterioso acuto in arterie sane. – Questa costituisce la causa predominante di o.a.p. acuta in pazienti giovani con fibrillazione atriale o con protesi valvolari cardiache. Il trattamento standard si basa nella rimozione meccanica dell'embolo occludente mediante *catetere di Fogarty* che avviene solitamente in anestesia locale. In tal modo la percentuale di arti salvati è vicina al 90%. I migliori risultati sono stati ottenuti in pazienti sottoposti ad embolectomia precoce; infatti oltre 6-8 ore dall'evento acuto risulta molto difficile ripristinare con successo il normale flusso e ciò è probabilmente imputabile alla propagazione del trombo all'interno delle diramazioni laterali del tronco arterioso principale nonché all'elevato rischio di retrombosi. È perlopiù controindicata l'embolectomia oltre le 72 ore dall'evento acuto.

In aggiunta alle tecniche consolidate di embolectomia chirurgica o con catetere di Fogarty si sta sviluppando una nuova tecnica che è l'*embolectomia per aspirazione percutanea*. Gli studi preliminari indicano come questa metodica presenti una percentuale di successi analoga a quella ottenibile con Fogarty ma con il vantaggio di minori complicanze (la mortalità a 30 giorni è solo del 3,9%), sia di semplice esecuzione e di minima invasività; associ la procedura

diagnostica a quella terapeutica e permetta il trattamento anche dei vasi tibiali posteriori e pedidii.

Ad una rivascolarizzazione può far seguito un edema rilevante dell'arto dovuto ad una trasudazione attraverso le membrane capillari la cui permeabilità è aumentata a causa dell'ipossia. L'edema grave può danneggiare ulteriormente i muscoli, i nervi e i vasi a causa della compressione esercitata nei compartimenti fasciali (iperpressione compartimentale). Una brusca compromissione dello stato generale, qualora intervenga, è probabilmente correlata alla dismissione di metaboliti quali l'acido lattico (che riduce il pH) ed il potassio (che può provocare aritmia e morte) (v. RIVASCOLARIZZAZIONE, SINDROME DA**). L'eparina va somministrata al più presto, non appena formulata la diagnosi e il trattamento con anticoagulanti orali (debitamente embricato con quello eparinico) va iniziato poco dopo l'intervento; il trattamento a lungo termine con anticoagulanti orali in queste condizioni è ancora controverso (fatta eccezione per i pazienti portatori di protesi valvolari o con fibrillazione atriale cronica, dove è sempre indicato).

3. Trattamento dell'occlusione acuta su arterie ateromasiatiche. – La maggior parte delle trombosi arteriose, e probabilmente la maggior parte degli emboli arteriosi, si sovrappongono ad una placca ateromasiatica nel contesto di un circolo arterioso già compromesso. Nella maggior parte dei casi la *procedura con catetere di Fogarty* deve essere tentata con precedenza assoluta e senza ritardi. Una trombosi *in situ* a livello di una stenosi ateromasiatica non risponderà bene all'embolectomia di Fogarty e, anche nel caso di un embolo, la *rimozione con il catetere a palloncino* può provocare la lesione di placche non occludenti così da condurre poi ad una precoce restenosi dopo l'iniziale successo chirurgico. Per tale motivo è opportuno quantificare l'estensione della patologia occlusiva ed il deflusso distale (detto «run-off») sulla base di un'arteriografia preoperatoria. Tuttavia, in pazienti con occlusione acuta ed arto dolente e pallido, le possibilità di visualizzare i vasi di deflusso sono ben poche a causa della scarsa replezione del circolo collaterale e del possibile arteriospasma associato. Se la procedura di Fogarty fallisce o è controindicata, devono essere prese in considerazione, in rapporto al quadro arteriografico e al grado di imminenza di perdita dell'arto, l'endarterectomia localizzata con trombectomia (*tromboendarteriectomia*; TEA) e la resezione con reimpianto oppure con *bypass*. I risultati con TEA della trombosi arteriosa acuta dell'arto sono piuttosto insoddisfacenti, con una percentuale di conservazione dell'arto del 55% ed una mortalità del 39% entro 30 giorni dall'intervento (per tale motivo è attualmente caduta in disuso). I fattori di rischio associati alla mortalità sono l'età superiore agli 80 anni ed il fallimento del salvataggio dell'arto.

Se il tentativo chirurgico si reputa non fattibile, per es. nel caso di occlusioni multiple o di insufficiente *run-off* distale, può essere tentato il *trattamento trombolitico* (v. FIBRINOLITICI FARMACI*). La percentuale di successo in termini di conservazione dell'arto e di mortalità dipende in gran parte dall'estensione dell'occlusione trombotica e dal tempo intercorso tra l'evento acuto e il trattamento, che non dovrebbe superare i 10 giorni. Anche la dose e la via di somministrazione dell'agente trombolitico prescelto sono importanti in termini di efficacia e di rischio emorragico.

Premettendo che il trattamento trombolitico per via endovenosa in questi pazienti è stato rapidamente abbandonato dopo le prime sperimentazioni, oggi viene comunemente impiegata la *trombolisi intrarteriosa locoregionale*. L'infusione locale assicura infatti alte concentrazioni in un limitato distretto arterioso per ottenere una trombolisi ottimale proprio nella sede dell'occlusione e, una volta rag-

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

giunto lo scopo, permettere di eseguire un'ulteriore trombolisi più distalmente, minimizzando il rischio di complicanze emorragiche associate con la fibrinolisi sistemica mediante una riduzione della dose dell'agente trombolitico.

Recentemente Ouriel *et al.* (1998) hanno impiegato urochinasi ricombinante, mediante cateterismo diretto intrarterioso, nella fase iniziale di un'ostruzione arteriosa acuta degli arti inferiori, ottenendo la riduzione delle procedure chirurgiche a cielo aperto.

La durata del trattamento è condizionata dalla risposta individuale del paziente: per un trombo di piccole dimensioni un'infusione di durata limitata da 1 a poche ore può essere sufficiente ad ottenere una lisi completa, ma un'occlusione estesa può richiedere alcuni giorni di trattamento. Oltre che con la valutazione clinica ed i test non invasivi, la progressione della lisi del trombo viene controllata ogni 12-24 ore con angiografia via catetere. Non appena si ottiene una lisi parziale del trombo, il catetere viene fatto progredire all'interno del trombo residuo continuando l'infusione. Il trattamento trombolitico va considerato inefficace, e quindi va interrotto, se dopo 24-48 ore non si osserva alcuna trombolisi. Sebbene l'argomento sia ancora oggetto di discussione è opportuno l'uso concomitante di farmaci antitrombotici allo scopo di prevenire lo sviluppo del tromboembolismo da catetere. A tal fine è opportuna la somministrazione contemporanea di eparina per via endovenosa piuttosto che per via endoarteriosa.

Dopo esito favorevole alcuni AA. cominciano (o continuano) il trattamento con l'aspirina mentre altri preferiscono l'eparina a dosi individualizzate seguita dai dicumarolici. Lo schema classico di impiego della streptochinasi è di 5000 U/h previo bolo iniziale di 20.000 U, o rapida infusione iniziale di 2000 U/min per 20 minuti. L'urochinasi (per la quale esiste un numero esiguo di esperienze) negli U.S.A. viene impiegata a 240.000 U/h fino a che non si ottiene una ricanalizzazione iniziale dopodiché si passa a 60.000-120.000 U/h fino a lisi completa, mentre altri impiegano una dose iniziale di 75.000-100.000 U, seguita da infusione di 440 U/kg/h. L'rt-PA (attivatore tissutale ricombinante del plasminogeno), nell'ambito delle occlusioni arteriose acute, è stato ancora solo limitatamente sperimentato, con dosi variabili da 0,25 a 10 mg/h.

Le esperienze cliniche di trombolisi locale nell'ischemia acuta degli arti sono comunque complessivamente ancora limitate. Le percentuali di successo pertanto differiscono largamente essendo comprese tra il 25 ed il 50%. L'occlusione aorto-iliaca è più suscettibile di trombolisi rispetto all'occlusione poplitea e la trombolisi appare più efficace nei pazienti non ancora sottoposti a chirurgia vascolare e nei pazienti con *bypass* venoso autologo piuttosto che protesico. In seguito a lisi completa o parziale si osserva in genere un immediato miglioramento clinico, ma la conservazione dell'arto non può essere conseguita in tutti i pazienti a causa o dell'assenza

di vasi di deflusso o dell'ischemia irreversibile, nel caso che la circolazione venga ripristinata con troppo ritardo. Nelle principali casistiche la recidiva della trombosi è la principale ragione del fallimento. La maggior parte degli AA. insiste sulla necessità di valutare attentamente la possibile lesione etiologica sul radiogramma post-lisi e di far seguire a completamento o la PTA (angioplastica percutanea transluminale) o procedure chirurgiche idonee a migliorare ulteriormente la circolazione e a prevenire la retrombosi precoce. Seguendo questo schema la frequenza delle amputazioni può essere ridotta, e ciascuna amputazione può probabilmente essere praticata ad un livello più distale.

La trombolisi non va assolutamente effettuata nelle seguenti condizioni: 1) se l'arto è peggiorato nonostante il tentativo di salvataggio poiché la riperfusione del tessuto muscolare necrotico può essere causa di mioglobinuria e di insufficienza renale acuta; 2) se l'opzione chirurgica risulta più indicata come ad es. in caso di ischemia acuta severa con compromissione neurologica in cui l'intervento comporta certamente una più rapida rivascolarizzazione; 3) se la terapia risulta pericolosa (ad es. in presenza di diatesi emorragiche) oppure se è stata impiegata una protesi retroperitoneale in Dacron che potrebbe divenire permeabile e produrre emorragie retroperitoneali silenti.

Per una ampia trattazione della *chirurgia* applicata alle occlusioni aorto-iliache, si rinvia alla voce AORTO-ILIACHE OCCLUSIONI**.

Terapia delle ostruzioni croniche

Il primo approccio terapeutico consiste nella rimozione, per quanto possibile, dei fattori di rischio (potendo l'iperlipidemia, l'ipertensione ed il diabete necessitare dei relativi trattamenti farmacologici specifici oltre ai singoli presidi dietetici). Con la crescente evidenza del ruolo piastrinico nel determinismo dell'o.a.p. (e più in generale dell'aterosclerosi) sono stati effettuati, e sono tuttora in corso, numerosi studi clinici sull'impiego dei farmaci anti-piastrinici in questo contesto (tabb. VII e VIII).

Dai dati complessivi attualmente disponibili emerge chiaramente che l'aspirina e la ticlopidina sono efficaci nella prevenzione dell'aggravamento (ma non dell'insorgenza) e nel trattamento dell'o.a.p. Tali farmaci si sono comunque dimostrati in grado di prevenire la riocclusione sia di *bypass* protesici, sia dopo PTA. Relativamente ai sintomi, soltanto per la ticlopidina è stata dimostrata un'efficacia diretta mediante un miglioramento della capacità funzionale valutata attraverso l'intervallo libero di marcia. L'efficacia di nuovi anti-piastrinici (acidi grassi polinsaturi, inibitori recettoriali,

TAB. VII. FARMACI AD AZIONE ANTIPIASTRINICA IMPIEGATI NELLE ARTERIOPATIE OCCLUSIVE PERIFERICHE

	Meccanismo d'azione proposto	Dosaggio	Effetti avversi
aspirina	inibisce irreversibilmente la ciclo-ossigenasi	75-325 mg <i>die</i> o a giorni alterni	emorragie digestive, nausea, costipazione, dolore addominale
ticlopidina	inibisce il legame delle macromolecole alla GP IIb-IIIa durante aggregazione	250 mg/12 ore	neutro-piastrinopenia, nausea, rash, diarrea, emorragie
iloprost	attiva l'adenilciclasi a mezzo di specifico recettore piastrinico	0,5-2 ng/kg/min in infusione	ipotensione, flushing, cefalea, nausea, diarrea
dipiridamolo	inibisce la fosfodiesterasi e l'uptake dell'adenosina; aumenta l'effetto di PGI ₂	75-400 mg <i>die</i> in 3 somministrazioni	cefalea, nausea, rash, vertigini
ketanserina	antagonista della serotonina a livello dei recettori 5-HT ₂ piastrinici	40-120 mg <i>die</i> in 2-3 somministrazioni	vertigini, edema, astenia, aritmie, secchezza fauci
pentossifillina	stimola la secrezione di PGI ₂ dall'endotelio e inibisce l'AMP piastrinico	600-1200 mg <i>die</i> in 3 somministrazioni	nausea, vomito, dispepsia, cefalea, vertigini

TAB. VIII. SITUAZIONI CLINICHE IN CUI IL TRATTAMENTO ANTIPIASTRINICO È DI PROBABILE BENEFICIO

Situazione clinica	Farmaco e trial di riferimento
Prevenzione primaria dell'o.a.p.	nessuno
Prevenzione primaria del trattamento chirurgico	aspirina (Goldhaber, 1992)
Prevenzione secondaria della progressione dell'o.a.p.	aspirina e dipiridamolo (Hess, 1985)
Trattamento della <i>claudicatio</i> con miglioramento dell'intervallo libero di marcia	ticlopidina (Arcan, 1988; Balsano, 1989; Cloarec, 1986)
Prevenzione della riuclusione di <i>bypass</i> protesico sotto-inguinale	aspirina (Green, 1982); aspirina e dipiridamolo (Green, 1982; Clyne, 1987; Goldman, 1983)
Prevenzione di eventi coronarici e cerebrali in pazienti con o.a.p.	aspirina (A.T.C. * I, 1994) ticlopidina (Boissel, 1989; Janzon, 1990; Blanchard, 1993) (*Antiplatelet Trialists' Collaboration)

inibitori della fosfodiesterasi, inibitori del trombossano A_2 , etc.) è tuttora in studio.

In pazienti con ischemia cronica di tipo critico la scelta terapeutica prioritaria è indiscutibilmente quella della *rivascolarizzazione chirurgica e/o con catetere*. L'approccio chirurgico permette il salvataggio di una considerevole percentuale di arti che diversamente sarebbero amputati. Le tabb. IX e X mostrano i risultati delle varie procedure nelle diverse sedi anatomiche.

In pazienti con ischemia critica cronica non suscettibili di alcuna procedura di rivascolarizzazione, oppure nei casi di fallimento della stessa, l'ovvia insufficienza della sola correzione dei fattori di rischio e dell'istituzione di antiplastrinici, ha portato ad ulteriori approcci medici; se esiste un certo razionale all'incremento della pressione sistemica, all'ossigenoterapia iperbarica (v. IPERBARICA TERAPIA**), all'eparina, all'emodiluizione, al blocco simpatico e alla stimolazione epidurale, da un punto di vista strettamente scientifico nessuno di questi approcci si è dimostrato efficace in questo contesto. Dal *Consensus Document* sull'ischemia critica cronica del 1991, la revisione degli studi clinici che hanno impiegato prostanoïdi (Iloprost e PGE_1) con somministrazioni intermittenti e.v. quotidiane per almeno 2 settimane e con *follow-up* a 6 mesi, ne dimostra l'efficacia sia nel ridurre il dolore a riposo, sia nell'accelerare la guarigione delle ulcere e sia nel ridurre la percentuale di amputazioni maggiori (al di sopra della caviglia). Le limitazioni all'uso di prostanoïdi risiedono nella breve

durata d'azione, nella necessità di somministrazione endovenosa e nel costo relativamente elevato. La ripetizione di cicli terapeutici con prostanoïdi non è di provata efficacia.

Un'ulteriore possibilità è fornita dalla *terapia trombolitica locoregionale* (v. sopra): la sperimentazione della trombolisi in questo ambito è ancora molto limitata sebbene la diffusione della PTA susciti un crescente interesse verso questo tipo di approccio. Uno studio prospettico randomizzato e multicentrico in corso negli U.S.A. (STILE) ha lo scopo di chiarire la questione se la rivascolarizzazione chirurgica con *bypass* femoro-popliteo e femoro-distale presenti vantaggi sulla terapia trombolitica locoregionale associata o meno a PTA in pazienti con occlusione arteriosa non embolica e occlusione di *bypass* con sintomi presenti da almeno 6 mesi; lo schema trombolitico prevede l'impiego di rt-PA alla dose di 0,1 mg/kg/h per 4-8 ore o urochinasi alla dose di 250.000 U. in bolo seguita da infusione di 4000 U./min per 4 ore e 2000 U./min per 4-16 ore, con contemporanea somministrazione di eparina a 1000 U./ora.

Le complicanze della terapia trombolitica loco-regionale sono: sanguinamento nel sito di iniezione (10-30%, peraltro di modesta entità e facilmente controllabile); emorragie a distanza per attivazione della fibrinolisi sistemica (3-5% dei pazienti di cui emorragie digestive o intracraniche ma solo pochissimi casi di emorragie letali); embolizzazione periferica (nel 10% dei casi) dovuta alla lisi del trombo principale con possibile dolore ed obiettività a livello distale, quadro perlopiù del tutto transitorio; le manipolazioni del catetere

TAB. IX. TIPI DI BYPASS E PERCENTUALI (MEDIE DELLA LETTERATURA) DI PERVIETÀ AL FOLLOW-UP

Bypass	1 anno	3 anni	4 anni	5 anni
aorto-iliaco e aorto-femorale	96%	91%	—	86%
iliaco-femorale	87%	81%	—	77%
femoro-femorale	89%	74%	—	65%
axillo-unifemorale	50%	44%	—	24%
femoro-popliteo (sopra il ginocchio) su safena autologa invertita	84%	73%	69%	—
femoro-popliteo (sopra al ginocchio) in PTFE	79%	66%	60%	—
femoro-popliteo (sotto il ginocchio) su safena autologa invertita	84%	78%	77%	—
femoro-popliteo (sotto il ginocchio) su vena in situ	80%	73%	68%	—
femoro-popliteo (sotto il ginocchio) in PTFE	68%	44%	40%	—
sotto-popliteo su safena invertita	77%	66%	62%	—
sotto-popliteo su vena in situ	82%	74%	68%	—
sotto-popliteo in PTFE (politetrafluoroetilene)	46%	—	21%	—

OCCLUSIONI ARTERIOPATICHE PERIFERICHE

TAB. X. PTA (ANGIOPLASTICA PERCUTANEA TRANS-LUMINALE) E PERCENTUALI (MEDIE DELLA LETTERATURA) DI PERVIETÀ DURANTE FOLLOW-UP

PTA	1 anno	2 anni	3 anni	4 anni	5 anni
aorto-iliaca	85%	79%	75%	68%	66%
femoro-poplitea	79%	70%	63%	59%	56%

comportano di per sé altri rischi quali trombosi, pseudo-aneurismi iatrogeni, dissezione della parete, spasmo vasale, trombosi pericateretere (nel 25% dei casi, dipendentemente anche dal tempo di infusione e dalle dimensioni del catetere). Complessivamente, al momento attuale la problematica principale connessa con l'impiego della trombolisi locoregionale appare quella dell'identificazione dei pazienti in cui questo approccio può essere di prima scelta rispetto alle altre procedure meglio standardizzate. Per tale motivo sono tuttora in corso studi più ampi per valutare i risultati a lungo termine nonché studi comparativi di efficacia tra i vari agenti trombolitici attualmente disponibili.

Arteriopatie ostruttive periferiche nei pazienti diabetici

Le informazioni epidemiologiche dei rapporti tra o.a.p. ed intolleranza ai carboidrati sono riportate all'inizio di questa voce. I pazienti diabetici con o.a.p. mostrano, rispetto ai pazienti con o.a.p. non diabetici, un prevalente interessamento per il distretto tibiale rispetto a quello aorto-iliaco; nell'ambito del distretto tibiale inoltre sarebbe spesso più frequente e più grave la compromissione del distretto tibiale posteriore rispetto a quello tibiale anteriore e peroneale. Questa tendenziale predilezione per le arterie di medio e piccolo calibro spiega perché il diabete sia tra le cause maggiori di diagnosi differenziale con la malattia di Buerger. Tipico inoltre del paziente diabetico è l'interessamento del microcircolo, che è ben spiegato dalla nota microangiopatia pluridistrettuale che caratterizza anche alcune gravi complicanze del diabete (nefropatia, retinopatia, neuropatia). Questo aspetto spesso può prevalere nettamente sull'interessamento dei grossi vasi (macroangiopatia) e far sì che la diagnosi di o.a.p. venga fatta non di rado quando il paziente è direttamente allo stadio IV (lesioni trofiche distali). Ciò in definitiva si traduce in un tendenziale ritardo, in questa popolazione, della diagnosi di o.a.p. A questo ritardo può inoltre contribuire anche il già menzionato problema diagnostico-strumentale: la frequente sclero-calcosi della tunica media della parete vasale (determinata probabilmente dalla microangiopatia a livelli dei *vasa-vasorum*) è causa della sovrastima dell'ABI, fenomeno che si rende evidente solo quando, al grado estremo, non permette il collabimento arterioso nemmeno per pressioni = 300 mmHg. Tale fenomeno si traduce nella possibilità di sottostimare la prevalenza di o.a.p. in questa popolazione, nel caso questa venga «screenata» con il solo Doppler.

Nei diabetici le gangrene dello stadio IV (e più in generale anche le piccole lesioni trofiche) risultano frequentemente umide (e non secche) a causa delle frequenti concomitanti infezioni batteriche, spesso responsabili anche di osteomieliti fruste.

Ciò che di rilevante emerge dalla gran parte delle osservazioni è che non vi è rapporto tra grado di iperglicemia e grado di arteriosclerosi né, spesso, tra controllo glico-metabolico e possibilità di prevenire l'arteriosclerosi o la sua progressione. Va precisato che quest'ultima asserzione in particolare si riferisce alla macroangiopatia del diabete

tipo II (NIDDM) dal momento che un recente studio effettuato negli U.S.A. (DCCT) ha dimostrato che, in pazienti con diabete mellito tipo I (IDDM), una terapia insulinica che mantenga la glicemia entro valori rigorosamente normali riduce significativamente l'insorgenza delle complicanze vascolari (micro- e macroangiopatiche). Un buon controllo della glicemia è comunque certamente efficace sulla microangiopatia, indipendentemente dal tipo di diabete. Non è chiaro se vi siano differenze ai fini dell'insorgenza dell'o.a.p., tra il trattamento con ipoglicemizzanti orali o con insulina: secondo alcuni AA. vi sarebbe infatti una lieve riduzione della cardiopatia ischemica nei trattati con insulina, ma non mancano descrizioni opposte. Anche a tal proposito sono tuttora in corso studi prospettici.

Malattia di Buerger o tromboangioite obliterante

A causa di una scarsa capacità di riconoscere questa entità nosologica, favorita sia da una ridotta conoscenza ed applicazione dei rigidi criteri diagnostici, sia da una bassa prevalenza, la malattia di Buerger (v. TROMBOANGIOITE OBLITERANTE) è stata spesso oggetto di controversie e la sua stessa esistenza è stata anche messa in dubbio da AA. accreditati. Per tale motivo la patologia è stata criticamente riesaminata di recente ed è emerso che molte pubblicazioni precedenti gli anni '60 includevano erroneamente molti casi di aterosclerosi precoce, collagenopatie fruste o stati trombofilici. Esistono invece forti evidenze che la malattia di Buerger esista come entità nosologica autonoma sia dal punto di vista clinico che fisiopatologico. Essa infatti non è affatto una variante dell'aterosclerosi, è caratterizzata da occlusioni trombotiche segmentarie delle arterie di medio e piccolo calibro degli arti superiori ed inferiori con integrità della membrana elastica interna (che la differenzia istologicamente sia dall'arteriosclerosi che dalle arteriti). Sempre istologicamente è caratteristico il brusco passaggio tra parete sana e malata; inoltre l'alta frequenza (35-50%) con cui è evidenziabile il coinvolgimento degli arti superiori (presente nel 90% dei casi ad un'analisi strumentale) è un altro importante elemento differenziante; è frequentemente associata a flebite superficiale migrante (30%) e a fenomeno di Raynaud (40%). Sebbene si verifichi prevalentemente in giovani uomini fumatori, si osserva anche nelle donne. La prevalenza della malattia di Buerger si è ridotta nel Nord America negli ultimi 30 anni mentre continua ad essere stabile nell'Europa dell'Est, in Medio Oriente e in Asia. Con casistiche che rispettano rigorosamente i criteri diagnostici è evidente una chiara localizzazione geografica: di tutti i pazienti con sintomi di ischemia degli arti, la malattia di Buerger è responsabile dello 0,75%, del 3,3% e del 16,6% rispettivamente, negli U.S.A., in Polonia e in Giappone. L'età media è di 34 anni ed il rapporto M/F è 7,5:1.

I criteri diagnostici sono elencati nella tab. XI.

L'etiologia è sconosciuta (non è stata documentata un'allergia al tabacco, né trombofilie note, né agenti infettivi) ma studi radioisotopici dimostrano una compromissione del microcircolo che appare molto precoce; esiste comunque una evidentissima associazione con l'uso del tabacco (fumato, ma anche masticato o inalato) con cui, peraltro, la progressione stessa della malattia è chiaramente correlata. Dagli studi epidemiologici il tabacco risulta tuttavia un fattore soltanto permissivo. Sono state descritte numerose anomalie sierologiche (anticorpi anti-collagene), forti associazioni HLA ed altre alterazioni dell'immunità cellulare ed umorale, ma è probabile che si tratti di epifenomeni della risposta infiammatoria della parete vasale.

L'astensione dal fumo è il principale provvedimento terapeutico; l'impiego di antiaggreganti (per i quali esiste almeno il razionale dato dalla natura trombotica del feno-

TAB. XL CRITERI DIAGNOSTICI PER LA MALATTIA DI BUERGER

Maggiori

- esordio come ischemia distale degli arti, prima dei 45 anni di età
- abuso di tabacco
- esclusione di:
 - embolismo (cuore, aneurismi, sindrome dell'egresso toracico)
 - traumi e lesioni locali (*entrapments*, degenerazioni cistiche avventiziali)
 - malattie autoimmuni
 - trombofilie
 - aterosclerosi
 - diabete
 - iperlipidemia
 - insufficienza renale
 - ipertensione
- integrità delle arterie a monte della poplitea o della brachiale distale
- documentazione oggettiva dell'oclusione distale
 - pletismografia dei quattro arti
 - arteriografia
 - istologia

Minori

- flebite superficiale migrante
- fenomeno di Raynaud
- coinvolgimento degli arti superiori
- claudicatio di piede

meno) non risulta di dimostrata efficacia. Talvolta il contemporaneo fenomeno di Raynaud potrebbe richiedere l'impiego di calcioantagonisti. L'impiego di farmaci emoreologici, come la pentossifillina, può essere di ausilio nell'accelerare la guarigione delle lesioni trofiche; la simpaticectomia non ha alcuna indicazione sia perché l'eventuale miglioramento è del tutto transitorio sia perché non influisce affatto sulla storia naturale che prevede la necessità di amputazioni minori (dita, avampiede) o maggiori (sopra la caviglia) rispettivamente nel 20% e nel 25% dei casi durante il corso della malattia. La mortalità è tuttavia identica a quella della popolazione normale.

Bibliografia

- Agnelli G., *Trombolysis Yearbook*, 1996, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Arcan J. C. et al., *Angiology*, 1988, **39**, 802-811.
- A.T.C.I., *Br. Med. J.*, 1994, **308**, 81-106.
- Balsano F. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 1989, **114**, 84-91.
- Bernstein E. F., *Noninvasive diagnostic techniques in vascular disease*, 1982, Mosby, St. Louis.
- Boissel J. P. et al., *Thromb. Haemost.*, 1989, **62**, 681-685.
- Blanchard J. et al., *Nouv. Rev. Haematol.*, 1993, **35**, 523-528.
- Cloarec M. et al., *Thromb. Res.*, 1986, **42** (Suppl. 6), 160.
- Clyne C. A. C. et al., *Br. J. Surg.*, 1987, **74**, 246-248.
- Criqui M. et al., *Circulation*, 1985, **71** (3), 516-522.
- Dalsing M. C. et al., *J. Vasc. Surg.*, 1995, **21**, 127-134.
- DCCT Research Group, *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 977-986.
- II European Consensus Document on Chronic Critical Leg Ischemia, *Circulation*, 1991, **84** (Suppl. IV), 1.
- Fowl R. J., Kempeziński R. F., *Sem. Vasc. Surg.*, 1994, **7** (3), 132-138.
- Goldhaber S. Z. et al., *Lancet*, 1992, **340**, 143-145.
- Goldman M. et al., *Br. J. Surg.*, 1983, **70**, 635-638.
- Green R. M. et al., *Surgery*, 1982, **92**, 1016-1026.
- Hess H. et al., *Lancet*, 1985, **i**, 415-419.
- Hiatt W. R. et al., *Circulation*, 1995, **92**, 614-621.
- Janzon L. et al., *J. Int. Med.*, 1990, **277**, 301-308.
- Loosemore T. M. et al., *Int. Angiol.*, 1994, **13**, 133-142.
- Mann A., *Hypertension: psychological aspects and diagnostic impact in a clinical trial*, *Psychological Medicine*, Monograph Supplement 1984, **5**, 1.
- Ouriel K. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 1105-1111.
- Pourcelot L., *L'esame Doppler dei vasi periferici*, 1987, SEU, Roma.
- The Aris Investigators, *Am. J. Epidemiol.*, 1989, **129**, 687-702.
- Verhaeghe R., Bounameaux H., *Peripheral arterial occlusion, throm-*

OCULOPLASTICA CHIRURGICA PALPEBRALE

- boembolism and antithrombotic therapy*, in Fuster V., Verstraete M. eds., *Thrombosis in cardiovascular disease*, 1992, Saunders, Philadelphia, pp. 423-449.
- Wagner H. J., Stark E. E., *Radiology*, 1992, **182**, 403-407.
- Yao J. S. T., *Br. J. Surg.*, 1970, **57**, 761.

STEFANO RADICCHIA E GIANCARLO AGNELLI

OCULOPLASTICA CHIRURGICA PALPEBRALE

F. chirurgie plastique des paupières. - I. eyelid plastic surgery.

SOMMARIO

Introduzione e notizie generali (col. 4138). - **Principi generali di chirurgia palpebrale** (col. 4138). - **Tipi di anestesia in chirurgia plastica orbitopalpebrale** (col. 4139). - **Chirurgia estetica di alterazioni da senescenza della regione orbitopalpebrale** (col. 4139): *Lifting frontale*. - *Lifting temporale*. - *Mask lift*. - *Blefaroplastiche inferiori*. - **Chirurgia plastica delle palpebre nelle lesioni da traumi** (col. 4141): *Etiologia ed esame obiettivo dei traumi palpebrali*. - *Trattamento chirurgico*. - *Lembi e innesti utilizzati in chirurgia palpebrale plastica*. - *Trattamento delle perdite di sostanza palpebrale*. - **Note di chirurgia plastica delle ustioni palpebrali** (col. 4144). - **Cenni di chirurgia plastica di sequele e complicanze delle lesioni palpebrali da traumi o ustioni** (col. 4145).

Introduzione e notizie generali

La chirurgia estetica della regione orbitopalpebrale è più spesso una chirurgia della senescenza, meno spesso una chirurgia riparatrice dei traumatismi o delle neoplasie di tale regione. La chirurgia estetica comporta un risvolto psicologico: il paziente dovrà esprimere pertanto non soltanto quello che si aspetta, ma anche ciò che assolutamente non vuole. È necessario che il chirurgo abbia cura di spiegargli sia le modalità tecniche dell'intervento sia gli inconvenienti delle sequele e anche quali possono essere le complicanze.

La chirurgia dei traumatismi è invece per lo più vera chirurgia d'urgenza. La chirurgia delle neoplasie palpebrali, d'altra parte, richiede di salvaguardare il più possibile gli aspetti estetici escidendo completamente la neoformazione onde evitare recidive e/o metastatizzazioni locali.

L'ospedalizzazione per interventi di oculoplastica chirurgica palpebrale [o.c.p.] è di solito breve: sovente è ridotta ad una sola giornata, in particolare per le blefaroplastiche isolate, mentre per i *lifting* frontali e della faccia la dimissione è autorizzata per il giorno dopo. Per i traumatismi il ricovero può durare per più tempo. Vengono prescritte medicazioni antiedemigene per una settimana e la maggior parte dei pazienti può riprendere un'attività sociale normale entro 10-15 giorni dall'intervento. È opportuno avviare i pazienti che i fini caratteri dell'espressione del viso verranno acquisiti dopo 2-3 mesi. In effetti, soprattutto nel caso di blefaroplastiche inferiori, persiste per un certo tempo una rigidità delle palpebre che riduce per qualche settimana l'espressività dello sguardo.

Principi generali di chirurgia palpebrale

Qualunque sia lo stato contusivo delle parti molli circostanti a una ferita recente della faccia, occorre essere il più possibile conservatori ed asportare al minimo per riparare al meglio i danni traumatici; i tessuti sopravvivono a lungo e, tenuto conto della ricca vascularizzazione, le infezioni sono eccezionali.

La vascularizzazione facciale e palpebrale è così ricca da poter permettere innesti autoplastici audaci utilizzando lembi molto allungati con peduncolo stretto senza rischio. La riparazione autoplastica delle parti molli deve essere sempre preceduta dalla riduzione degli elementi ossei sottostanti. In effetti, la ricostruzione cutanea rischia di retrarsi su uno scheletro deformato e impedisce ulteriormente la ricostruzione del piano osseo.

Le cicatrici della faccia devono tenere conto delle linee naturali del viso (linee di Langer).

La cute palpebrale ha una trama molto fine e una colorazione particolare. La sua ricostruzione deve pertanto beneficiare dei lembi locali; gli innesti dermo-epidermici danno risultati eccellenti ma hanno tendenza a retrarsi; gli innesti di cute totale si retraggono molto meno.

La nozione di unità territoriale della faccia sulla quale ha insistito G. Ulloa è essenziale: occorre sostituire la totalità territoriale piuttosto che effettuare sostituzioni parziali. Un innesto di palpebra totale sarà molto più estetico di quello di una sola metà (Delmar, 1994).

Il chirurgo deve tenere conto della motilità del viso e delle palpebre ed evitare le lesioni del nervo facciale.

Nella riparazione palpebrale vanno, inoltre, osservate le seguenti linee guida: *a)* rispettare la riparazione piano per piano; *b)* evitare la tensione eccessiva palpebrale mediante cantotomia esterna, quando esiste una perdita di sostanza; *c)* tener conto che si può utilizzare fino ad $\frac{1}{4}$ della lunghezza della palpebra in caso di ricostruzione; *d)* ricercare i punti coniugati palpebrali che devono servire come punti di repere anatomici: fornice, puntini lacrimali, caruncola, piega palpebrale superiore, bordi periferici, solco ciliare, linea grigia e commessura esterna; *e)* volgere particolare attenzione alle vie lacrimali, al muscolo elevatore della palpebra superiore.

In tutti i tipi di chirurgia palpebrale valgono, infine, le seguenti regole generali: *a)* praticare un'asepsi rigorosa; *b)* eliminare tutti i corpi estranei e tessuti necrotici; *c)* trattare le eventuali lesioni associate del globo oculare prima di quelle degli annessi; *d)* verificare l'integrità ossea orbitaria; *e)* agire per lo più precocemente, a meno che le condizioni generali del paziente siano precarie, nel qual caso conviene differire l'intervento: si possono aspettare uno o due giorni e se esiste un rischio di esposizione corneale va posto un filo di trazione tra le due palpebre (o dei cerotti), a partenza dalla zona meno lesa o con minori fatti reattivi.

Tipi di anestesia in chirurgia plastica orbitopalpebrale

La durata dell'intervento non è sempre prevedibile e il progetto operatorio non sempre realizzabile. La possibilità di un sanguinamento a livello delle vie aeree impone un *packing*. L'impiego del bisturi elettrico vieta il ricorso agli anestetici di superficie.

L'anestesia locale è indicata nella chirurgia ambulatoriale dell'adulto e nei tempi intermedi poco importanti (ritocco, sezione o trasposizione di lembi). Si usa xilocaina 1-2% associata ad adrenalina 1% (1 mg $\times$ 100 ml di soluzione).

L'anestesia regionale (tronculare) è poco impiegata. Consiste nel bloccare i tronchi nervosi profondi (più frequentemente: nervo nasociliare sensitivo; nervi oculomotori al fondo dell'orbita; nervo facciale che innerva le palpebre; nervi extraconici sensitivi; nervo sottorbitario). L'anestesia del tarso per via posteriore a livello del bordo periferico si può usare in caso di calazio, cisti, ptosi.

L'anestesia generale causa un aumento del rischio di sanguinamento e necessita talvolta il ricorso ad infiltrazioni di adrenalina.

V. anche: ANESTESIA CHIRURGICA (v.; v.*; v.**); OCCHIO**, anestesia in oculistica (coll. **4103-4110).

Chirurgia estetica di alterazioni da senescenza della regione orbitopalpebrale

L'endoscopia ha rivoluzionato la tecnica chirurgica plastica. Infatti, se una volta si era reticenti a proporre un *lifting* frontale o un *lifting* temporale a causa dell'importante cicatrice che si creava, oggi questi interventi possono essere decisi con minori preoccupazioni vista l'assenza della cicatrice (v. anche CHIRURGIA ESTETICA**, col. **1150). Si tratta, tuttavia, di tecniche che richiedono un apprendistato assai lungo.

Lifting frontale

Questo intervento 7 volte su 10 è praticato in pazienti con blefarocalasi: è la caduta o la discesa del sopracciglio che

precipita una dermatocalasi. Agendo sulla palpebra si ridurrebbe soltanto la distanza tra sopracciglio e ciglia e la minima elevazione volontaria del sopracciglio trascinerebbe la palpebra superiore. È fondamentale quindi verificare la posizioni del sopracciglio: nell'uomo è situato a livello del margine orbitario superiore, nella donna al disotto.

Si pratica un'incisione bicoronale, estesa da un orecchio all'altro, situata a metà strada tra il territorio sensitivo anteriore (nervi frontale interno e sovraorbitario) e posteriore (nervo occipitale). Una variante è l'incisione a Z, che si differenzia per la direzione obliqua che assume nel raggiungere l'orecchio. Lo scollamento si effettua lungo il piano di scivolamento naturale attraverso il quale avviene il movimento della fronte (piano esangue situato tra il periostio e la fascia di Libera e Laude, una delle componenti della *galea capitis*) e deve raggiungere sulla linea mediana il bordo orbitario superiore, mentre nella parte temporale deve essere condotto all'esterno dell'aponeurosi del muscolo temporale. Previa incisione della *galea* si indebolisce il muscolo frontale al di sopra della glabella, isolandone piccoli frammenti che vengono poi coagulati o asportati ottenendo così un'importante riduzione delle rughe della regione mediana e inferiore della fronte. Per la riduzione o scomparsa delle rughe verticali intersopracciliari occorre praticare una resezione totale dei muscoli corrugatori. Si mette poi in tensione la cute in modo da portare il sopracciglio leggermente al di sopra del bordo orbitario superiore. Si procede quindi alla sutura su uno o due piani.

Tra le *complicanze* si ricordano la paralisi del ramo temporale del nervo facciale (raramente definitiva), le alopecie (reversibili e insorgenti anche dopo 3-4 mesi dall'intervento), gli ematomi (da evacuarsi prontamente), i pruriti incoercibili (scompaiono in pochi mesi) e, infine, le crisi di emicrania.

Lifting temporale (Goin, 1994)

È indicato nella ptosi sopracciliare che interessa soltanto la porzione laterale e per correggere le rughe della zampa d'oca.

Si pratica un'incisione a Z che circonda la porzione inferiore della zampa d'oca ed evita la sua dislocazione. Lo scollamento può localizzarsi sotto la *galea*, all'esterno del foglietto dell'aponeurosi temporale. Occorre superare il bordo orbitario e liberare a questo livello le aderenze profonde che la *galea* contrae con il bordo orbitario stesso. La semplice separazione del piano cutaneo da quello muscolare e lo stiramento della cute possono già attenuare le rughe della zampa d'oca, che possono essere inoltre corrette agendo specificamente sul muscolo orbicolare. La sezione del muscolo va praticata orizzontalmente a livello del canto esterno. La rimessa in tensione della cute va eseguita parallelamente alla branca obliqua dell'incisione a Z.

Le *complicanze* sono rare.

Mask lift

È una tecnica derivata dalla chirurgia cranio-facciale ed è indicata nei casi in cui la cute facciale sia rilasciata e ptotica. Interessa prevalentemente la regione fronto-orbitaria.

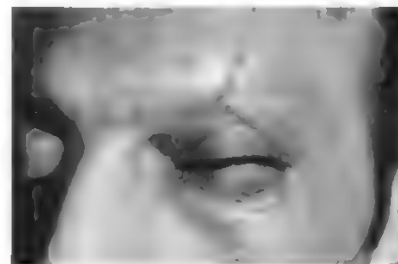
Le incisioni sono le stesse descritte per il *lifting* frontale. Lo scollamento comprende l'insieme della fronte, del bordo orbitario esterno, il terzo anteriore dello zigomo, tutto il malare, la faccia anteriore del mascellare superiore. Si espone così la totalità della maschera facciale. Il piano di scollamento può avvenire per via *sottoperiosteale*, che permette la rotazione di tutta la periorbita con il tendine palpebrale esterno quando si realizzerà la cantopessia, o per via *extraperiosteale*, ove lo scivolamento avverrà tra periostio e cute. Si libera il canto esterno con una sezione del tendine palpebrale esterno ed una dissezione del setto a livello dell'arco marginale lungo il margine orbitario inferiore.

Le *complicanze* sono costituite principalmente da un edema marcato; i pazienti possono riprendere una vita normale solo dopo 3 settimane dall'intervento.



Fig. 1. Blefarocalasi destra con lipoma orbitario.

Fig. 3. Ricostruzione della palpebra superiore sinistra dopo ferita frontale e palpebrale mediante trasposizione di lembi cutanei.



Blefaroplastiche inferiori

Le blefaroplastiche hanno lo scopo di riformare, spostare, modificare i tessuti palpebrali. Le blefaroplastiche sulle palpebre inferiori sono indicate nelle seguenti condizioni: eccesso cutaneo, con blefarocalasi (fig. 1) o dermatocalasi (escissione cutanea); erniazione lipomatosa (fig. 2), con o senza eccesso cutaneo (escissione adiposa per via congiuntivale o cutanea se è associato un eccesso cutaneo o muscolare); eccesso muscolare della palpebra inferiore (escissione muscolare rispettando l'orbicolare pretarsale); eccesso cutaneo, muscolare e adiposo; ectropion, iperlassità, esposizione sclerale, borse (anomalie che devono essere trattate in un'unica seduta operatoria). Per le notizie fondamentali di tecnica e le complicità, v. CHIRURGIA ESTETICA** (col. **1146).

Chirurgia plastica delle palpebre nelle lesioni da traumatismi

Etiologia ed esame obiettivo dei traumi palpebrali

La causa più frequente dei traumi palpebrali è rappresentata dagli incidenti automobilistici. Per la rottura del parabrezza si producono ferite multiple del viso e delle palpebre. Tali lesioni sono gravi poiché si associano molto spesso a lacerazioni del globo oculare, talvolta bilaterali.

L'aspetto delle ferite è subordinato all'agente causale. Nelle ferite da incidenti automobilistici i lembi sono poco sollevati, ma sono spesso sede di inclusioni di piccoli frammenti di vetro radio-opachi. In quelle da incidenti su veicoli a due ruote i lembi delle ferite sono estremamente contusi e sollevati, con aumento del rischio di infezione microbica e di tatuaggio cutaneo.



Fig. 2. Erniazione lipomatosa palpebrale bilaterale prima dell'intervento di blefaroplastica inferiore (per via esterna).

Nel caso di feriti che necessitano di una rianimazione d'urgenza, come avviene spesso nei politraumatizzati gravi, la chirurgia palpebrale riparatrice va attuata ovviamente in un secondo tempo (gerarchia delle lesioni).

L'esame delle lesioni palpebrali dovrà permettere: a) una verifica dell'integrità del globo oculare (in caso di ematoma palpebrale che renda difficile tale esplorazione può essere utile l'instillazione di anestetici locali); b) una descrizione precisa della ferita (profondità, estensione e posizione della stessa, con o senza compromissione del muscolo elevatore della palpebra, con o senza perdita di sostanza); c) un accertamento di difetti di occlusione palpebrale (perdita di sostanza palpebrale parziale o totale; paresi temporanea o prolungata del muscolo orbicolare; lesione miogena o neurogena); d) una verifica dell'integrità delle vie lacrimali; e) la ricerca di lesioni associate (globo oculare, annessi, traumatismi maxillo-facciali o cranio-facciali che necessitano di un intervento chirurgico). Possono, inoltre, essere richiesti esami complementari, ad es. esami radiologici, alla ricerca di fratture orbitarie associate e/o di corpi estranei.

Trattamento chirurgico

Nel caso di ferite *senza perdita di sostanza* si procede alla sutura con modalità differenti a seconda dei caratteri della lesione e tali da assicurarne nel modo migliore la riparazione. Nelle ferite *superficiali* non si incontrano di solito particolari difficoltà. In quelle *profonde*, che interessano il piano tarsale e/o congiuntivale, la riparazione del tarso è indispensabile per evitare la deformazione del bordo libero della palpebra. Nelle ferite a *tutto spessore* la sutura deve interessare i tre piani palpebrali (tarso-congiuntivale, orbicolare, cutaneo) e nel caso della palpebra superiore è indispensabile controllare le condizioni del muscolo elevatore. Nelle ferite con *interruzione del bordo libero* (Coscas e Morax, 1976) si suturano i margini della ferita senza porre tensione sull'asse, per evitare una retrazione secondaria che può portare a deformazione del bordo stesso.

Le ferite per *strappamento da avulsione* della palpebra superiore o di quella inferiore o di entrambe si accompagnano sovente a una perdita di sostanza, la cui riparazione pone speciali problemi che non possono essere trattati in dettaglio in questa sede e per i quali si rimanda alle pubblicazioni specializzate. L'intervento assume il carattere di urgenza se l'occhio resta esposto per una notevole perdita di sostanza della palpebra superiore.

Per la riparazione delle lesioni con *perdita di sostanza palpebrale* si può ricorrere a lembi (fig. 3) o a innesti tissutali (v. anche: CHIRURGIA PLASTICA [v.; v.*]).

Lembi e innesti utilizzati in chirurgia palpebrale plastica

Lembi. — Si tratta di innesti sempre pedunculati. Sono di vario tipo: a) lembi da scivolamento (rispondono ad uno scollamento esteso dei bordi di una perdita di sostanza); b) lembi da avanzamento (plastica a Y, plastica a U con lembo perpendicolare all'asse

della perdita di sostanza da colmare); c) lembi di rotazione, di cui il più conosciuto in chirurgia palpebrale è il lembo di Imre (per la preparazione della palpebra inferiore); d) lembi per trasposizione, che necessitano di un sollevamento e di uno spostamento per la messa *in situ*.

In casi particolari si possono utilizzare: un lembo frontale per la ricostruzione della commessura interna, una plastica a Z per ottenere il rilasciamento di una retrazione cicatriziale, o una plastica a W per l'incisione di cicatrici.

I lembi tarso-congiuntivali prelevati a partire dalla palpebra superiore permettono di ricostruire il piano profondo di una mutilazione palpebrale inferiore a pieno spessore.

Innesti. — Possono essere innesti cutanei, mucosi o composti. I primi possono essere innesti dermo-epidermici oppure innesti di cute totale e sono indicati per la ricostruzione cutanea delle palpebre (gli innesti dermo-epidermici danno luogo a inestetismi dovuti alla pigmentazione secondaria e sono soggetti a retrazione secondaria, inconvenienti che non si verificano con gli innesti di cute totale).

Gli innesti mucosi possono essere costituiti da mucosa congiuntivale o buccale. Entrambi hanno come indicazioni la ricostruzione della perdita di sostanza congiuntivale e la costituzione del piano profondo mucoso di una ricostruzione palpebrale.

Gli innesti composti possono essere bitessutali o tritessutali. I primi sono condromucosi (di cartilagine nasale) oppure tarso-congiuntivali e sono indicati per la ricostruzione del piano profondo tarso-congiuntivale di una mutilazione palpebrale. Un innesto tritessutale è quello tarso-marginale, indicato per la ricostruzione di una perdita di sostanza palpebrale a tutto spessore.

Trattamento delle perdite di sostanza palpebrale

Si distinguono perdite di sostanza superficiali e profonde (tarso-congiuntivali o a tutto spessore).

1) Le perdite di sostanza superficiali interessano il piano cutaneo e, talvolta, l'orbicolare. Se un deficit è poco esteso, un semplice scollamento dei margini cutanei della ferita ed il loro avvicinamento è sufficiente a colmarlo. Si tratta di una semplice plastica cutanea da scivolamento. Se il deficit è moderato e non supera $\frac{1}{4}$ della lunghezza palpebrale, si può utilizzare un semplice scivolamento cutaneo o totalizzare la perdita di sostanza creando volontariamente un deficit a tutto spessore di $\frac{1}{4}$ della lunghezza palpebrale. La chiusura del deficit si farà mediante avvicinamento dei margini con sutura a tre piani.

Se il deficit cutaneo è esteso, si può utilizzare un lembo cutaneo vicino, o un innesto cutaneo dermo-epidermico per la palpebra superiore, avendo cura di totalizzare la perdita di sostanza cutanea a tutta la palpebra interessata per realizzare così un innesto di una sola unità palpebrale, con risultati estetici molto migliori.

Se il deficit cutaneo è esteso e si associa ad un deficit più profondo del muscolo orbicolare, occorre utilizzare un lembo di vicinanza più spesso di un innesto.

2) Nel caso di perdite di sostanza del piano profondo tarso-congiuntivale, se la perdita non supera $\frac{1}{4}$ della lunghezza della palpebra, si può totalizzare la perdita della sostanza secondo la regola del quarto, realizzando così una perdita di sostanza a tutto spessore: la ricostruzione si farà per avvicinamento dei margini.

Se la perdita di sostanza supera $\frac{1}{4}$ della lunghezza della palpebra, la ricostruzione utilizzerà sia un innesto composto tarso-congiuntivale, sia condromucoso, sia un lembo tarso-congiuntivale di cui il peduncolo non sarà sezionato prima di 8 giorni.

3) Le perdite di sostanza a tutto spessore possono essere considerate delle vere e proprie urgenze quando il globo oculare non è protetto; in particolare, per una perdita di sostanza a tutto spessore della palpebra superiore occorre assicurare la copertura dell'occhio con un abbassamento della congiuntiva o con un filo di trazione.

Per deficit inferiori o uguali a $\frac{1}{4}$ della lunghezza totale della palpebra, si procederà alla ricostruzione mediante

semplice avvicinamento dei margini della ferita, avendo cura di regolarizzarli per cercare di ottenere un deficit regolare a forma pentagonale. Si eseguiranno le suture su due o tre piani. In caso di tensione eccessiva, sarà realizzata una cantotomia.

Per deficit superiori a $\frac{1}{4}$ della lunghezza totale della palpebra, occorre mobilitare i tessuti di vicinanza per colmare il deficit della mutilazione, con lunghezza del lembo o dell'innesto delle dimensioni pressoché simili alla lunghezza della mutilazione stessa ridotta di $\frac{1}{4}$. In questi casi la perdita di sostanza è formata da due piani: un piano profondo tarso-congiuntivale, un piano superficiale cutaneo-muscolare.

Possono essere realizzate numerose varietà di ricostruzioni: un lembo superficiale con innesto profondo o, viceversa, un lembo superficiale con un lembo profondo oppure, eccezionalmente, la trasposizione totale di una palpebra mediante ausilio di un peduncolo o senza peduncolo a condizione che la trasposizione non sia più di $\frac{1}{4}$ della lunghezza palpebrale.

Perdita di sostanza bipalpebrale. — Si verifica eccezionalmente, ma realizza una vera e propria urgenza. Occorrono numerosi tempi chirurgici: 1) ricostruzione del piano profondo, mediante semplice ricoprimento congiuntivale, abbassamento dell'orbicolare in posizione marginale e ricostruzione del piano superficiale mediante innesto di cute totale; sono anche possibili innesti di mucosa buccale; 2) divisione delle palpebre ed innesto composto condromucoso; 3) innesto di ciglia; 4) apertura delle palpebre, loro assottigliamento ed aggiustamento.

Note di chirurgia plastica delle ustioni palpebrali

Le ustioni palpebrali possono essere provocate da agenti termici o chimici: esposizione ad un flash, ad un gas o a vapori di sostanza infiammabile, a liquidi acidi o basici.

Nelle ustioni di 1° grado si ha un semplice eritema, in quelle di 2° grado la formazione di fittene, in quelle di 3° grado la distruzione dell'epidermide e dello strato basale. Nelle ustioni di 4° grado si ha la distruzione profonda, fino ad una vera e propria carbonizzazione; localmente tali lesioni sono le più gravi, l'estensione delle bruciature è meno importante della loro profondità.

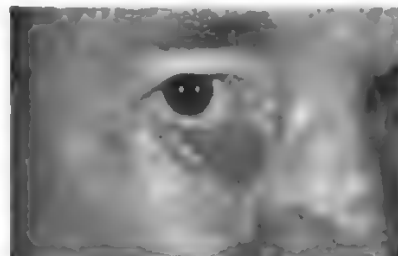
Durante la loro evoluzione le ustioni sono la sede di un'importante retrazione. Sono responsabili di lesioni estremamente inestetiche e provocano degli ectropion (fig. 4) più o meno complicati da trichiasi. Vi è il rischio permanente di esposizione della cornea e delle complicazioni che ne seguono.

Le ustioni estese necessitano di un trattamento di rianimazione d'urgenza.

In caso di bruciature chimiche, occorre eliminare al più presto, mediante lavaggio abbondante con acqua o con soluzione fisiologica, le sostanze nocive. Si estraggono gli eventuali corpi estranei e le particelle solide.

Tutte le ustioni devono essere trattate da principio in maniera identica: 1) per via generale: sedazione del dolo-

Fig. 4. Ectropion palpebrale della palpebra inferiore destra, con perdita di sostanza da ustione palpebrale (2/3 della palpebra inferiore: 1/3 medio e 1/3 interno con lesioni a carico del puntino e canalino lacrimale inferiore).



re, antibiotico-terapia, siero-terapia antitetanica; 2) *localmente*: lavaggio prudente mediante soluzione fisiologica tiepida per eliminare le esfoliazioni, i corpi estranei, i tessuti mortificati; lasciare la lesione esposta all'aria quando esuda, polverizzando sopra degli antibiotici due volte al giorno; 3) *nell'occhio*: instillazione d'antibiotico e di midriatici ogni 4 ore.

In caso di ustioni *moderate*, quando l'esposizione all'agente causale è stata breve, il danno è superficiale e la cute soggiacente è cicatrizzata. Essa non ha tuttavia la sua leggerezza iniziale ed un accorciamento delle quattro palpebre può essere notato, spesso maggiormente a livello delle palpebre inferiori.

Se esiste un'epifora e un rischio di lagofthalmo, si può praticare un innesto di cute totale con buone possibilità di correzione (da 10 a 15 gradi).

Quando l'esposizione all'agente ustionante è stata prolungata, nei casi di ustioni *severe*, la cute è distrutta e l'orbitale è talvolta danneggiato. La retrazione, in relazione alla comparsa del tessuto cicatriziale sopra il tarso, può essere importante.

Il rischio è la maggiore esposizione corneale.

Se vi è un tessuto di granulazione di aspetto favorevole alla caduta dell'escara si può tentare un innesto di cute sottile per diminuire la retrazione. Tuttavia, la frequenza di sovrainfezioni è tale che l'innesto attecchisce raramente. È preferibile prima di correggere l'ectropion raggiungere la cicatrizzazione totale, sorvegliando lo stato della cornea e tenendo presente la possibilità di dover effettuare una tarsorrafia provvisoria che, per essere efficace, deve essere eseguita prima della retrazione, cioè nei primi 15 giorni. Quando le circostanze lo esigono, si pratica un innesto cominciando dalla palpebra superiore. Per evitare una cattiva correzione, non si «trapiantano» mai le due palpebre nella medesima seduta.

Dopo l'escissione del tessuto cicatriziale, si utilizza un impianto di cute di medio spessore. Occorre realizzare un'importante sovracorrezione. Per la palpebra inferiore, si può utilizzare un innesto di cute totale.

Le ustioni *profonde* differiscono dalle precedenti poiché l'orbitale viene profondamente leso. La retrazione è massima, l'escissione del tessuto cicatriziale lascia una palpebra sottile, senza muscolo e flaccida. Numerosi impianti sono necessari per ridurre la retrazione. Nei casi gravi, si realizza un quadro di pseudoptosi con una palpebra poco mobile.

Cenni di chirurgia plastica di sequele e complicanze delle lesioni palpebrali da traumi o ustioni

Sequele e complicanze possono verificarsi anche a seguito di ferite correttamente trattate, ma si osservano soprattutto come conseguenza di perdite di sostanza non trattate o trascurate.

Si possono verificare disturbi della statica e dinamica palpebrale generatori di danni oculari (cheratiti da esposizione), e/o complicanze puramente estetiche.

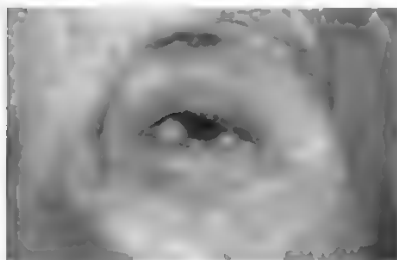


Fig. 5. Entropion della palpebra inferiore sinistra da cicatrice tarso-congiuntivale.

TAB. I. SEQUELE E COMPLICANZE DI LESIONI PALPEBRALI CON INDICAZIONI DEL TRATTAMENTO

Cicatrici inestetiche (senza conseguenza sulla statica e la dinamica palpebrale)	cicatrice discreta: escissione e sutura cicatrice più marcata: assottigliare la linea cicatriziale mediante escissione con plastica a Z o delle plastiche a V cicatrice cheloide (fig. 6): l'escissione rischia la recidiva del cheloide: le infiltrazioni locali iterative di cortisone possono essere di grande ausilio
Ectropion cicatriziali	semplice azione retrattile, senza perdita di sostanza: plastiche a Z sulla cicatrice perdite di sostanza cutanea: — innesto di vicinanza — impianto cutaneo
Entropion cicatriziali (cicatrice tarso-congiuntivale [fig. 5] con eventuale perdita di sostanza tarso-congiuntivale)	apertura della cicatrice eventuale innesto composto condro-mucoso rialineamento della linea cigliare trichiasi — localizzata: resezione a tutto spessore del bordo libero della palpebra secondo la regola del quarto — diffusa: margino-plastica mediante escissione della linea cigliare e impianto di mucosa buccale
Colobomi palpebrali (perdita di sostanza o cattiva riparazione)	metodi precedentemente descritti
Ptosi traumatica sezione dell'elevatore strappamento palpebrale superiore mal riparato disinserzione dell'aponevrosi dell'elevatore durante una contusione ptosi neurogena ptosi meccanica, legata ad un tessuto fibroso palpebrale	il trattamento sarà funzione della causa reinserzione dell'elevatore a livello del bordo superiore del tarso accorciamento del muscolo con ablazione del tessuto cicatriziale se l'elevatore è troppo fibroso occorre sospendere la palpebra al muscolo frontale
Epifora	malposizione dei puntini lacrimali: facilmente riparabile fibrosi del puntino lacrimale: riapertura sezione dei canalini: chirurgia riparatrice lacrimale molto più complessa
Reinterventi	complicanza in sé inevitabile, in particolare in caso di ustioni evitabili se si rispettano gli imperativi della chirurgia palpebrale

Le ferite perpendicolari rischiano più frequentemente di causare un entropion o un danno del bordo libero.

Tali complicanze a livello della palpebra inferiore non determinano rischi a carico del globo oculare. Non è così per la palpebra superiore, dove ogni fenomeno di retrazione impedisce la protezione del globo determinando una esposizione della cornea.

La riparazione delle cicatrici non deve oltrepassare i 6 mesi dal traumatismo iniziale.

Nella tab. I sono sommariamente esposte le principali sequele (figg. 5 e 6) e complicanze, con le indicazioni di massima per il loro trattamento.



Fig. 6. Esiti di ricostruzione palpebrale sinistra in caso di perdita di sostanza, trattata chirurgicamente in fase tardiva (oltre 6 mesi) con epicanto, cicatrice cheloidea (palpebra inferiore al terzo interno) e malposizione del puntino lacrimale inferiore, in parte tendente alla chiusura fibrotica.

Bibliografia

- Collin J. R., *A manual of systematic eyelid surgery*, 1983, Churchill Livingstone, Edinburg.
 Coscas G., Morax S., *Année thérapeutique et clinique en ophtalmologie*, 1976, XXVII, 22-40.
 Delmar H., *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 1994, 9, 527-555.
 Ginsbach G., *Aesthetic Plast. Surg.*, 1993, 17, 9-15.
 Goin J. L., *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 1994, 39, 571-596.
 Lemagne J. M., Beyer C. K., *J. Fr. Ophthalmol.*, 1981, 4, n. 4, 307-315.
 Lowry J. C., Barthley G. B., *Surv. Ophthalmol.*, 1994, 38, 327-350.
 Morax S., *J. Fr. Ophthalmol.*, 1981, 4, n. 11, 741-746.
 Morax S., Benia I., *Traumatismes et chirurgie plastique des paupières*, *Encycl. Méd. Chir. (Paris, France), Ophtalmologie*, 21100 D10, 11-1985, p. 18.
 Tessier P., *Bull. Mem. Soc. Fr. Ophthalmol.*, 1960, 73, 231-254.
 Trepsat F., Delmar H., *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 1994, 39, 647-665.

RAFFAELI NUZZI,
 ALBERTO BELLONE E CATERINA BOGETTO

ODORE DI PESCE, SINDROME DELL'

La sindrome dell'odore di pesce (FOS: *Fish Odor Syndrome*) o trimetilaminuria (n. 136131 del catalogo McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, 1998) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva. I pazienti affetti da questa sindrome secernono discrete quantità di trimetilamina [TMA: $(CH_3)_3N$], una amina alifatica prodotta nell'intestino dalla flora batterica persistente come metabolita della colina (idrossido di trimetiletanolammonio) ingerita con molti alimenti quali, il rosso d'uovo, il fegato, legumi, e la soia, oppure come derivato dei corrispondenti nitrati, presenti nei pesci di acqua salata. La TMA prodotta nell'intestino viene assorbita e normalmente ossidata nel fegato dal sistema ossidativo microsomiale. La ridotta capacità di ossidazione della TMA costituisce la base biochimica della sindrome dell'odore di pesce.

I pazienti affetti da questa malattia, presentano attività ridotta dell'enzima trimetilamina ossidasi (o monossidasi flavin-dipendente, FMO). Sono note cinque isoforme diverse di questo enzima. L'isoenzima tipo III (FMO3) è comunque quello maggiormente espresso nel fegato, e predilige come substrato la TMA. Il gene codificante l'isoenzima FMO3 è mappato sul braccio lungo del cromosoma 1 nella regione 1q23-q24 (gene *FMO3*). Mutazioni in questo gene sono state recentemente descritte in alcuni pazienti con FOS. Si tratta di sostituzioni di basi nucleotidiche che ridu-

cono l'attività dell'enzima negli epatociti. Gli omozigoti affetti eliminano discrete quantità di TMA con l'alito, il sudore, e con altri fluidi organici. Il caratteristico odore della TMA presente nei fluidi biologici dei pazienti è spesso causa di disturbi dell'affettività, con sintomi di depressione, paranoia, ansia, frustrazione, difficoltà di adattamento scolastico e difficoltà di vita di relazione, e tentativi di suicidio. La gravità della sintomatologia è variabile e può essere aggravata da fenomeni fisiologici (come le mestruazioni), patologici (come la febbre), e manifestazioni psicosomatiche quali lo stress. La sintomatologia è spesso intermittente e riflette variazioni della dieta e/o lo stato della flora gastrointestinale. Non si esclude tuttavia che la diversa espressività fenotipica sia conseguenza di diversi alleli del gene *FMO3*.

Non esiste al momento una terapia risolutiva, ma una dieta restrittiva per alimenti contenenti precursori della TMA, come la colina e la carnitina, in alcuni casi può ridurre il cattivo odore.

Talvolta anche la terapia antibiotica può risultare efficace in quanto riduce la microflora intestinale e quindi la produzione di TMA.

È possibile che esista eterogeneità genetica di questa sindrome per mutazioni negli altri isoenzimi anch'essi mappati sul cromosoma 1. La presenza di più copie di geni in grado di produrre enzimi di tipo FMO, suggerisce che questa via metabolica è utilizzata anche per altre reazioni importanti di ossidazione che riguardano metaboliti, come la nicotina e la nicotinamide. Gli eterozigoti presentano mediamente una ridotta ossidazione della TMA, rispetto ai soggetti normali, ma non manifestano la sintomatologia degli omozigoti, come atteso da una malattia a trasmissione autosomica recessiva. Si stima che almeno una persona su cento sia eterozigote per alleli che conferiscono una ridotta attività della FMO3, e pertanto la frequenza degli omozigoti nella popolazione generale è di circa 1/10.000.

La somministrazione orale di TMA consente in modo abbastanza semplice la discriminazione degli eterozigoti dai soggetti normali e quindi dagli omozigoti affetti, attraverso il dosaggio quantitativo di TMA o del nitrato di TMA nelle urine.

Bibliografia

- Al-Waiz M., Ayesh R., Mitchell S. C. et al., *Lancet*, 1987, 1, 634-635.
 Ayesh R., Mitchell S. C., Zhang A., Smith R. L., *Brit. Med. J.*, 1993, 307, 655-657.
 Dolphin C. T., Shephard E. A., Povey S. et al., *Biochem. J.*, 1992, 287, 261-267.
 Dolphin C. T. et al., *Nature Genetics*, 1997, 17 (4), 491-494.
 Higgins T., Chaykin S., Hammond K. B., Humbert J. R., *Biochem. Med.*, 1972, 6, 392-396.
 Lomri N., Gu Q., Cashman J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 1685-1689.
 McKusick V. A., *Mendelian Inheritance in Man*, 12 ed., 1998, Johns Hopkins Univ. Press., Baltimore.
 Todd W. A., *J. Pediatr.*, 1979, 94, 936-937.
 Zhang A. Q., Mitchell S., Smith R., *J. Inher. Metab. Dis.*, 1995, 18, 669-674.
 Zhang A. Q., Mitchell S., Smith R., *Lancet*, 1996, 348, 1740-1741.
 Zhang A. Q., Mitchell S., Smith R., *Xenobiotica*, 1996, 26, 957-961.

GIUSEPPE NOVELLI

OLFATTO [v. vol. X, coll. 1544-1567]

BIOLOGIA MOLECOLARE DELL'OLFATTO

La tecnica del DNA ricombinante (v. *BIOTECNOLOGIE**, col. 1077-1078; *GENETICA***) ha portato nuove conoscenze circa il meccanismo molecolare di eccitamento del neurone olfattivo. Il meccanismo ha alcuni tratti comuni con altri pro-

cessi di recezione ma per certi versi se ne differenzia. Prenderemo come termine di paragone il meccanismo di eccitamento visivo.

La recezione cellulare è il modo con cui uno stimolo suscita l'eccitamento. I fenomeni relativi che hanno luogo nel citoplasma sono fenomeni di trasduzione. La trasduzione, quindi, pone in relazione recettori molecolari specifici per lo stimolo con i canali ionici di membrana che regolano la corrente elettrica dell'eccitamento cellulare.

Nei neuroni olfattivi sono stati descritti recettori molecolari indicati come recettori olfattivi putativi. Questi appartengono alla classe di proteine di membrana caratterizzate da una struttura tipica con 7 alfa eliche attraversanti la membrana plasmatica e da un dominio intracellulare per l'interazione con le proteine della trasduzione enzimatica cellulare (Branden e Tooze, 1991). Anche i recettori per la luce, i pigmenti visivi cioè, appartengono a questa classe. Vi è però una diversità. Un numero molto elevato, si stima circa mille recettori molecolari diversi, sono presenti nell'epitelio olfattivo mentre i pigmenti visivi sono presenti in un piccolo numero nella retina. Questa differenza è in accordo con le osservazioni fisiologiche per cui non è possibile con degli odori primari ricostruire ogni odore complesso, mentre con tre colori scelti opportunamente è possibile generare la sensazione di un qualsivoglia colore. Circa i recettori olfattivi putativi restano aperti molti problemi: non è ancora stato isolato un solo recettore ma soltanto il DNA rispettivo; non è ancora stata dimostrata l'interazione chimica tra molecole odorose e recettori; non è stato dimostrato chiaramente che questi recettori siano in grado di attivare un processo di trasduzione intracellulare e che quindi eccitino il neurone olfattivo; infine, non si sa se più d'uno ed eventualmente quanti recettori siano presenti in un neurone. Ciò detto l'aggettivo putativo sembra ancora una buona precauzione quando ci si riferisce a questi recettori.

Nei neuroni olfattivi è stato scoperto un canale ionico la cui conduttanza elettrica è aumentata in presenza di nucleotidi ciclici intracellulari. Questo canale è simile al canale che media l'eccitazione dei fotorecettori visivi. Ciò porta a pensare che il processo di eccitamento sia simile nei neuroni olfattivi e nei fotorecettori visivi (coni e bastoncelli): un recettore molecolare stimolato dal legame con una

molecola odorosa o, rispettivamente, dalla cattura di un fotone attiva il processo di trasduzione intracellulare che coinvolge i nucleotidi ciclici e questi a loro volta agendo sul canale determinano, infine, i segni elettrici dell'eccitamento. Vi sono però anche differenze di trasduzione tra il sistema olfattivo e quello visivo. La maggiore differenza è che nei neuroni olfattivi gli stimoli attivano pure il processo di trasduzione intracellulare che coinvolge l'inositolotrisfosfato, mentre nei fotorecettori retinici dei vertebrati questo processo manca.

Il disegno presentato in fig. 1 schematizza queste nozioni (Shepherd, 1994). Nel complesso, la ricchezza di recettori putativi e la varietà di processi di trasduzione sottolineano la poca specificità dei neuroni olfattivi nei riguardi degli stimoli, forse l'impronta di un tratto ancestrale.

V. anche RECETTORI (XIII, 187-243); RECETTORI* (*6311-6328); RECETTORI**; VISIONE (XV, 2129-2157).

Bibliografia

Branden C., Tooze J., *Introduction to protein structure*, 1991, Garland Publishing Inc., New York, London.
Shepherd G. M., *Neuron*, 1994, 13, 771-790.

ANDREA CAVAGGIONI

OLI DI PESCE

F. huiles de poisson. - I. fish oils. - T. Fischöl. - S. aceite de pescado.

SOMMARIO

Caratteristiche generali e composizione (col. 4150). - Principi attivi, relazioni con gli eicosanoidi e significato nutrizionale (col. 4152). - Oli di pesce in terapia: presupposti fisiopatogenetici ed utilizzo (col. 4153).

Caratteristiche generali e composizione

Con il termine «oli di pesce» [o. di p.] si definiscono composti raffinati di origine ittica (di salmone, di sgombero, di balena, di fegato di merluzzo) costituiti da trigliceridi con elevato contenuto di ac. grassi polinsaturi della serie ω -3 (v. ACIDI GRASSI**), e che rappresentano un importante elemento dell'alimentazione di alcune popolazioni. L'olio di fegato di merluzzo è da secoli uno dei principali integratori dietetici nell'uomo; ritenuto in passato una eccellente fonte di vitamine A e D (v. OLI DI FEGATO), è stato più di recente considerato per il suo elevato contenuto di ac. grassi ω -3 (circa 25%). Attualmente sono disponibili in commercio vari concentrati di o. di p. in capsule: i primi furono rilasciati dall'industria nei primi anni '80, erano composti di olio estratto da pesci grassi e contenevano all'incirca 18% di ac. eicosapentaenoico e 12% di ac. docosaesaenoico, divenendo con tale rapporto (3:2) uno standard anche per i prodotti successivi. L'industria farmaceutica ha quindi consentito la loro formulazione sotto forma di etil-esteri degli ac. grassi ω -3 o di triacilgliceroli riesterificati, a maggior concentrazione del principio attivo (85-90%).

Il loro interesse nutrizionistico e farmacologico origina dalle osservazioni sulle caratteristiche di alcune malattie, in particolare del sistema cardiovascolare, fatte a partire dagli anni '70 in soggetti che presentavano un elevato consumo di pesce (tab. I) e, successivamente, in studi in cui tali oli erano somministrati in modo controllato. La prevalenza di aterosclerosi tra gli eschimesi della Groenlandia, appare ridotta rispetto a quella riscontrata nell'Europa occidentale, e si è ipotizzato che la diversa dieta possa, almeno in parte, essere responsabile di queste differenze. In particolare è stata dimostrata una mortalità per infarto miocardico inferiore di circa 10 volte nella popolazione artica rispetto a quella danese, scandinava e nord-americana, anche dopo

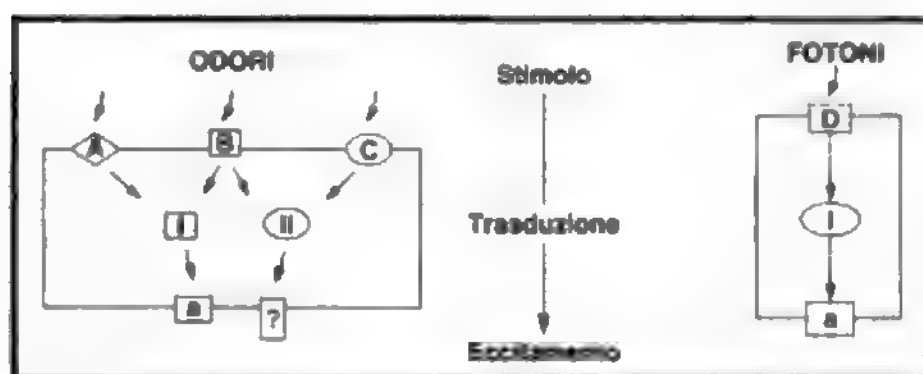


Fig. 1. Schema comparato di eccitazione olfattiva (a sinistra) e visiva (a destra). A B C sono recettori olfattivi, D un pigmento visivo, I è la catena di trasduzione dei nucleotidi ciclici, II la catena di trasduzione dell'inositolotrisfosfato, a è un canale con conduttanza dipendente dai nucleotidi ciclici intracellulari; è indicato pure un canale attivato dalla catena dell'inositolotrisfosfato. L'eccitazione inizia in ogni caso per interazione di uno stimolo (molecola odorosa o fotone) con un recettore specifico, prosegue nel citoplasma con una o più catene di amplificazione trasduttiva, come nel caso del neurone olfattivo, e termina con la attivazione di canali ionici responsabili dei segni elettrici dell'eccitamento. Questi ultimi vengono trasmessi nel sistema nervoso centrale generando le sensazioni specifiche, odori e luminosità rispettivamente.

TAB. I. PATOLOGIE RILEVATE IN ESCHIMESI DELLA GROENLANDIA RISPETTO A SOGGETTI OCCIDENTALI

	Eschimesi*	Scandinavi*
Ictus	2	1
Infarto miocardico	1	10
Psoriasi	1	20
Diabete	raro	raro
Asma bronchiale	1	25
Tireotossicosi	rara	rara
Sclerosi multipla	0	0
Epilessia	2	1
Poliartrite cronica	rara	rara
USA Danimarca Groenlandia		
Decessi per cardiopatia ischemica*	40,4	34,7 5,3

* Frequenza relativa; * prevalenza in soggetti maschili di età 45-64 anni.

correzione per classi di età (tab. I). La differenza dietetica più evidente in queste popolazioni riguardava non la quantità totale di grassi (e colesterolo) assunti con l'alimentazione, simile per tutte, ma la loro composizione. La dieta danese contiene infatti acidi grassi saturi in quantità doppia rispetto a quella eschimese ed inoltre una maggiore quantità di acidi grassi polinsaturi ω -6. Gli eschimesi invece consumano oltre 10 g al giorno di acidi grassi polinsaturi ω -3: eicosapentaenoico ([EPA] C20:5 ω -3), docosapentaenoico ([DPA] C22:5 ω -3) e docosaesaenoico ([DEA] C22:6 ω -3) (v. ACIDI GRASSI**). L'EPA costituisce il 4,6% degli acidi grassi totali dietetici degli eschimesi, contro lo 0,4% nei controlli danesi (tab. II). Questi acidi grassi entrano nella catena alimentare attraverso il fitoplancton, assunto dai pesci che rappresentano l'elemento principale della dieta eschimese. Nonostante sia stata dimostrata solo una asso-

TAB. II. APPORTO DI GRASSI CON L'ALIMENTAZIONE IN ESCHIMESI DELLA GROENLANDIA E IN SOGGETTI DI CONTROLLO DANESE

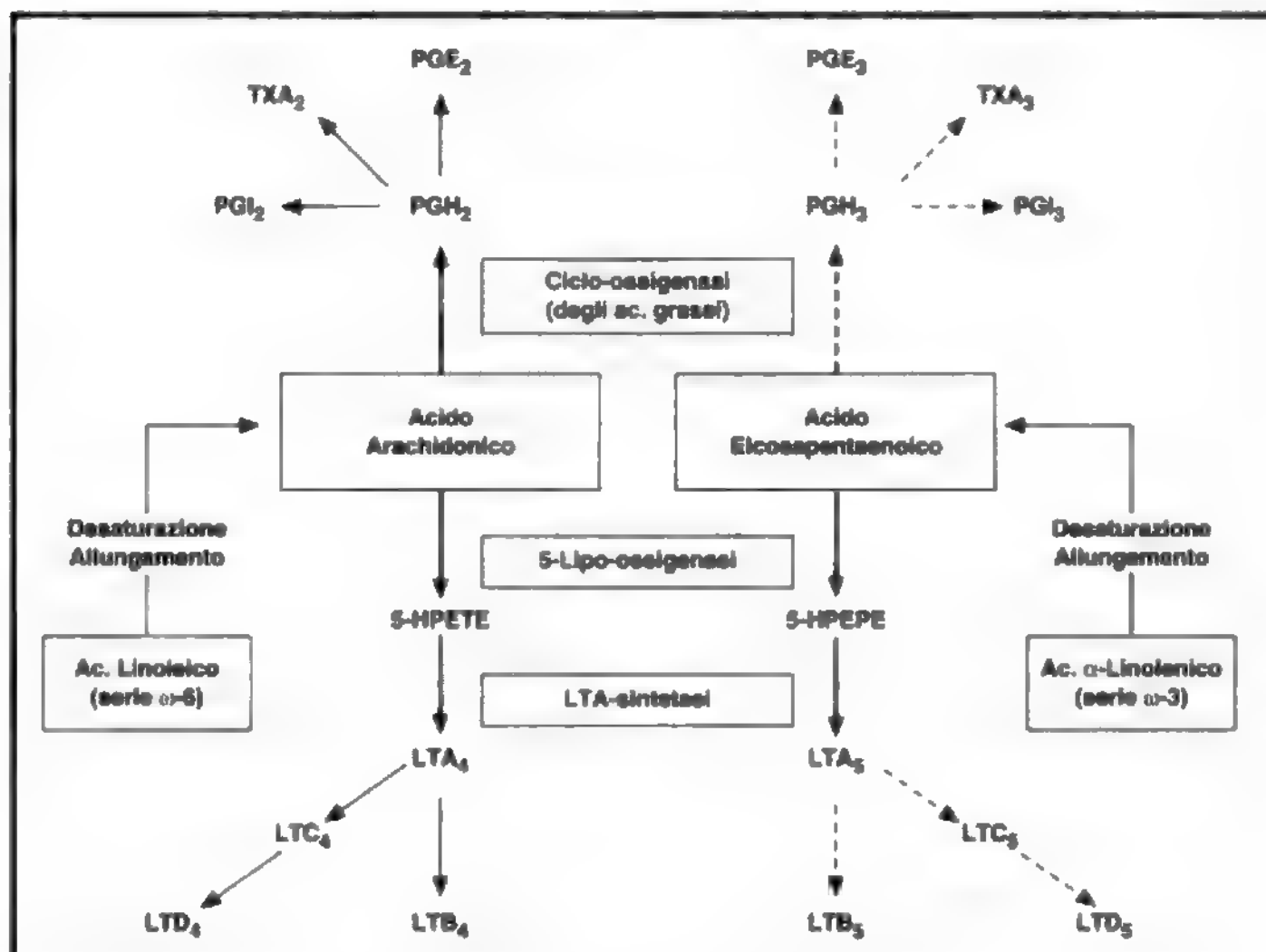
		Eschimesi	Danesi
% Grassi dietetici		39	42
Saturi (%)	Totale	23	53
Monoinsaturi (%)	Totale	58	34
Polinsaturi (%)	18:2 ω -6 linoleico	5,0	10,0
	18:3 ω -3 α -linolenico	0,6	2,0
	20:5 ω -3 eicosapentaenoico	4,6	0,4
	22:5 ω -3 docosapentaenoico	2,6	0
	22:6 ω -3 docosaesaenoico	5,9	0,3
	Totale	19	13
Rapporto polinsaturi/saturi		0,84	0,24
Acidi grassi ω -3 (sui grassi totali)		14	3
Acidi grassi ω -6 (sui grassi totali)		5	10
Colesterolo (mg)		700	420

ciazione, e non un nesso causale, e che danesi ed eschimesi differiscano anche per altri fattori, genetici, ambientali e culturali, questi dati epidemiologici, confermati anche in altre popolazioni caratterizzate da un elevato consumo di pesce, hanno stimolato un numero di studi biochimici, fisiologici e clinici volti ad indagare il supposto effetto antiaterogeno degli acidi grassi ω -3.

Principi attivi, relazioni con gli eicosanoidi e significato nutrizionale

EPA, DPA e DEA appartengono alla famiglia degli acidi grassi polinsaturi ω -3, in cui, cioè, un doppio legame chimico si trova a soli 3 atomi di carbonio dal gruppo metilico terminale della catena. L'uomo è incapace di sintetizzare acidi grassi con doppi legami oltre il nono atomo di carbonio dall'estremo metile terminale (ω -9). Così l'ac. linoleico (C18:2 ω -6), il principale ac. grasso polinsaturo presente negli oli di semi vegetali, e l'ac. α -linolenico (C18:3 ω -3), analogamente presente in alcuni oli vegetali, sono definiti acidi grassi *essenziali* (v. ACIDI GRASSI**). L'ac. linoleico nell'uomo e nella maggior parte dei mammiferi può essere allungato e desaturato per produrre ac. arachidonico, il precursore degli *eicosanoidi*: prostaglandine (v.; v.*) e trombossani della serie 2 (via ciclo-ossigenasi: PGH₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂, TXA₂) e leucotrieni (v.*) della serie 4 (via lipo-ossigenasi: LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) (fig. 1). Dall'ac. α -linolenico possono essere lentamente sintetizzati EPA, DPA e DEA, i quali sono soprattutto introdotti come tali con l'alimentazione (nei pesci essi costituiscono in particolare il 10-30% dei grassi totali, generalmente in misura maggiore in quelli di mare o lago rispetto ai prodotti di allevamento). Alcune categorie di soggetti (neonati prematuri, ipertesi, diabetici, anziani) presentano una ridotta capacità di allungare e desaturare l'ac. linolenico, e ciò li rende ulteriormente dipendenti dall'introduzione di EPA, DPA e DEA con la dieta. L'EPA è il precursore di prostaglandine e trombossani della serie 3 e di leucotrieni della serie 5, con attività biologica diversa dalle precedenti (fig. 1); l'effetto di DEA e DPA sembra dovuto alla loro conversione metabolica a EPA. Più in particolare l'EPA compete con l'ac. arachidonico per la sintesi di eicosanoidi; la sua assunzione dietetica (o di p.) determina un parziale rimpiazzo degli ac. grassi metabolicamente attivi (soprattutto dell'ac. arachidonico) dalle membrane cellulari di piastrine, eritrociti, neutrofili, monociti e cellule epatiche. Come risultato, l'ingestione di EPA, DPA e DEA con il pesce o i suoi derivati induce: a) ridotta produzione dei metaboliti della prostaglandina E₂; b) bassi livelli di trombossano A₂, potente fattore aggregante piastrinico e vasocostrittore (v. PIASTRINE); c) minor concentrazione di leucotriene B₄ (v. LEUCOTRIENI*), induttore molto attivo di flogosi, chemiotassi e adesione leucocitaria (v. INFIAMMAZIONE*; ADESIONE, MOLECOLE DI**); d) aumento del trombossano A₃, debole aggregante piastrinico e dotato di scarsa azione vasocostrittrice; e) aumento della prostaglandina PGI₃ (prostaciclina) ad azione vasodilatatrice e antiaggregante piastrinica simile alla PGI₂, i cui livelli non appaiono diminuiti (v. PROSTAGLANDINE, XII 1157; *6104); f) aumento dei livelli di leucotriene B₅, debole agente infiammatorio e con scarsa attività chemiotattica leucocitaria (fig. 1). Oltre a rappresentare i precursori degli eicosanoidi, gli ac. grassi essenziali possono probabilmente svolgere altre funzioni metaboliche differenziate nelle cellule, in rapporto alla loro localizzazione nei fosfolipidi della membrana citoplasmatica (di cui influenzano la fluidità e le funzioni connesse) e ad una possibile azione diretta di messaggeri intracellulari (v. ACIDI GRASSI**; SEGNALI CELLULARI**).

Fig. 1. Trasformazione dell'ac. arachidonico (serie ω -6) e dell'ac. eicosapentaenoico (serie ω -3) in eicosanoidi. PGH_2 , PGI_2 , PGE_2 , TXA_2 , prostaglandine e trombossani (serie 2 e 3); 5-HPETE, ac. 5-idroperossieicosatetraenoico; 5-HPEPE, ac. idroperossieicosapentaenoico; LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , leucotrieni (serie 4 e 5).



Oli di pesce in terapia: presupposti fisiopatogenetici ed utilizzi

Varie ricerche hanno dimostrato che EPA e DEA sono molecole importanti nello sviluppo del sistema nervoso e di quello visivo: pertanto la dieta della donna gravida ne deve contenere adeguate quantità. Anche il successivo sviluppo del neonato, in particolare se prematuro, necessita di un sufficiente apporto alimentare, normalmente fornito dal latte materno che appare particolarmente ricco di tali composti. Il latte in formula, quale sostituto, ne risulta per lo più sprovvisto, e solo recentemente sono state fornite raccomandazioni in questo senso. Per questi ed altri motivi, appare molto importante la quota relativa ed assoluta di acidi grassi essenziali introdotti con la dieta, non solo nei gruppi di soggetti ricordati ma in tutti gli individui. Vi sono indicazioni che il rapporto tra le serie ω -6: ω -3 nell'alimentazione dei paesi industrializzati sia attualmente 20-30:1, contro un valore di 2-7:1 rilevato per il latte materno e di 1:1 verosimilmente caratteristico della dieta dei nostri progenitori. Si ritiene che questi acidi grassi dovrebbero contribuire per il 10% dell'apporto calorico totale, nella proporzione di 1:1 fra le due varietà. Ciò può essere ottenuto da una parte riducendo il consumo alimentare di acidi grassi ω -6, e dall'altra aumentando quello di pesce (2-3 volte la settimana) oppure assumendo 1 g di o. di p. al dì.

Nonostante alcune segnalazioni contrarie nell'animale, l'uso di o. di p. sembra prevenire le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi. Vari meccanismi sono stati suggeriti, tra i principali un effetto benefico sul profilo lipido-proteico plasmatico.

Nel soggetto normale un aumentato consumo di ac. grassi ω -3 si associa ad una riduzione dei trigliceridi plasmatici e delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) loro principali carriers; anche la concentrazione delle lipoproteine post-prandiali (chilomicroni e loro remnant) si riduce. Questo effetto appare ulteriormente potenziato nei pazienti affetti da varie dislipidemie (ipertrigliceridemie e

iperlipemia combinata [v. LIPOPROTEINE*; IPERLIPOPROTEINEMIE E IPOLIPOPROTEINEMIE, v.*; v.**]): un supplemento giornaliero di 3-5 g di acidi grassi ω -3 riduce la trigliceridemia del 25-50%. Questa azione sembra in rapporto ad una inibizione della esterificazione degli altri acidi grassi a livello epatico, ad una loro aumentata ossidazione (con minor disponibilità ad essere veicolati nelle lipoproteine), ad una riduzione della quota di acidi grassi liberi plasmatici (FFA) e, probabilmente, ad altri meccanismi ancora mal definiti (v. ACIDI GRASSI**).

I livelli di colesterolo appaiono per lo più immutati, ma i dati sono in parte contraddittori. È probabile che la riduzione del colesterolo delle VLDL sia bilanciata da modici aumenti del colesterolo delle lipoproteine ad alta (HDL) e bassa densità (LDL). L'ultimo effetto potrebbe essere dovuto alla sintesi di VLDL di piccole dimensioni, preferenzialmente trasformate a livello plasmatico in LDL. Il significato attribuito alla ossidazione delle LDL nella patogenesi dell'aterosclerosi giustifica, tuttavia, alcuni timori suscitati dall'introduzione di elevate quantità di o. di p. nell'organismo. Gli acidi grassi polinsaturi appaiono, infatti, facilmente perossidabili e pertanto potenzialmente dannosi alla parete vascolare, specialmente in caso di ridotti livelli degli antiossidanti naturali (v. ACIDI GRASSI**).

La somministrazione di o. di p. può svolgere altre azioni potenzialmente antiaterogene: la viscosità ematica e la pressione arteriosa sembrano ridursi e lo stato coagulativo plasmatico modificarsi in senso fibrinolitico. Inoltre vi sono indicazioni che essi diminuiscano l'adesività piastrinica, le interazioni con l'endotelio e la chemiotassi dei leucociti (tramite un'alterato equilibrio tra le varie serie degli eicosanoidi, come già illustrato) e la proliferazione delle cellule muscolari lisce, con ciò prevenendo la formazione e l'espansione della placca aterosclerotica.

Un effetto antiaritmico a carico del miocardio sembra dovuto ad una modulazione dei canali del calcio e può es-

sere responsabile di almeno parte della ridotta mortalità riscontrata nei pazienti cardiopatici.

Le iniziali osservazioni sulla popolazione eschimese (tab. II) ed una serie di studi sperimentali indicano che la somministrazione di α . di p. riduce la gravità di malattie infiammatorie croniche ed autoimmuni quali l'artrite reumatoide ed altre collagenopatie, la psoriasi, la dermatite atopica, la colite ulcerosa, le glomerulonefriti, l'asma bronchiale: anche in tal caso si ritiene che un modificato rapporto tra prostaglandine e leucotrieni originati a partire dagli acidi arachidonico (ω -6) ed eicosapentaenoico (ω -3) rappresenti il principale meccanismo responsabile. Nei soggetti diabetici la somministrazione di α . di p. tende a migliorare il profilo lipidico (frequentemente alterato) e, secondo alcuni ricercatori, anche quello glicemico e a ridurre inoltre la perdita urinaria di albumina (microalbuminuria).

Va notato che, così come nell'ambito dell'aterosclerosi, anche in tutte queste patologie il miglioramento indotto dall'utilizzo di α . di p. appare di entità moderata, e non sempre univocamente comprovato.

V. anche: ACIDI GRASSI** (coll. **22-40); ARTERIOSCLEROSI [v. II, 953], [v. *781], [v. **590-598]; LIPIDI; OLIO DI FEGATO; VITAMINE (XV, 2158; *7579).

Bibliografia

- Bang H. O., Dyerberg J., Sinclair H. M., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, **33**, 2657-2661.
De Caterina R., Endres S., Kristensen S. D., Schmidt E. B. eds., *n-3 fatty acids and vascular disease*, 1993, Springer-Verlag, London.
De Caterina R., Kristensen S. D., Schmidt E. B. eds., *Fish oil and vascular disease*, 1992, Springer-Verlag, London.
Donadio J. V. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1994, **331**, 1194.
Kasim-Karakas S. F., *Curr. Opin. Lipidol.*, 1995, **6**, 167-171.
Priehard B. N. C., Smith C. C. T., *Br. Med. J.*, 1995, **310**, 819-820.
Schmidt E. B., *Drugs*, 1994, **47**, 405-424.

RENATO FELLIN E GIOVANNI BATTISTA VIGNA

OLIO D'OLIVA [v. vol. X, coll. 1616-1617]

SOMMARIO

Consumi di olio di oliva in Italia (col. 4155). - Composizione chimica (col. 4155). - L'olio di oliva nell'alimentazione dell'uomo (col. 4156): L'olio di oliva nell'alimentazione del bambino. - L'olio di oliva nell'alimentazione dell'adulto. - L'olio di oliva nell'alimentazione dell'anziano. - Brevi note sull'uso dell'olio di oliva nella preparazione dei cibi (col. 4158).

Consumi di olio di oliva in Italia

I consumi di olio di oliva (α . di o.) in Italia ammontano a 11,7 kg per abitante per anno, contro 13,9 kg di oli di semi, 2,1 kg di burro e 3,6 kg di altri grassi animali.

I consumi di grassi da condimento nell'Italia centromeridionale sono di solito moderati e assicurati pressoché per intero dall' α . di o. Viceversa, nelle regioni padano-venete e tra le Alpi prevalgono il burro e gli oli di semi e i consumi sono più elevati. Cosicché, mentre nel Centro-sud l' α . di o. riesce da solo a coprire i livelli raccomandati di consumo di acidi grassi essenziali (v. ACIDI GRASSI**), nel restante del Paese l'obiettivo può essere raggiunto con più difficoltà: idealmente, solo ripartendo i grassi animali metà a metà con gli oli di semi.

Composizione chimica

Al pari che per tutti gli altri oli grassi, nell' α . di o. si distinguono due frazioni: una *saponificabile* (98-99%), costituita essenzialmente da trigliceridi, ma anche da mono- e digliceridi, e l'altra *insaponificabile* (circa 1-2%), contenente numerosissime sostanze (v. sotto) che, per quanto presenti in quantità molto piccole, contribuiscono a conferire all' α . di o. le sue

peculiari caratteristiche organolettiche e alcune delle sue proprietà nutrizionali.

Il contenuto in grassi neutri della frazione *saponificabile* è praticamente costante in tutti gli oli vegetali. Viceversa, la componente acidica varia considerevolmente tra una specie e l'altra (tab. I) e persino nell'ambito della stessa specie. Così, nell' α . di o. predomina l'ac. oleico (C 18:1, ω -9), mentre negli oli di semi di cereali e di leguminose sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA, *Polyunsaturated Fatty Acids*) a prevalere. Sorprendentemente, nell' α . di o. gli ac. linoleico (18:2, ω -6) e α -linolenico (18:3, ω -3) sono presenti in quantità del tutto sovrapponibili a quelle del latte muliebri (tab. I).

Tra le molte sostanze della frazione *insaponificabile* vanno in particolare ricordate le seguenti: alcoli alifatici, alcoli triterpenici, tra cui di un certo interesse è il cicloartenolo, che stimola l'escrezione degli acidi biliari e favorisce così l'eliminazione fecale del colesterolo; composti fenolici (fenoli, polifenoli e acidi fenolici), con proprietà antiossidanti, che contribuiscono a rendere l' α . di o. più resistente di altri grassi all'irrancimento; fitosteroli, con larga prevalenza del β -sitosterolo, che ostacolano con meccanismo competitivo l'assorbimento intestinale del colesterolo; fosfolipidi, soprattutto fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina; idrocarburi, tra cui il più importante sotto il profilo nutrizionale è il β -carotene, precursore del retinolo (Vit. A) ed energico antiossidante; pigmenti (carotenoidi, clorofilla); sostanze aromatiche; tocoferoli (in massima parte α -tocoferolo), energici antiossidanti che contribuiscono a proteggere l' α . di o. dai fenomeni ossidativi e nell'organismo contrastano la lipoperossidazione e la formazione di radicali liberi (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]).

L'olio di oliva nell'alimentazione dell'uomo

L'olio di oliva nell'alimentazione del bambino

L' α . di o., proprio in ragione della sua composizione in acidi grassi, che lo rende almeno per quest'aspetto molto simile al latte di donna (tab. I), può esser utilizzato senza problemi nell'alimentazione del bambino. Se ne consiglia anzi l'uso, dal divezzamento in poi, nella prima come nella seconda infanzia, su su fino all'adolescenza, nelle diverse fasi dell'accrescimento e oltre ancora.

L'olio di oliva nell'alimentazione dell'adulto

Olio di oliva e stress ossidativo. - Diete esageratamente ricche di PUFA (v. sopra) aumentano sensibilmente la produzione di radicali liberi e, con essi, l'esposizione al rischio oncogeno, all'aterosclerosi, alle epatopatie, alla litiasi biliare, alle malattie infiammatorie. Un effetto collaterale della formazione di radicali liberi e dell'intensa lipoperossidazione di membrana che ne consegue — in parte ostacolata dagli antiossidanti naturali presenti negli alimenti (i tocoferoli, *in primis*) — è il precoce invecchiamento delle

TAB. I. COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI DELL'OLIO DI OLIVA A CONFRONTO CON ALTRI OLI E CON IL LATTE DI DONNA

(da Sorrentino, 1986)

Fonte	Acidi grassi			
	Saturi	Oleico	Linoleico	Linolenico
(in % degli acidi grassi totali)				
Olio d'arachide	17-21	40-70	13-28	0
Olio di germe di mais	12-18	20-50	34-62	0,1-2,5
Olio di girasole	5-13	21-55	56-66	—
Olio di oliva	6-18	56-83	8-12	0,5-1,5
Latte muliebri	42-48	32-35	8,3-11,5	0,5-1,5

cellule (v. RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA [v.; v.*]). Il rapporto tocoferoli/PUFA (mg%/g%) della dieta non dovrebbe mai scendere al di sotto di 0,4. Anche in questo, l'olio vergine di oliva, con un rapporto di 1,87, si dimostra superiore essendo in grado di proteggere i lipidi di membrana dalla perossidazione assai meglio di quanto non riesca a fare un qualsiasi altro olio vegetale ricco di PUFA.

Olio di oliva e apparato cardiovascolare. — È stato dimostrato che l'ac. oleico fa diminuire le LDL (v. LIPOPROTEINE [v.; v.*]); le HDL restano, invece, invariate o addirittura aumentano; e, con esse, il rapporto HDL/LDL (Mattson e Grundy, 1985; Grundy, 1986; Baudet *et al.*, 1984; Jacotot *et al.*, 1988). Una dieta ricca di o. di o. fa diminuire la colesterolemia totale (esattamente come una dieta ricca di polisaccaridi), ma, diversamente dai polisaccaridi, l'o. di o. fa diminuire il colesterolo (v.; v.*) totale e quello LDL, lasciando immutati i trigliceridi e il colesterolo HDL.

L'o. di o. arricchisce le LDL di ac. oleico e di sitosterolo e, in particolare, l'ac. oleico riduce l'ossidabilità di queste LDL modificate e la loro suscettibilità a essere captate dai macrofagi. Come regola generale sembra potersi ammettere che, all'aumentare del contenuto di ac. oleico, aumenta la resistenza alla lipoperossidazione delle lipoproteine (LDL incluse) e diminuisce la loro aterogenicità.

L'azione protettiva dell'o. di o. sul rischio coronarico potrebbe peraltro esplicarsi anche con altre modalità: ad es., favorendo la produzione di prostaciline e facendo aumentare il contenuto di ac. oleico nei fosfolipidi delle piastrine a spese dell'ac. arachidonico, vale a dire a spese del precursore del trombossano A₂ (v. PROSTAGLANDINE [v.; v.*]). L'inibizione della sintesi del trombossano A₂ potrebbe spiegare le proprietà antiaggreganti dell'o. di o. D'altra parte, non può essere nemmeno esclusa un'azione ipotensiva, sia pure indiretta, degli acidi grassi monoinsaturi dell'o. di o. A conferma, alcune osservazioni cliniche recenti indicano che passando da un'alimentazione ricca di acidi grassi saturi a una ricca d'o. di o. diminuisce la pressione sistolica.

Sembra, dunque, potersi ammettere un ruolo positivo dell'o. di o. nella profilassi delle coronaropatie (Fajardo Martos, 1993).

Olio di oliva e apparato digerente. — Al pari di tutti gli altri grassi, l'o. di o. stimola l'increzione di *enterogastrone*, riducendo sensibilmente la secrezione acida dello stomaco, ma a differenza degli altri esercita anche una sua peculiare e ben definita azione protettiva della parete gastrica: sia *diretta*, meccanica, per rivestimento della parete con un film di emulsione oleosa finissima, sia *indiretta*, da inibizione della secrezione gastrica mediata da altri ormoni gastrointestinali (neurotensina e peptide YY) o da stimolazione della secrezione alcalina delle cellule dell'antro pilorico e del fondo dello stomaco. L'o. di o. si rivela, così, utile anche nella prevenzione e nella dietoterapia dell'ulcera gastroduodenale.

L'o. di o. favorisce sia la secrezione biliare che la liberazione di *colecistochinina* e, quindi, lo svuotamento della cistifellea, comportandosi da coleretico e da colagogo insieme. Tanto da giustificare l'impiego nel trattamento delle discinesie delle vie biliari — specie delle forme ipotoniche — e nell'atonìa della colecisti. Per questa via agevola anche la digestione e l'assorbimento dei grassi alimentari e attiva la peristalsi intestinale. Promuove l'escrezione dei sali biliari e del colesterolo dal fegato e la loro rimozione dal tenue.

L'o. di o., infine, stimola la secrezione esocrina del pancreas e migliora l'utilizzazione digestiva dei grassi e delle proteine alimentari.

L'olio di oliva nell'alimentazione dell'anziano

Con l'avanzare dell'età, la spesa energetica giornaliera va calando progressivamente. Le ragioni sono più d'una. Ma

prima fra tutte è la diminuzione del dispendio energetico di *mantenimento* — il cosiddetto metabolismo basale (MB) — che si calcola scenda in media del 30% tra 25 e 79 anni (FAO/WHO, 1973). Ci sono poi da porre ancora in conto: la riduzione dell'attività fisica (e quindi del dispendio energetico di *attività*); la maggior prevalenza delle malattie e delle invalidità; le modificazioni del peso e della composizione corporea.

Nello stabilire la razione lipidica dell'anziano non si devono trascurare le azioni negative dell'eccesso di PUFA o della carenza di antiossidanti naturali sui lipidi di membrana (v. sopra). Gli acidi linoleico e α -linolenico, in quantità eccedenti, rispettivamente, il 2% e lo 0,5% dell'introito energetico, accelerano i processi di degenerazione cerebrale e l'insorgenza della demenza senile. Anche in questo una dieta ricca di o. di o. può risultare vincente.

Per quanto l'importanza di alcuni fattori di rischio coronarico vada attenuandosi con l'età, sono ancora da tenere in conto le azioni positive dell'o. di o. nei riguardi della profilassi della malattia coronarica e dell'aterosclerosi in genere.

In alimentazione geriatrica l'o. di o. trova altri utili impieghi: stimola la motilità delle vie biliari extraepatiche e la peristalsi intestinale, facilita la digestione e l'assorbimento dei grassi, favorisce la rimozione intestinale del colesterolo. Agisce in più da blando lassativo, proprietà quest'ultima che può validamente contribuire a combattere la stitichezza atonica, tutt'altro che infrequente nel vecchio.

Brevi note sull'uso dell'olio di oliva nella preparazione dei cibi

Per le proprietà sopra elencate, l'o. di o. è elemento pregiato e insostituibile di quella riscoperta alimentare che è la *dieta mediterranea* (v. DIETETICA**, coll. **1584-1586).

Una domanda che spesso ci si pone è se per cucinare e, in particolare, per friggere, sia meglio l'o. di o. o se non siano piuttosto da preferire gli oli di semi, per una supposta minor grassezza di questi ultimi. In proposito è da dire anzitutto che gli oli, tutti gli oli, e proprio per essere tali, sono costituiti, frazione *insaponificabile* a parte, esclusivamente da grassi. Di cui cambierà la composizione acidica ma non il valore calorico: che per tutti indistintamente è di 9 kcal/g. E, pertanto, non esiste un olio che sia meno grasso di un altro. Cambiano semmai alcune caratteristiche di *sicatività* per cui un fritto può sembrare meno grasso di un altro. Ma solo sembrare.

L'o. di o. è più resistente agli shock termici, specie se prolungati, degli oli di semi che, a causa del maggior contenuto in acidi grassi polinsaturi, risultano più termolabili. Se un o. di o., infatti, può accettare una o due rifritture (sempre meglio filtrarlo, prima di riutilizzarlo!), altrettanto non può dirsi per un olio di semi, che, per la sua intrinseca «fragilità», andrebbe rigorosamente sostituito ogni volta.

Riteniamo che l'o. di o. sia di gran lunga da preferire soprattutto quando si tratta di condire a crudo.

V. anche: ACIDI GRASSI**, ALIMENTI, DIETETICA (v.; v.**); LIPIDI; LIPOPROTEINE (v.; v.*).

Bibliografia

- Baudet M. F., Dachet C., Lasserre M. *et al.*, *J. Lipid Res.*, 1984, **25**, 456-468.
 Fajardo Martos B., *Agricultura, Rev. Agropec.*, 1993, **730**, 402-405.
 FAO/WHO, *Energy and Protein Requirements*, FAO Nutr. Mtg.s Rept. Ser.s No. 52, 1973, FAO, Roma; WHO Tech Rept. Ser.s No. 522, 1973, WHO, Geneva.
 Grundy S. M., *N. Engl. J. Med.*, 1986, **314**, 745-748.
 ISTAT, *Annuario Statistico Italiano 1994*, 1995, Roma.
 Jacotot B., Baudet M. F., Lasserre M. *et al.*, *Rev. Fran. Corp Gras*, 1988, **35**, 51-55.
 Mattson F. H., Grundy S. M., *J. Lipid Res.*, 1985, **26**, 194-202.
 Panatta G. B., *Molini d'Italia*, 1997, Marzo, 60-63.
 Sorrentino D., *Inform. Agrar.*, 1986, **42**, 37-40.

GIOVANNI B. PANATTA

OMEOTICI GENI

1. *homeotic genes*.

Il concetto di *geni omeotici* [g. o.] deriva dalla osservazione della esistenza di alcune mutazioni nel moscerino della frutta *Drosophila*, che portano alla trasformazione di un segmento del corpo in un altro omologo, ma che nell'evoluzione è diventato diverso. Questo concetto di omologia dei segmenti è studiato da circa 50 anni dal genetista americano E. B. Lewis, che parte dall'idea che gli insetti si siano evoluti da animali omometamerici, cioè fatti da segmenti ripetuti, tutti uguali tra loro. Ad un certo punto sarebbero comparsi alcuni geni che, come vedremo appresso, possono oggi essere identificati col complesso di g. o. di *Drosophila*, detto complesso *Bithorax* (*Bx-c*), i quali avrebbero indotto i segmenti successivi a differenziarsi dai precedenti. In questa teoria il segmento primordiale sarebbe identificabile nella *Drosophila* col secondo segmento toracico (T2).

A conforto di questa ipotesi sta il fatto che mutazioni che portano all'assenza di *Bx-c* causano la formazione di una serie di segmenti del corpo tutti uguali a T2, mentre mutazioni che portano alla sua iperfunzione fanno sì che il segmento toracico secondo (T2) tenda a trasformarsi nel terzo (T3); questo a sua volta tende a trasformarsi nel primo segmento addominale (A1) e così via. I g. o. sono quelli dunque che in *Drosophila* specificano l'identità dei vari segmenti corporei.

Vedremo appresso attraverso quali meccanismi molecolari essi esercitano la loro azione e, studiando questi, vedremo che geni che esercitano un effetto simile e dunque assimilabili agli omeotici di *Drosophila* vengono ogni giorno di più trovati in altri organismi, uomo incluso. Tre sono le caratteristiche fondamentali che li accomunano:

1) la presenza di una sequenza evolutivamente conservata, cioè molto simile in tutti loro, detta «omeobox» (v. sotto);

2) il loro effetto sulla specificazione della identità di zone del corpo successive lungo gli assi del corpo o di parti di esso (ad es., lungo gli assi degli arti);

3) la loro disposizione in maniera raggruppata ed ordinata lungo il cromosoma, sicché in generale vale la regola che quelli più vicini all'estremo 3' del DNA del cromosoma controllano le parti anteriori e quelli più vicini al 5' le parti posteriori del corpo, per la qual cosa si parla di «colinearità».

Le mutazioni più note della *Drosophila* che sono dovute a cambiamenti nei g. o. sono le cosiddette *bithorax* e *antennapedia*. Nella prima un segmento toracico di *Drosophila*, detto T3, si trasforma in modo più o meno perfetto, secondo il tipo di mutazione, nel segmento che lo precede immediatamente, detto T2. Poiché nell'insetto normale T2 porta ali e T3 no, nel mutante si ha un insetto con quattro ali anziché due. Nelle mutazioni del tipo *antennapedia* accade che due zampette, come quelle che normalmente si hanno in un segmento toracico, si formano nella testa prendendo il posto delle antenne (probabilmente attraverso il blocco dei g. o. *omotorax* ed *extradenticle*; Morata e Sanchez-Errero, 1998).

Nel 1984 due gruppi, uno guidato da Walter Gehring a Basilea e l'altro guidato da Matthew Scott in Colorado, identificarono in tre g. o. una sequenza molto simile in tutti e tre che fu detta «omeobox». Questi tre geni erano stati chiamati dall'effetto delle loro mutazioni *Antennapedia* (*Antp*), *Ultrabithorax* (*Ubx*) e *Fushi tarazu* (*Ftaz*) (questo *Ubx*, che come vedremo è uno dei geni interessati nella mutazione *bithorax*) e *Fushi tarazu* (trovato in *Ftaz* da cui la mutazione porta alla formazione di un numero di segmenti ridotto). La sequenza «omeobox» è fatta di 180 paia di basi e pertanto codifica

per un segmento di proteina di 60 aminoacidi che fu detto «omeodominio».

Una nutrita serie di studi, prima solamente genetici poi di biologia molecolare, hanno portato ad identificare la posizione di numerosi g. o. nei cromosomi della *Drosophila*. Si è visto che essi sono principalmente raggruppati in due complessi detti rispettivamente complesso *Bithorax* (*Bx-c*) e complesso *Antennapedia* (*Antp-c*), che si pensa in insetti ancestrali fossero riuniti in un unico complesso, detto *Hom-c*.

Bx-c contiene, allineati l'uno dopo l'altro, tre geni: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *Abdominal A* (*Abd A*) e *Abdominal B* (*Abd B*). *Antp-c* contiene, sempre allineati l'uno dopo l'altro, quattro geni: *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Sex comb reduced* (*Scr*), *Deformed* (*Dfd*), e *Antennapedia* (*Antp*) (fig. 1, in alto). Come già accennato, essi controllano parti del corpo disposte in senso anteroposteriore in maniera corrispondente alla loro disposizione in senso 3'-5' lungo il cromosoma. Inoltre, studiando questi geni, si è visto che essi contengono una parte che codifica per la proteina prodotta e una parte costituita dalle regioni regolatrici della loro trascrizione in RNA; orbene, anche queste parti dimostrano una «colinearità» nel senso che quelle disposte verso il 3' fanno esprimere lo stesso gene in regioni anteriori del corpo e quelle disposte verso il 5' in regioni posteriori.

Lo studio dell'omeodominio dei g. o. di *Drosophila* portò alla scoperta che essi sono fatti di un certo numero di alfa eliche, in genere tre, legate tra loro da regioni flessibili, con le caratteristiche dei fattori di trascrizione a struttura elica-giro-elica. A seconda della somiglianza delle sequenze degli omeodomini questi sono stati raggruppati in classi sia per la sequenza all'interno dell'omeodominio stesso che per le sequenze che lo fiancheggiano nell'ambito della stessa proteina. La classe più grande, detta I, è quella alla quale appartiene il complesso *Antennapedia* (*Antp-c*) e omeodomini simili, che hanno tutti una sequenza di 12 aminoacidi nelle posizioni tra 44 e 55 dell'elica III identica a quella di *Antp*; le altre classi si classificano come II, III e così via a seconda delle differenze più o meno grandi dal dominio di *Antp*.

Esempi delle altre classi sono quelle di «engrailed, paired, even skipped», e POU (v. sotto), dai nomi dei geni che contengono sequenze fiancheggianti l'omeodominio del tipo corrispondente.

Data la loro funzione nel controllo dell'accensione o meno di altri gruppi di geni che porteranno alla formazione appropriata di vari segmenti del corpo di *Drosophila*, i g. o. sono detti anche geni selettivi.

La scoperta dell'omeobox portò a ricercare se geni contenenti l'omeobox fossero presenti anche in specie diverse dalla *Drosophila* e se si potesse pensare che avessero funzioni analoghe. La risposta è stata largamente positiva. I primi risultati si sono avuti nel topo e nell'uomo. I geni contenenti omeobox in questi due mammiferi sono stati chiamati geni *Hox*. Si è trovato che in questi animali i geni sono circa quaranta cioè quattro volte di più che quelli di *Drosophila*, ma ciò è perché mentre in *Drosophila* i g. o. stanno su di un solo cromosoma, negli altri casi sono ripetuti sempre nello stesso ordine su quattro cromosomi diversi, che nell'uomo sono i cromosomi 7, 17, 12 e 2, e nel topo i cromosomi 6, 11, 15 e 2 (fig. 1). I raggruppamenti che si trovano su questi cromosomi sono stati chiamati 1, 2, 3, e 4 o anche A, B, C e D. Poiché essi sono allineati nello stesso ordine, questi complessi *Hox* possono essere disegnati l'uno sull'altro, come nella fig. 1 in modo che geni uguali tra loro, detti «paraloghi» (cioè geni che si trovano in raggruppamenti differenti ma che sono correlati tra loro più stetta-

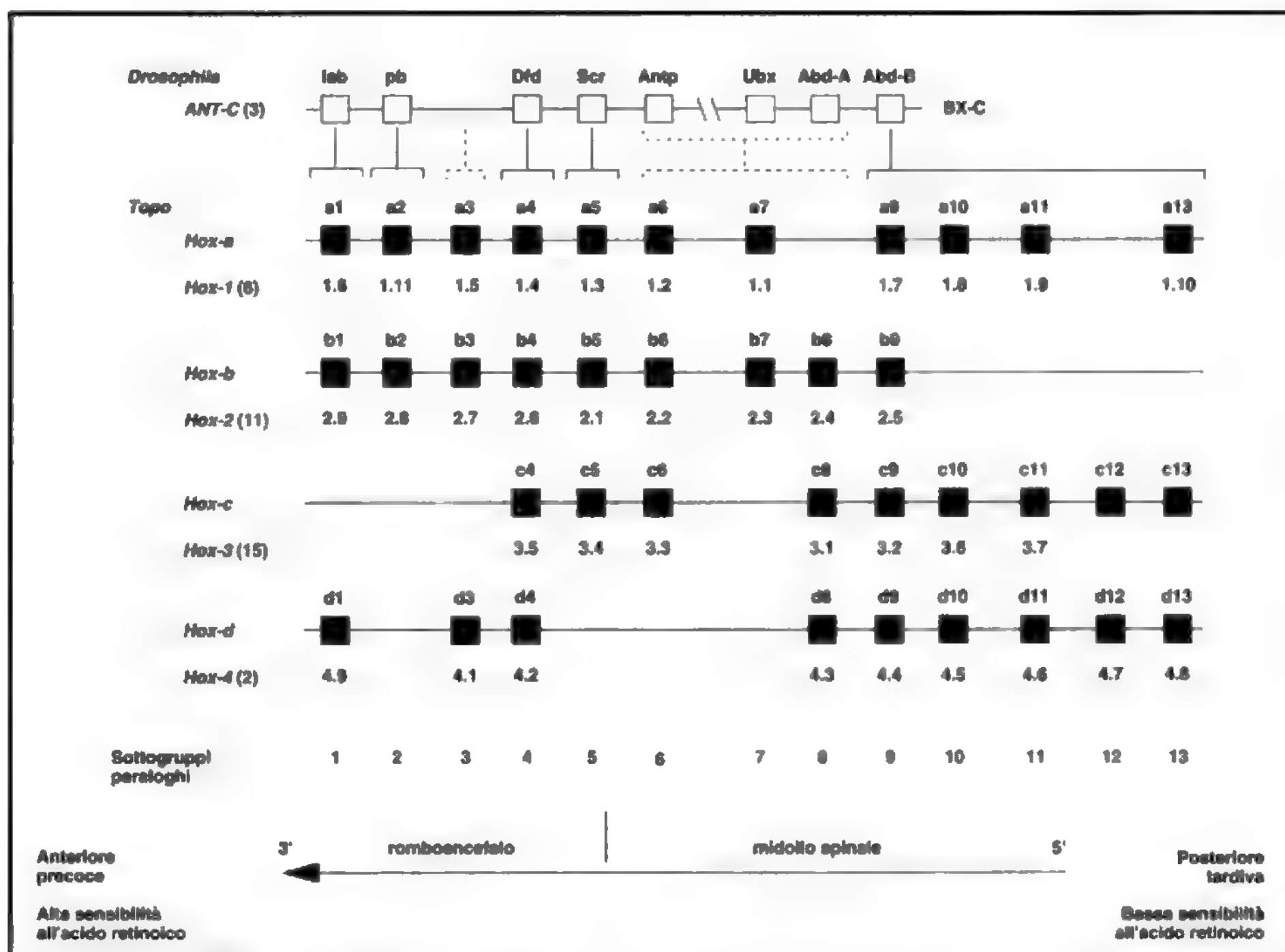


Fig. 1. Organizzazione e allineamento dei complessi *Hom-c* e *Hox*. La riga superiore illustra l'organizzazione dei geni dei complessi *Ant-c* e *Bx-c* nel cromosoma 3 di *Drosophila melanogaster*. I geni disegnati verso sinistra sono quelli situati verso l'estremo 3' del cromosoma e quelli disegnati verso destra sono situati verso il suo estremo 5'. Sotto i geni del complesso *Hom-c* sono riportati i geni dei quattro raggruppamenti *Hox* del topo (*a*, *b*, *c* e *d*), riuniti nel complesso «astratto» *Hom-c*. I nomi dei singoli geni di questi raggruppamenti sono scritti su di ogni gene (ogni quadratino nero). Sotto di ogni gene è anche riportata la vecchia nomenclatura (che classificava i raggruppamenti non da *a* a *d*, ma da 1 a 4). Nella colonna di sinistra sono indicati tra parentesi i numeri dei cromosomi del topo dove risiedono i raggruppamenti. Vi sono 13 geni paraloghi dei vertebrati che si ritiene rappresentino gli omologhi di quelli del complesso *Hom-c*. Vi sono fino a 13 colonne di paraloghi nei vertebrati non tutti rappresentati in ogni cromosoma (Da Krumlauf, 1993, ridisegnata e modificata).

mente, che con quelli a loro contigui) vengano a cadere sulla stessa verticale.

Un'altra osservazione importante è che i geni situati verso l'estremo 3' sono espressi per primi nello sviluppo e che sono i più sensibili all'induzione da acido retinoico. I geni *Hox* sono espressi tutti durante la vita embrionale dei vertebrati: nel topo dal settimo al quindicesimo giorno dal concepimento e nell'uomo dalla quarta alla tredicesima settimana.

La loro espressione però può continuare o riaccendersi nell'adulto con funzioni ancora non note. Il territorio di espressione dei geni *Hox* è stato fondamentalmente studiato attraverso la ricerca dei loro RNA per ibridazione *in situ* e si è visto che similmente a quanto accade in *Drosophila* esso ha un limite anteriore netto e uno posteriore sfumato.

Il loro dominio di controllo funzionale dei vari territori si trova in una fascia ristretta del bordo anteriore del dominio di espressione. Una zona particolarmente studiata nel topo e nel pollo è stata il romboencefalo che può

essere distinto dal punto di vista morfologico, seppure con qualche difficoltà, in una serie di segmenti successivi, detti «rombomeri». Orbene i confini tra un rombomero e l'altro sono chiaramente marcati dai domini di espressione dei geni del complesso *Hox-2* (detto anche *Hox-b*), anche qui in modo che l'ordine da 3' a 5' nel cromosoma corrisponda in generale alla disposizione rostrocaudale dei rombomeri.

Mentre la grande varietà di mutanti noti in *Drosophila* ha reso possibile la comprensione della funzione dei vari g. o. di quell'organismo, la mancanza di questi nei vertebrati ha costretto a ricorrere ad esperimenti effettuati con topi «transgenici» (V. TRANSGENICI ANIMALI[®]) nei quali cioè o siano stati interrotti g. o. con conseguente mancanza della loro funzione o siano stati introdotti g. o. che si iperesprimono. I risultati sono stati coerenti con quanto ci si aspettava, e cioè: in mutanti per eccesso di funzione si hanno difetti dello scheletro assiale, malformazioni craniofacciali e talora tendenza delle prime vertebre ad assumere l'aspetto delle successive; in mutanti per difetto o assenza di fun-

zione si sono osservati una serie di difetti in vari organi e tessuti, che però appartengono per ogni *Hox* ad una stessa regione corporea, delimitata lungo l'asse anteroposteriore e talora si è osservata la tendenza di alcune vertebre ad assumere l'aspetto di quelle più craniali.

Qualche mutante spontaneo di geni con omeodominio si conosce però anche nei vertebrati.

Esempi studiati sono quelli del gene *Pax 1* (della classe *paired*) che dà nel topo la mutazione detta *undulatus* la quale causa nei casi più lievi ondulazione della coda e in quelli più gravi difetti anche letali dell'asse della colonna vertebrale. *Pax 1* è infatti normalmente espresso nei dischi intervertebrali. Una mutazione di un altro membro della classe *Pax*, *Pax 6*, dà difetti dell'occhio nel topo (mutazione *small eye*) e nell'uomo (mutazione aniridia, v. PAX GENI**).

Alcuni membri della classe POU, cosiddetti perché contengono accanto all'omeodominio una sequenza che lega pure il DNA, chiamata POU dalle iniziali di *Pit* (da gene espresso nella pituitaria), di *Oct* (un ottamero nucleotidico) e di *Unc-8* (dalla mutazione *uncoordinated*) sono espressi nel cervello dei vertebrati. Di recente un gene POU, detto *Ultraspiracles*, è stato individuato anche in *Drosophila*. Nello stesso moscerino sono stati isolati i geni *empty spiracles* (*ems*) ed *orthodenticle* (*otd*) espressi molto anteriormente. Si sono trovati gli omologhi anche nei vertebrati e sono stati chiamati *Emx* e *Otx* rispettivamente. Alcuni di questi sono espressi nel cervello. I geni *Hox* intervengono anche nella determinazione degli assi dell'arto degli embrioni di topo e di pollo sia di quello prossimo distale, cioè dalle cinture all'autopodio (mano o piede), che di quello anteroposteriore (dal pollice al mignolo), che di quello dorsoventrale.

Bibliografia

- Boncinelli E., *Biologia dello Sviluppo. Dalla cellula all'organismo*, 1994, La Nuova Italia Scientifica, Firenze, pp. 227-248.
 Conlon R. A., *Retinoic acid and pattern formation in vertebrates*, TIGs, 1995, 11, 314-319.
 Fjose A., *Homeobox and Pax genes in zebrafish development*, in *Current Topics in Developm. Biol.*, 1994, 29, 65-100, Academic Press, New York.
 Holland P., *BioEssays*, 1992, 14, 267-273.
 Krumlauf R., *BioEssays*, 1992, 14, 245-266.
 Krumlauf R., *Trends in genetics*, 1993, 9, 106-112.
 Lewin B., *Genes VI*, 1997, Oxford Un. Press, Oxford, pp. 1198-1212.
 Mann R. S., *BioEssays*, 1995, 17, 855-863.
 Morata G., Sanchez-Errero E., *Science*, 1998, 392, 657.
 Rubenstein L. R., *Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain*, in *Current Topics in Developm. Biol.*, 1994, 29, 2-43, Academic Press, New York.

GIOVANNI GIUDICE

OMEPRAZOLO [v. Agg. I, coll. *5520-5524]

SOMMARIO

Farmacologia (col. 4163). - Applicazioni cliniche (col. 4164).

Farmacologia

L'omeprazolo [o.] (Antra[®]) è il capostipite di una classe di farmaci antisecretivi, cosiddetti inibitori della pompa protonica, in grado cioè di ridurre la secrezione acido-peptica gastrica attraverso l'inibizione dell'H-K ATPasi, enzima responsabile della fase finale della secrezione di HCl, da parte della cellula parietale gastrica. Si ritiene che l'effetto sia secondario all'interazione tra il derivato sulfenamidico dell'o. e specifiche molecole cisteiniche della subunità alfa della pompa protonica. L'o. si caratterizza per una importante capacità di inibire la secrezione acida basale e stimolata in misura dose dipendente.

Una monodose giornaliera di 20 mg si è dimostrata in grado di mantenere il pH intragastrico > 3,0 per circa 14 ore, se somministrata al mattino e per 9 ore con somministrazione notturna. Per quanto concerne la secrezione stimolata, dopo 7 giorni di somministrazione di 10, 20 e 40 mg al giorno, si è potuta documentare una riduzione media, rispettivamente del 35% (range 2-90%), 78% (54-98%) ed 85% (76-96%). In confronto agli H₂ antagonisti, la dose di 20 o 40 mg si è dimostrata significativamente superiore per intensità e durata di azione a ranitidina 150-300 mg al giorno, cimetidina 1200 mg e famotidina 40 mg.

A differenza degli H₂-antagonisti non si sono documentati fenomeni di tachifilassi; l'effetto inibitorio di 20 mg si mantiene infatti inalterato anche dopo 6 o 12 mesi di somministrazione continua.

Recenti osservazioni hanno suggerito inoltre un ruolo particolare dell'o. nella strategia terapeutica dell'infezione da *Helicobacter pylori* con meccanismi che probabilmente riflettono una sinergia d'azione con gli antibiotici (aumento dell'effetto topico di quest'ultimi in seguito ad inibizione della secrezione acida). Le osservazioni *in vitro* circa l'esistenza di un meccanismo diretto (attività battericida con una MIC₉₀ variabile da 8 a 32 mg/l; inibizione dell'attività ureasica con riduzione della produzione di ammoniaca) si sono dimostrate irrilevanti nella pratica clinica. In monoterapia, l'o. ha dimostrato una capacità batteriostatica più che battericida con percentuali di eradicazione dell'*H. pylori* variabili da 0 al 14%.

Applicazioni cliniche

Ulcera peptica. - Nel trattamento a breve termine dell'ulcera duodenale, l'o. 20 mg al giorno ha dimostrato una attività cicatrizzante ed analgesica significativamente superiore a ranitidina 300 mg/die, cimetidina 800-1200 mg e famotidina 40 mg, dopo 2 e 4 settimane di trattamento. Indagini meta-analitiche nei confronti di ranitidina e cimetidina hanno dimostrato un guadagno percentuale dell'o. rispettivamente del 15,2% e 20,6% dopo 2 settimane e del 10,9% e del 12,3% dopo 4 settimane di trattamento. I risultati ottenuti nell'ulcera gastrica non correlata ad anti-infiammatori sono sovrapponibili (tab. I). Negli studi controllati disponibili o. 20 mg si è dimostrato superiore alle dosi usuali di H₂ antagonisti. Nei confronti di ranitidina 300 mg e cimetidina 800-1600 mg sono anche disponibili studi meta-analitici che hanno dimostrato un guadagno terapeutico rispettivamente del 9,9 e 15% dopo 4 settimane e del 6,7 e 9,6% dopo due mesi di terapia.

La dose ottimale di trattamento sembra essere di 20 mg al giorno; studi clinici controllati hanno infatti dimostrato con il dosaggio di 40 mg al giorno solo un mode-

TAB. I. OMEPRAZOLO 20 MG AL GIORNO NEL TRATTAMENTO A BREVE TERMINE DELL'ULCERA GASTRICA E DUODENALE

Guadagno terapeutico vs. H₂ antagonisti [valori ottenuti da indagini meta-analitiche nei confronti di ranitidina (R) e cimetidina (C)]

		2 sett.	4 sett.	8 sett.
Ulcera duodenale	R	15%	11%	
	C	20%	12%	
Ulcera gastrica	R		10%	7%
	C		15%	10%

sto guadagno terapeutico variabile dal 6% dopo 2 settimane, al 4% dopo 4 settimane, al 3% dopo 2 mesi di trattamento.

Lo schema di 40 mg al giorno è consigliabile nei soggetti ulcerosi resistenti agli H₂ antagonisti, anche ad alte dosi, o a 6-8 settimane di trattamento con 20 mg.

Per il trattamento a lungo termine sono attualmente disponibili esperienze a 6 e 12 mesi con somministrazione continuativa di 10-20 mg al giorno oppure di 20-40 mg 2-3 volte alla settimana (trattamento *week end*). La risposta clinica è risultata correlata al grado di inibizione acida con percentuali di recidiva variabili dal 6 al 13% con 20 mg, dal 18 al 27% con 10 mg al giorno e dal 16 al 30% con lo schema *week-end*.

Nei due studi controllati disponibili nei confronti di ranitidina 150 mg *nocte*, o. 20 mg si è dimostrato significativamente superiore con un guadagno terapeutico, dopo 12 mesi, variabile dal 24 al 34%.

Esofagite. - Nel trattamento a breve termine dell'esofagite da reflusso l'o., 20-60 mg al giorno, ha dimostrato una importante attività cicatrizzante ed analgesica variabile dal 57-85% dei casi dopo 4 settimane al 71-96% dopo 8 settimane, in ogni caso superiore agli H₂ antagonisti (impiegati singolarmente o in associazione a cisapride [v.**] o metoclopramide [v.]) ed al sucralfato (v.). Una recente metanalisi nei confronti di ranitidina ha dimostrato un guadagno terapeutico in favore dell'o. del 35 e 40% dopo 4 ed 8 settimane di trattamento.

Ancora incerti sono invece i risultati circa la possibilità dell'o. di prevenire o di indurre una regressione dell'esofago di Barrett (v. ESOFAGO*).

Nel lungo termine la somministrazione continua di o. alla dose di 10-40 mg per 12 mesi si è dimostrata in grado di prevenire la recidiva endoscopica e sintomatica dell'esofagite in una percentuale di casi variabile dal 34 all'89%, significativamente superiore ai farmaci di confronto. Del tutto recentemente si è osservato che l'associazione di cisapride 30 mg al giorno può consentire, dopo 12 mesi di osservazione, un ulteriore guadagno terapeutico del 10% rispetto ad o. 20 mg in monoterapia.

L'efficacia dell'o. persiste anche dopo 1 anno di trattamento continuativo. In soggetti con esofagite refrattaria, o. 20 mg al giorno si è dimostrato in grado di prevenire la recidiva della malattia nel 50% dei casi, anche dopo 5 anni di osservazione.

Meritevole di ulteriori conferme è invece lo schema che prevede la somministrazione di 20 mg a giorni alterni.

Sindrome di Zollinger-Ellison. - L'o. si è dimostrato il farmaco di scelta nel trattamento della sindrome di Zollinger-Ellison (v. ZOLLINGER-ELLISON, SINDROME DI). Alla dose di 10-180 mg, eventualmente refratta nella giornata ed ottimizzata mediante monitoraggio del pH intragastrico, il farmaco è risultato in grado di controllare adeguatamente l'ipersecrezione acida nel 100% dei casi per periodi superiori a 60 mesi.

Trattamento antinfettivo. - Nella terapia dell'infezione da *Helicobacter pylori* l'impiego dell'o. è attualmente previsto in associazione con uno (duplice terapia) o due antibiotici (triplice terapia).

Per la duplice terapia, particolari spunti di interesse riveste l'associazione di o. 20-40-80 mg al giorno, con claritromicina (250 mg *tid* o *qid*) o amoxicillina (1 g *bid* o *tid*) per 10-14 giorni. La risposta terapeutica è tuttavia molto variabile con percentuali di successo comprese tra il 40 ed il 90%. I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando dosi refratte (ad es. omeprazolo 20 mg *bid*) e facendo coincidere l'inizio della terapia antibiotica con quella dell'antisecretivo. I vantaggi della duplice terapia sarebbero costituiti da

un rapido potere analgesico, dalla facilità di assunzione e dal rischio modesto di effetti collaterali.

Migliori risultati fornisce la triplice terapia. Gli schemi maggiormente utilizzati prevedono l'associazione di o. 20 mg *bid*, con tetraciclina 250 mg *qid* (oppure amoxicillina 1-2 g/*die*) e metronidazolo 250 mg *tid-qid* (oppure tinidazolo 500 mg *bid*) per una durata di 7-14 giorni. In alternativa alla amoxicillina o tetraciclina è stato recentemente proposto l'impiego di un macrolide (claritromicina 250 mg *bid-tid*).

Nei casi resistenti ai nitroimidazolici si è suggerita infine l'associazione di inibitori della pompa protonica, amoxicillina e claritromicina.

I risultati ottenuti con le diverse combinazioni sono confortanti per quanto concerne l'eradicazione (con percentuali variabili dal 65 al 98%) e l'accettabilità da parte del paziente (elemento fondamentale per la buona riuscita della terapia).

Bibliografia

- DeBoer W. A., Tytgat G. N. J., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1994, 8, 147-157.
 Eriksson S., Lagstrom G., Rikner L. et al., *Eur. J. Gastroenterol. Hepat.*, 1995, 7, 467-475.
 Freston J. W., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1993, 7, suppl., 1, 68-75.
 Klinkenberg-Knol E. C., Festen H. P. M., Meuwissen S. G. M., *Drugs*, 1995, 49, 695-710.
 Vigneri S., Termini R., Leandro G. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333, 1106-1110.
 Wilde M. I., McTavish D., *Drugs*, 1994, 48, 91-132.

MARCO LAZZARONI E GABRIELE BIANCHI PORRO

OMINAZIONE [v. vol. X, coll. 1666-1693]

SOMMARIO

Definizione e generalità (col. 4166). - **Acquisizione della stazione eretta e della locomozione bipede** (col. 4167). - **Altre acquisizioni** (col. 4169). - **Gli australopithecini** (col. 4170). - **Il genere Homo** (col. 4172): *Transizione da Homo habilis a Homo erectus*. - *La valutazione delle variazioni morfologiche*. - *Homo erectus e lo sviluppo dell'encefalo*. - *Origine di Homo sapiens*. - *L'uomo di Neandertal*.

Definizione e generalità

Ominazione [o.] è una parola coniata intorno agli anni '50 sulla falsariga di *speciazione* (= formazione di nuove specie [v. SPECIE]) per indicare i processi che hanno portato alla evoluzione della nostra specie a partire da antenati preumani riferibili alla superfamiglia degli *Hominoidea*.

La superfamiglia degli *Hominoidea* comprende tre famiglie: *Pongidae* (cioè le scimmie antropomorfe), *Hylobatidae* (cioè i gibboni) e *Hominidae*. *Pongidae* a loro volta comprendono due sottofamiglie: *Dryopithecinae* (tutti estinti) e *Ponginae*; *Hominidae* comprendono tre sottofamiglie: *Ramapithecinae* (estinti, di dubbia attribuzione), *Australopithecinae* (estinti) e *Homininae* (fig. 1).

Per molto tempo si è pensato che l'anello mancante tra l'uomo e i pongidi dovesse presentare caratteristiche esattamente intermedie tra quelle dei due gruppi di animali. Questa visione semplicistica è stata in seguito radicalmente mutata: l'o. si è svolta su di un arco di una quindicina di milioni di anni ed ha coinvolto, in un primo tempo, l'acquisizione della stazione eretta e, probabilmente, il passaggio dall'organizzazione gregaria a quella sociale; in un secondo tempo, modifiche della dentatura e del cranio facciale; in un terzo tempo, sviluppo del cervello con modifiche del neurocranio; in un quarto tempo, riduzione della dentatura e del massiccio facciale. Ogni mutamento morfologico può essere correlato ad un mutamento di habitat.

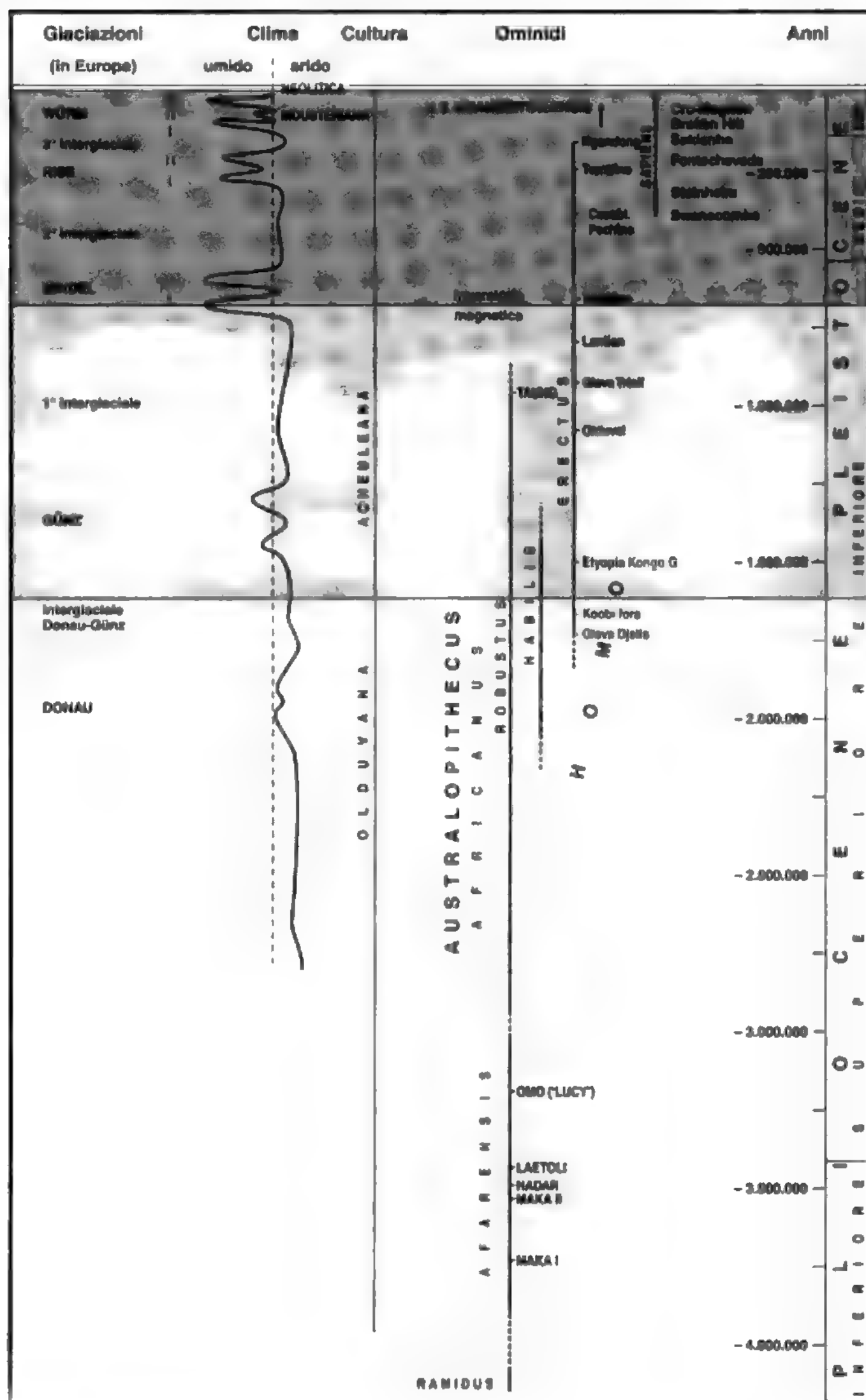


Fig. 1. Diagramma delle variazioni climatiche, del susseguirsi delle culture preistoriche, della successione degli Ominidi durante il Plio-Pleistocene. Le variazioni climatiche per il periodo anteriore a 2.700.000 anni non sono note nel dettaglio, ma nell'insieme il clima era più arido dell'attuale (linea tratteggiata). Per quanto riguarda le culture non tutte iniziano e terminano simultaneamente: nell'oriente asiatico la cultura olduvana prosegue più a lungo. Non tutte le specie e i generi di Ominidi che sono stati proposti sono inseriti nel diagramma.

Acquisizione della stazione eretta e della locomozione bipede

Che gli ominidi derivino da primati brachiatori, cioè da primati che si muovevano tra i rami sospesi con le braccia, è testimoniato dalla forma della cassa toracica, dall'articolazione del braccio che consente movimenti che nessun altro mammifero può effettuare, dall'articolazione del le-

more sul bacino che permette l'allineamento del femore con l'asse del corpo. Tutte queste caratteristiche sono presenti nel genere *Dryopithecus* del Miocene inferiore e medio (circa 16-20 milioni di anni fa) e in minor misura nelle specie di *Proconsul* del Miocene inferiore (circa 23 milioni di anni fa), animali per i quali è ben conosciuto anche lo scheletro del braccio e della mano. *Proconsul* aveva le di-

mensioni di un piccolo scimpanzé, conservava la mano non ancora modificata come si osserva nei pongidi moderni: il pollice è ben sviluppato e le dita non sono flesse ad uncino; le braccia, inoltre, non avevano subito il grande sviluppo, per cui presso i gibboni, gli oranghi e altre specie brachiatrici sono divenute più lunghe e robuste delle gambe.

È da presumere che le prime specie terragnole a stazione eretta siano derivate da brachiatori poco specializzati. Va osservato infatti che un animale inerme che abbandona l'habitat arboricolo per vivere in un ambiente molto più pericoloso deve trovarsi subito in condizioni di vedere lontano e muoversi con facilità. Questa ipotesi è stata avanzata in modo molto preciso fin dai primi studiosi che si sono occupati, come allora si diceva, della derivazione dei 'bimani' dai quadrumani.

Quando i brachiatori specializzati, come il gorilla e lo scimpanzé, hanno abbandonato a loro volta la vita arboricola per quella terragnola lo scheletro delle gambe e del tronco aveva subito troppe modifiche perché potessero assumere in modo permanente la stazione eretta sicché essi procedono con andatura quadrupede poggiando al suolo le nocche delle falangi che hanno acquisito una protezione efficace contro i traumi.

Il primo brachiatore specializzato che si conosce è *Dryopithecus laietanus* del Miocene medio (~ 9,5 milioni di anni fa).

Purtroppo per il genere miocenico *Ramapithecus*, munito di dentatura simile a quella degli ominidi, non si hanno dati sicuri sullo scheletro postcraniale, ma per tutti gli australopithecini pliocenici di cui si conservano le pelvi e le ossa delle gambe risulta che avevano stazione eretta e andatura non diversa o tutt'al più poco diversa da quella dell'uomo attuale.

Altre acquisizioni

Sempre nell'epoca miocenica dev'essersi verificato un incremento della vita gregaria: animali sprovvisti di armi di difesa e di offesa potevano difendersi dai predatori, allora numerosi e terribili, soltanto collettivamente. L'evoluzione ulteriore ha implicato una forte riduzione dell'aggressività intraspecifica e la capacità di 'vedere' se stesso come eguale agli altri membri del gruppo: senza questi presupposti comportamentali una vita sociale per un mammifero non è pensabile. Lo sviluppo di una vita sociale implica, come è accaduto per i canidi, una qualche gerarchizzazione e soprattutto l'accettazione di divieti e di compiti particolari: esploratori, custodi, foraggiatori.

Sulla base delle peculiarità che attualmente contraddistinguono la specie umana nel complesso dei Primati, si possono avanzare altre ipotesi di lavoro. È plausibile, ad esempio, che l'allungamento della durata potenziale della vita, compensato tuttavia dalla riduzione del periodo fertile della femmina, sia stato conseguito attraverso la selezione di gruppo suggerita da Ch. Darwin: quando vi sono numerosi gruppi sociali, capaci di moltiplicarsi e in concorrenza tra di loro, ricevono un premio selettivo quelli che in un ambiente avaro soddisfano nel modo più economico ed efficiente i propri bisogni (collettivi).

È anche lecito ipotizzare che l'aumento di prolificità, che nella donna risulta circa doppia di quella di pongidi attuali, nonché la dieta onnivora, ma prevalentemente carnivora, siano stati conseguiti molto precocemente.

L'allungamento della vita media e l'incremento della prolificità avrebbero causato, fin dall'inizio della storia, una pressione demografica che ha determinato la dispersione delle popolazioni degli ominidi su superfici molto vaste. Dispersione agevolata anche dall'andatura bipede che conferisce resistenza su percorsi lunghi, e dalla dieta onnivora che permette di inoltrarsi in ambienti molto vari.

Che i primi ominidi si cibassero di carne, forse di carcasse di grandi mammiferi, sembra proprio testimoniato dal fatto che l'uomo attuale è parassitato da vermi intestinali tipici dei carnivori, ma appartenenti a specie che gli sono esclusive: *Taenia solium* che circola tra l'uomo e i suini, e *Taeniarhynchus saginatus* che circola tra l'uomo e i bovini. Poiché i parassiti interni dei vertebrati godono di un ambiente molto più stabile di quello dei loro ospiti, essi hanno

evoluzione molto più lenta di questi: da ciò non è difficile concludere che la convivenza dell'uomo e delle due specie di tenie rimonta ad epoche molto remote. Anche il fatto che l'ascaride proprio dell'uomo e quello del maiale appartengano a specie simili, benché diverse, testimonia che ominidi e suini hanno condiviso dieta onnivora molto a lungo.

Gli australopithecini

La più antica specie fossile che può essere attribuita con sicurezza agli ominidi è *Australopithecus ramidus* descritto per il Pliocene inferiore dell'Etiopia centro-orientale. Ha stazione eretta mentre la dentatura conserva canini piuttosto pronunciati, e smalto di medio spessore. Nell'insieme si avvicina appena un po' di più allo scimpanzé (*Pan troglodytes*) di quanto si avvicina il suo diretto successore *A. afarensis*, vissuto nella boscaglia dell'Africa orientale mezzo milione di anni dopo.

A. afarensis aveva un corpo da pigmeo umano, con statura da 1,20 a 1,35 m, sormontato da un capo decisamente scimmiesco, munito però di arcate dentarie ogivali da ominide con denti protetti da smalto di spessore molto forte (da 1,4 a 2 mm) e canini incisiviformi. Gli specialisti sono d'accordo nel mettere queste caratteristiche della dentatura in rapporto con una dieta a base di cibi molto duri e con una masticazione favorita da movimenti laterali della mandibola. Rimane la domanda: quali cibi duri? Alcuni AA. pensano che si trattasse di granaglie, ma in quell'ambiente le granaglie non abbondavano e in ogni caso potevano essere a disposizione troppo fugacemente per dare sostentamento ad animali incapaci di farne provvista. È preferibile l'ipotesi già esposta che l'australopiteco si nutrisse di ossa e tendini, avanzo dei pasti dei carnivori e forse anche di prede catturate con azioni concertate tra più individui.

Ad *A. afarensis* fa seguito quello che si suole chiamare *A. africanus* ma che non è la specie descritta con questo nome dall'anatomista Dart nel 1925; lo chiameremo australopiteco *gracile*. Questo ominide, alquanto più grande dei predecessori (altezza intorno a 1,35-1,45 m), aveva pelvi e ossa lunghe decisamente simili a quelle dell'uomo moderno, ma capo belluino con mandibola e mascella molto alte e arcate zigomatiche molto larghe. Tali caratteristiche anatomiche sono da porre in rapporto con uno sviluppo eccezionale della muscolatura che aziona la mandibola: muscoli temporali, muscoli masseteri esterni e profondi. Queste caratteristiche, insieme allo spessore dello smalto dei denti (un po' inferiore a quello di *A. afarensis*), testimoniano per un uso strenuo della masticazione, non diverso dall'uso che ne fanno le iene.

Sin qui la ricostruzione della storia degli ominidi si presenta convincente e lineare anche se alcune questioni rimangono aperte: *Australopithecus* presentava il dimorfismo sessuale così cospicuo presso i pongidi e presso l'uomo moderno? Aveva distribuzione circoscritta agli altipiani dell'Africa centro-orientale o si spingeva molto oltre quei confini?

Per quanto riguarda il periodo compreso tra i 2 milioni e i 900.000 anni fa, cioè per il periodo che vede il trapasso dal Pliocene superiore al Pleistocene e il trapasso dal genere *Australopithecus* al genere *Homo*, il quadro si complica terribilmente: vengono descritte almeno sette specie di ominidi pressoché coeve e tutte conviventi nel triangolo dell'Africa orientale tra Etiopia, Kenia e Tanzania, ma con qualche esemplare proveniente dal Sudafrica. Tre specie avevano taglia di poco superiore a 1,5 m: *Paranthropus robustus*, *P. boisei* e *P. aethiopicus* (a *P. robustus* secondo le regole della nomenclatura spetterebbe il nome di *Australopithecus africanus*); chiameremo questo complesso di forme

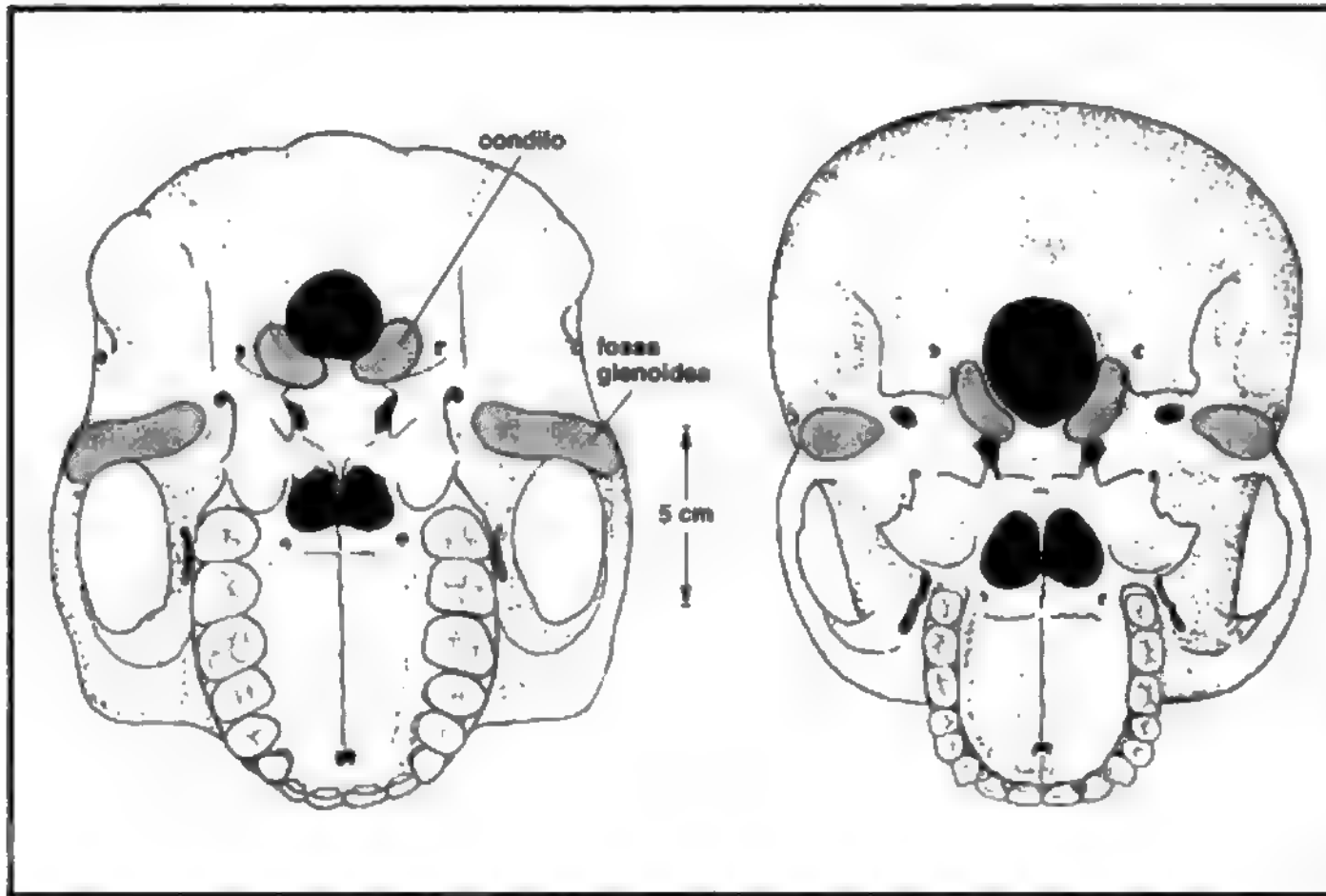


Fig. 2. La parte inferiore del cranio dell'australopiteco, forma robusta (a sinistra), presenta un aspetto molto singolare: l'arcata dentaria occupa uno spazio molto grande nello scheletro della faccia e ciò determina un forte squilibrio tra il potente massiccio facciale e l'esiguo neurocranio; questo squilibrio è compensato dai muscoli che si inseriscono sui potenti rilievi dell'osso occipitale. Notare la straordinaria potenza dei molari, la piccolezza degli incisivi e lo sviluppo degli zigomi che permettono il transito dei robustissimi muscoli della masticazione. A destra, il cranio dell'uomo moderno, visto dal basso, nel quale lo squilibrio tra la porzione anteriore e quella posteriore ai condili è corretto dalla riduzione della faccia, dalle aumentate dimensioni del neurocranio e dalla migrazione in avanti del forame ovale. Notare nell'australopiteco la forma e l'ampiezza della fossa glenoidea che permette movimenti laterali e rotatori della mandibola.

australopitecini robusti (fig. 2). Le altre quattro specie vengono attribuite al genere *Homo*: *H. rudolfensis*, *H. habilis*, *H. ergaster*, *H. erectus*; le prime tre specie convivevano nel territorio summenzionato, mentre *H. erectus* è noto per l'Africa centrale e settentrionale, per l'Europa, per l'Asia compresa l'Indonesia.

Questo straordinario pullulare di forme rispecchia certamente una realtà complessa, legata alla rapida e non omogenea acquisizione di nuove caratteristiche morfologiche e di nuove attitudini comportamentali da parte di quegli ominidi. Quanto alla complessa nomenclatura, questa riflette le obiettive difficoltà di disporre in ordine molti reperti, spesso frammentari, relativi a organismi in fase di transizione da un genere a un altro. Si aggiunga che in questo campo oltre ai consueti elementi tassonomici basati su anatomia e forma occorre prendere in considerazione elementi culturali quali la comunicazione verbale e l'utilizzo di armi e del fuoco, che hanno avuto sicuri riflessi nella biologia di questi nostri antenati.

Va comunque detto subito che è alquanto improbabile che a tutte queste entità tassonomiche designate con binomio linneano competa il rango di specie. In campo zoologico esiste infatti una regola, empiricamente accertata, che due specie affini non possono condividere a lungo il medesimo habitat: o si ibridano o una di esse viene eliminata. A ciò si può obiettare che in biologia le regole soffrono sempre di qualche eccezione e che una di queste potrebbe riguardare gli antichi ominidi. Va però aggiunto che il processo di speciazione nei grossi mammiferi implica sempre un tempo certamente superiore a poche centinaia di migliaia di anni, tanto che le nozioni citologiche e genetiche di cui oggi si dispone non permettono di escludere che sussista tuttora un qualche grado di interfertilità tra uomo e scimpanzé.

Ciò posto, si può ritenere certo che verso la fine del Pliocene (circa 2 milioni di anni fa) presso un ceppo di *Australopithecus* si verificò un aumento della statura, fino a 1,50 m o poco più, e un forte accrescimento della muscolatura deputata alla masticazione, con comparsa di una cresta ossea superiore alla sommità del cranio alla quale si attaccavano i muscoli temporali. Anche la capacità cranica era aumentata in misura maggiore di quanto è previsto in base

all'aumento di statura: circa 600 ml. Questo processo evolutivo ha generato un complesso di forme che viene di solito riunito nel genere *Paranthropus*; di questo genere l'esemplare più recente è il bambino di Taung (Sudafrica) dell'età presunta di 4-6 anni descritto da Dart col nome di *Australopithecus africanus*.

Intorno alla stessa epoca si sono differenziati nel triangolo Kenia-Etiopia-Tanzania forme piuttosto gracili, molto somiglianti all'australopiteco gracile e talvolta mal distinguibili da esso.

Il genere *Homo*

Transizione da *Homo habilis* a *Homo erectus*

Tra le forme suddette (v. sopra) sono compresi individui riferiti a *Homo habilis* nei quali la forma del capo si è ingentilita, la capacità del cranio si è accresciuta, mentre i denti, pur rimanendo grandi, hanno smalto di spessore minore.

I più antichi esemplari di questa specie, com'è da attendersi, mal si distinguono dalla forma gracile di *Australopithecus*, mentre i reperti di epoca meno antica presentano caratteri che sfumano in quelli di *H. erectus*. Mascella e mandibola sono meno alte, i rilievi sopraorbitari rimangono pronunciati, il cranio è un po' meno appiattito e il volume dell'encefalo supera i 600 ml; secondo Tobias (1967) la corteccia cerebrale è riorganizzata in un modo che fa pensare che questo ominide potesse parlare. Secondo altri AA. questa attitudine sarebbe comparsa molto dopo, ma in ogni caso è certo che *H. habilis* produceva i primi manufatti in pietra ed era in grado di comunicare con i suoi simili.

Entro questo complesso di forme, che dura da 2 milioni a 900.000 anni fa, alcuni AA. distinguono *H. ergaster* e *H. rudolfensis*, ma si tratta di varietà di scarso rilievo in un quadro di polimorfismo pronunciato. Tale polimorfismo è sicuramente legato a mutamenti climatici, al mutato modo di vivere dei nostri soggetti, e forse all'avvicinarsi nel medesimo luogo di nuclei di popolazioni a costumi seminomadi che avevano optato per una vita da raccoglitori e cacciatori: nei piccoli nuclei seminomadi la deriva genetica può permettere la comparsa di caratteristiche rare.

I rapporti delle forme attribuite al genere *Homo* con le forme attribuite al genere *Paranthropus* non sono del tutto risolti: la maggior parte degli specialisti accetta la separazione a livello generico, ma questa scelta potrebbe essere conseguenza di una sopravvalutazione delle differenze. Sembra lecito, infatti, ipotizzare che le forme robuste siano riferibili a popolazioni che si erano attardate nell'antico modo di vita che richiedeva uno strenuo uso delle mascelle e che esse, a poco a poco, siano state riassorbite da popolazioni più progredite. Non solo, la documentazione in merito al dimorfismo sessuale degli antichi ominidi è incerta e non consente neppure di escludere che le forme robuste degli australopitecini siano i maschi e le forme gracili le femmine di una stessa specie (v. OMINAZIONE, X, fig. 8, col. 1679).

Comunque, la graduale transizione da *H. habilis* a *H. erectus* non sembra controvertibile ed è correlata al rapido aumento delle dimensioni dell'encefalo e all'uso di attrezzi che permettevano di macellare animali di grossa mole, quali gli ippopotami e gli elefanti. Anche l'uso del fuoco ha influito sulla trasformazione di questi ominidi.

Homo erectus compare in Africa circa 1 milione e mezzo di anni fa. Quattrocentomila anni dopo, all'inizio del primo interglaciale, raggiunge Giava, in Indonesia; gli ultimi esemplari ritrovati provengono da Casablanca in Marocco (400.000 anni fa) e da Pechino (250.000 anni fa) e da Ngandong (120.000 anni fa). Ha statura prossima a quella media dell'uomo moderno, il capo conserva caratteristiche belluine nelle prominenti arcate sopraorbitarie, nello spessore delle ossa craniche, nella calotta cranica bassa allungata con forte restringimento postorbitario. Mascella e mandibola non sono molto alte, manca il mento. La capacità cranica, che nelle più antiche popolazioni è di circa 850-900 ml, 1 milione di anni fa ha raggiunto 1 litro; gli ultimi uomini di Pechino avevano una capacità cranica di circa 1250 ml.

La valutazione delle variazioni morfologiche

Le popolazioni umane attuali presentano una forte plasticità *ecofenotipica* che, in rapporto a nuovi modi di vivere, fa comparire variazioni spesso cospicue, beninteso entro l'ambito consentito dal patrimonio ereditario. Per le popolazioni europee ne sono esempio l'aumento di 12 cm di statura durante gli ultimi 150 anni, nonché l'anticipazione del menarca di 5 anni nel volgere di un secolo; per alcune popolazioni insulari della Melanesia è documentato che gli abitanti che vivevano presso il mare, e godevano pertanto di una alimentazione più ricca in proteine animali, avevano statura di vari centimetri superiore a quella degli abitanti dell'interno; cospicue differenze di statura per popolazioni strettamente imparentate caratterizzavano, come è noto, i Patagoni e Fuegini, mentre è registrato che nell'Europa centrale la frequenza di individui dolicocefali si è ridotta negli ultimi tempi in modo drastico senza motivi evidenti, e così via. Simile plasticità sconsiglia di sopravvalutare le variazioni, anche notevoli, che si sono verificate nel remoto passato per certi parametri fisiologici e anatomici.

Homo erectus e lo sviluppo dell'encefalo

Le popolazioni di *H. erectus* avevano costumi da raccoglitori e cacciatori e sapevano usare il fuoco. Per scavare, per macellare le prede e tagliare i rami degli alberi usavano pietre lavorate. All'inizio l'industria litica è rudimentale, la si designa col nome di 'olduvana', e con manufatti di questo tipo *H. erectus* ha raggiunto Indonesia e Cina ove ha continuato ad usarli con poche modifiche; in Africa e in Europa questa industria si fa invece più varia e raffinata: la si indica col nome di 'acheuleana'.

La testimonianza più completa sul modo di vivere di *H. erectus* viene da grotte presso Pechino, dove egli ha dimo-

rato per circa 230.000 anni. Anche in Europa questa specie ha lasciato traccia di attività complesse: in Spagna ha macellato un elefante incappato nelle sabbie mobili, in Italia presso Isernia ha vissuto a lungo in dimore precarie intorno alle quali sono depositati i resti di animali e strumenti vari.

Il tratto più cospicuo dell'evoluzione di *H. erectus* è lo sviluppo dell'encefalo che, verso la fine della sua storia, raggiunge quasi le dimensioni proprie dell'uomo moderno di pari statura. Su questo accrescimento, decisivo per le caratteristiche dell'umanità, si può avanzare una serie di congetture.

La vita gregaria, necessaria per difendersi e procurarsi il cibo in modo nuovo, esigeva una più stretta intesa tra i membri della comunità, e quindi un progresso verso la vita sociale. Questo progresso in un primo tempo avvenne senza aumento della massa cerebrale, ma incise sul comportamento: la componente prettamente istintiva, stereotipa, dovette ridursi, mentre si accentuava la componente acquisita attraverso l'apprendimento. A questo fine fu vantaggioso il prolungarsi dell'infanzia che ridusse tuttavia il giovane individuo a dipendere sempre più dalla protezione e dall'istruzione fornita dalla madre e dal gruppo di appartenenza.

Questa circostanza richiese una più efficiente comunicazione all'interno del gruppo e quindi un ulteriore aumento della flessibilità del comportamento e delle capacità intellettive. Era un circolo vizioso dal quale gli ominidi del genere *Homo* uscirono grazie all'incremento della massa cerebrale. Questo incremento, che coinvolgeva anche lo sviluppo di collegamenti tangenziali nella corteccia e la comparsa di aree associative, ha dato a sua volta origine all'evoluzione culturale che prosegue ed integra l'evoluzione biologica.

Origine di *Homo sapiens*

La transizione da *H. erectus* a *H. sapiens* in Europa si è verificata tra il 2° interglaciale e la glaciazione di Riss, cioè da 450.000 a 300.000 anni fa. Come era già accaduto durante la transizione da *H. habilis* a *H. erectus*, si manifesta un notevole polimorfismo che ha indotto vari AA. a prospettare l'esistenza di specie e sottospecie particolari la cui validità è discutibile.

È stato detto, in modo molto efficace, che *H. sapiens* differisce dal suo predecessore quanto gli animali domestici differiscono dai loro predecessori selvatici. Per vari aspetti dell'anatomia dello scheletro ciò sembra vero: le ossa della volta del cranio si assottigliano e anche quelle della faccia si alleggeriscono insieme alla dentatura. Va notato che al rimpicciolirsi della dentatura non si accompagna un corrispondente accorciamento della mandibola, che finisce con lo sporgere rispetto all'arcata alveolare: compare così il mento, caratteristica dell'uomo attuale (fig. 3). Queste modifiche consentono lo spostamento in avanti del forame occipitale e un miglior bilanciamento del capo sulla colonna vertebrale; ciò riduce il lavoro e l'azione di quei muscoli che si inseriscono sull'occipitale e impediscono al capo di ciondolare in avanti, sicché quest'osso si fa meno frastagliato e sporgente. Anche le diafisi delle ossa lunghe hanno pareti di spessore minore e canale midollare più ampio.

I più antichi esemplari di *H. sapiens* europei (Steinheim, Swanscombe...) conservano però alcuni tratti belluini: le arcate sopraorbitarie sono alquanto sporgenti e la scatola cranica presenta ancora un restringimento postorbitario. In seguito questi tratti spariscono: la volta cranica diventa alta, acquista la forma a bolla e l'encefalo raggiunge un volume pari a quello dell'uomo attuale.

L'uomo di Neandertal

Mentre alcune popolazioni acquisiscono la *facies* detta *cromagnone* altre popolazioni, attardatesi durante la glacia-

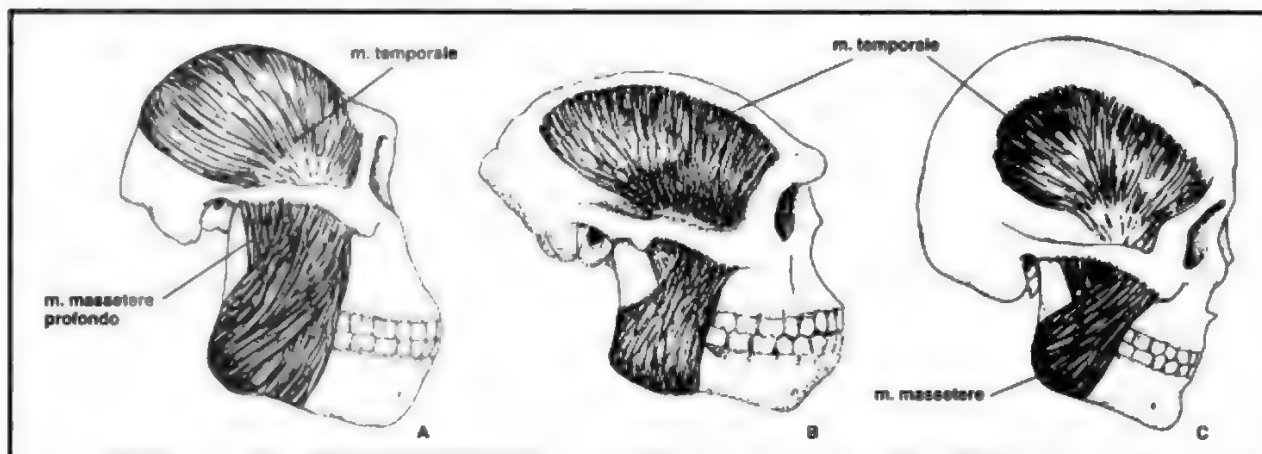


Fig. 3. A) Nell'australopiteco robusto i muscoli temporali sono molto stretti e lunghi e si attaccano alla cresta sagittale del cranio, i masseteri sono molto lunghi a causa dell'altezza della mascella e della mandibola. B) Nel pitecantropo (*Homo erectus*) la inserzione dei muscoli temporali è più lunga e più bassa in rapporto all'appiattimento e all'allungamento della volta cranica, tutti i muscoli della masticazione sono più brevi (minore scatto nell'addentare oggetti duri). C) Nell'uomo moderno a causa della riduzione dei denti e delle arcate dentarie si osserva una forte riduzione della muscolatura e delle arcate zigomatiche che consentono il passaggio dei muscoli temporali; anche gli zigomi su cui si attaccano i muscoli masseteri sono più sottili mentre la visiera sopraorbitaria su cui si scaricano le sollecitazioni meccaniche della masticazione scompare.

zione del Würm presso le calotte glaciali, si differenziano in senso opposto: volta cranica piuttosto bassa e allungata, marcato prognatismo, forte visiera sopraorbitaria, orbite rotonde, gamba relativamente lunga rispetto alla coscia, dentatura *taurodonte* (cioè con ampia cavità pulpare); anche il labirinto osseo presenta qualche peculiarità. È questo l'uomo di Neandertal sul quale si è tanto favoleggiato e disputato da un secolo e mezzo fino ad oggi.

Quest'uomo per il quale qualche A. propone, a torto, il rango di specie (*H. neandertalensis*) ha vissuto in Europa e nel vicino oriente tra 150.000 e 35.000 anni fa; coevo quindi e con la stessa distribuzione dell'orso delle caverne (*Ursus spelaeus*) (fig. 4).

Molto si è insistito sulla brutalità di questa forma umana che sarebbe poi stata sterminata e soppiantata dall'uomo moderno. Sta di fatto che *H. sapiens neandertalensis* sep-

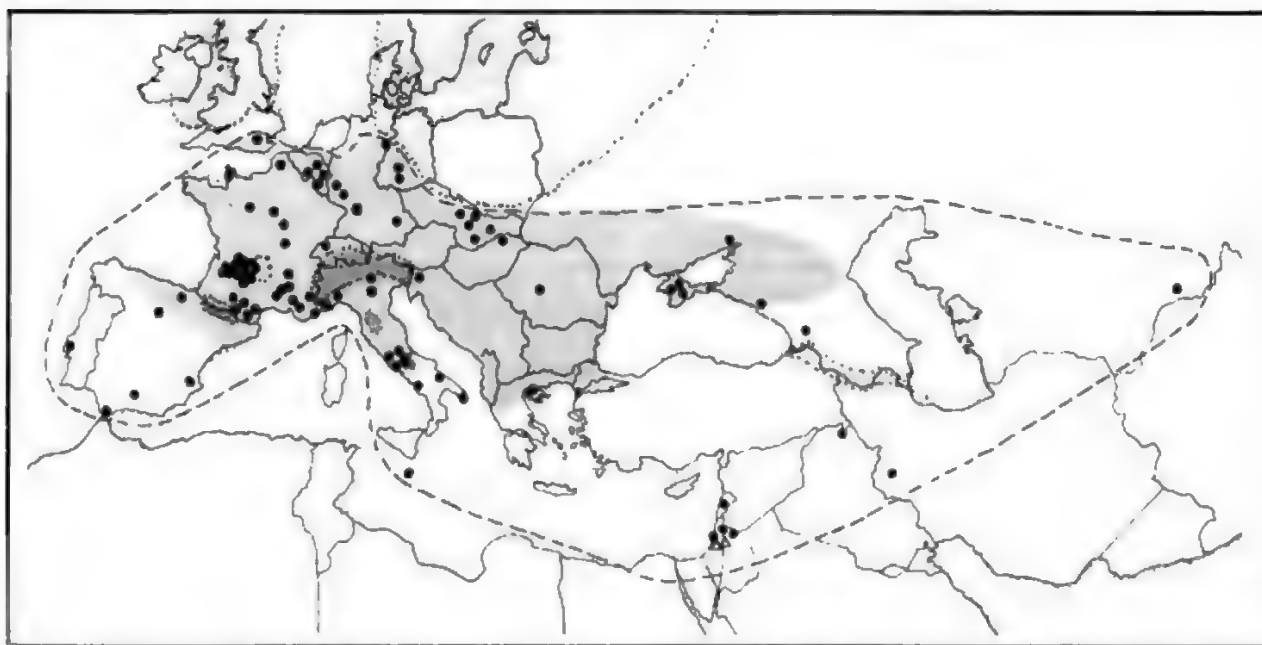


Fig. 4. Distribuzione geografica dei siti conosciuti per l'uomo di Neandertal durante il Pleistocene superiore. La linea tratteggiata delimita l'area occupata dall'uomo di Neandertal. Il colore azzurro indica la estensione dei ghiacciai epicontinentali durante il Würm. Il colore rosso indica l'estensione dell'area occupata dall'*Ursus spelaeus* in quell'epoca. La larga coincidenza delle aree occupate dalle due popolazioni lascia pensare a una stretta relazione tra le popolazioni climatiche e alimentari. (Dati di Trinkhaus e Howells, per l'uomo di Neandertal e di Kurtén B. per l'orso delle caverne [da *Le Scienze*, Quaderni, n. 30, 1986]).

pelliva i suoi morti, si adornava di monili, fabbricava flauti ricavandoli da ossa di orso, aveva una cultura chiamata *mousteriana* che condivideva con alcune popolazioni limitrofe di ceppo diverso, con le quali forse si è in qualche luogo meticciata.

In Europa i resti fossili umani contemporanei agli ultimi neandertaliani, quindi tra i 45.000 e i 35.000 anni fa, presentano caratteristiche eguali a quelle dell'uomo attuale. A questa popolazione viene dato il nome di *Cro-Magnon* dal luogo di ritrovamento; la cultura corrispondente viene denominata *aurignaziana*; i manufatti in pietra sono più raffinati, mentre nelle caverne vengono tracciati grandi affreschi policromi di notevole realismo, vengono anche prodotte statuette e incisi graffiti.

In Asia questa cultura non è altrettanto ben conosciuta, ma si sa che già in quel tempo l'uomo ha costruito imbarcazioni che gli hanno permesso di raggiungere (col cane?) la Nuova Guinea, l'Australia e la Tasmania; le stime sono di 60-40.000 anni. Intorno a 30-35.000 anni fa alcuni immigranti dell'Asia nord-orientale hanno raggiunto e poi rapidamente popolato l'intero continente americano.

Da quel momento si può ritenere concluso il processo di o.

V. anche: EVOLUZIONE (v.; v.**); PALEOANTROPOLOGIA (v.; v.**).

Bibliografia

- Fedele F. (a cura di), *L'evoluzione dell'uomo*, «Le Scienze, Quaderni», n. 73, 1993.
 Fedele F. (a cura di), *Gli antenati dell'uomo*, «Le Scienze, Quaderni», n. 74, 1984.
 Guidi A., Piperno F. (a cura di), *Italia preistorica*, 1992, Laterza, Bari.
 Johanson D. C., Edey M. A., *Lucy, le origini dell'umanità*, 1981, Mondadori, Milano.
 Lewin R., *Le origini dell'uomo moderno*, 1996, Zanichelli, Bologna.
 Moyà-Solà S., Köhler M., *Nature*, 1996, **379**, 156-159.
 Piazza A. (a cura di), *Il popolamento della terra*, «Le Scienze, Quaderni», n. 86, 1995.
 Tobias P. W., *Homo: origine ed evoluzione*, in *Enciclopedia del Novecento*, vol. VII, 1984, Istituto dell'Enciclopedia Italiana, Roma.
 Wood T. D., *Nature*, 1994, **371**, 280-281.

PIETRO OMODEO

OMOCISTEINA

F. *homocysteine*. - 1. *homocysteine*.

SOMMARIO

Introduzione (col. 4177). - Metabolismo (col. 4178). - Cenni storici dell'associazione tra iperomocisteinemia e aterosclerosi (col. 4180). - Meccanismi fisiopatologici dell'iperomocisteinemia (col. 4181). - Terapie per ridurre l'iperomocisteinemia (col. 4181). - Conclusioni (col. 4183).

Introduzione

L'omocisteina [o.] è un aminoacido contenente un gruppo funzionale tiolico ed è un intermedio del metabolismo della metionina. Non si ritrova nelle proteine, pertanto è presente nell'alimentazione solo in tracce. L'o. circola nel sangue legata alle proteine (70%) (Kang *et al.*, 1979) o libera in forma ridotta (1%) o ossidata a omocistina o disolfuro misto con la cisteina (29%) (Refsum *et al.*, 1985; Ueland *et al.*, 1989). La somma di tutta l'o. legata e libera è definita o. totale (tHcy).

Poiché nell'ultimo decennio l'iperomocisteinemia è stata indicata come fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di prematuri danni vascolari di tipo occlusivo, si è

cercato di sviluppare un sistema di determinazione accurato e semplice dell'o. plasmatica, per riconoscere in una popolazione normale soggetti che abbiano predisposizione congenita per le patologie vascolari occlusive (Ueland *et al.*, 1993). I metodi proposti sono radio-enzimatico (Refsum *et al.*, 1985), immunologico (Schipchandler *et al.*, 1995), gascromatografo-spettrometria di massa (Stabler *et al.*, 1987) e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* [v. CROMATOGRAFIA*]; Refsum *et al.*, 1989; Hyland *et al.*, 1992). Quest'ultimo è il più impiegato e utilizza, dopo derivatizzazione, un detector spettrofotometrico, elettrochimico o spettrofluorimetrico.

Il valore medio di tHcy nel plasma è approssimativamente 10 µmol/L, con un range tra 5 e 15 µmol/L. L'iperomocisteinemia è definita come valori di o. superiori all'80-95° percentile della distribuzione normale che è approssimativamente 12-16 µmol. Kang *et al.* (1992), classificano l'iperomocisteinemia come moderata quando la concentrazione è tra 15 e 30 µmol/L, intermedia (tra 30 e 100 µmol/L), severa (> 100 µmol/L).

Sebbene la iperomocisteinemia severa sia molto rara, la forma moderata si reperta approssimativamente nel 5-7% della popolazione generale (Ueland *et al.*, 1989; McCully, 1996).

Metabolismo

La metionina (v.; v.**), aminoacido solforato essenziale, può essere attivata a S-adenosilmetionina, il principale donatore di metili in numerose reazioni che coinvolgono DNA, RNA, fosfolipidi, proteine e varie molecole più semplici come la creatina. Per demetilazione della S-adenosilmetionina si forma S-adenosilomocisteina che rapidamente è idrolizzata ad o. e adenosina, sostanze che svolgono un ruolo importante nel regolare il tono vascolare.

Per l'o. sono possibili due vie metaboliche principali: 1) la rimetilazione a metionina tramite un enzima ubiquitario che utilizza metiltetraidrofolato (MTHF) come substrato metilante e metil-B₁₂ come cofattore, o un altro enzima, localizzato solo nel fegato, che utilizza come donatore di metili la betaina; 2) oppure può sfuggire a questo ciclo di conservazione tramite la via della transulfurazione che porta alla formazione di cistationina, e quindi di cisteina, mediante due enzimi, cistationina β-sintetasi (CBS) e cistationasi che richiedono come cofattore la vitamina B₆. Dalla cisteina originano poi numerosi prodotti solforati tra cui glutatione, taurina e solfati (fig. 1).

Quando l'o. trova impedimento in una delle due vie di utilizzazione, o per difetto enzimatico o per carenza delle vitamine coinvolte, può essere trasportata fuori dalla cellula nel tentativo di ridurre il danno di un eccesso di o. e sollecitare l'intervento del rene che possiede, tra i vari organi, la più elevata attività specifica degli enzimi che metabolizzano l'o. Questo espediente espone però il tessuto vascolare all'effetto deleterio dell'eccesso di o.

tHcy può essere valutata a digiuno o dopo un carico orale di metionina (0,1 g di metionina/kg peso corporeo). La concentrazione di o. dopo carico di metionina (Boers *et al.*, 1985) si determina preferenzialmente dopo 4-8 ore dalla ingestione di metionina. L'iperomocisteinemia a digiuno riflette le anomalie della rimetilazione dell'o., mentre un incremento anormale di o. dopo il carico di metionina riflette deficit nella via della transulfurazione.

L'o. può essere elevata nel plasma per cause genetiche o acquisite. I più importanti determinanti dei livelli plasmatici di o. sono riportati in tab. I.

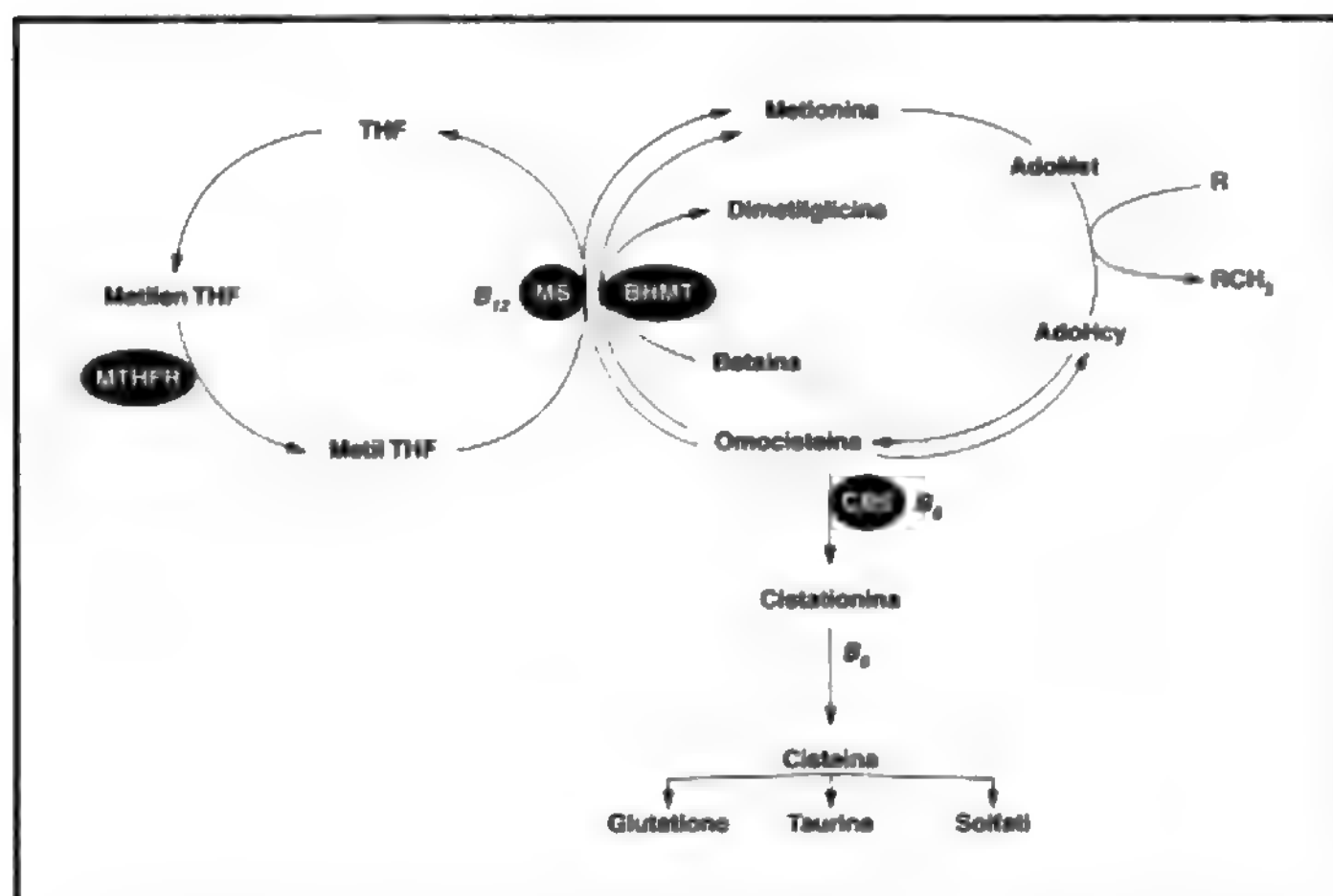


Fig. 1. Metabolismo dell'o. AdoHcy, S-adenosilomocisteina; AdoMet, S-adenosilmetionina; B₆, vitamina B₆; B₁₂, vitamina B₁₂; CBS, cistationina β-sintetasi; MS, metionina sintetasi; MTHFR, metilene-tetraidroloreduttasi; THF, tetraidrofolato; BHMT, betaina-omocisteina metiltransferasi. (Da Refsum H. et al., 1998, modificata).

TAB. I. DETERMINANTI DEL LIVELLO PLASMATICO DI OMOCISTEINA

Fattori genetici	Effetto
alterazione omozigote di CBS (cistationina β-sintetasi)	↑↑↑
alterazione omozigote di MTHFR	↑↑↑
alterazione dei trasportatori di cobalamina	↑↑↑
sindrome di Down	↓
variante termolabile di MTHFR	↑
Determinanti fisiologici	
età	(↑)
Sesso maschile	(↑)
ridotta filtrazione glomerulare	(↑)
aumento massa muscolare	(↑)
Abitudini di vita	
apporto vitaminico	↓
fumo	(↑)
consumo di caffè	(↑)
consumo di etanolo. dosi elevate	↑
- dosi modiche	↓
attività fisica	↓
Condizioni cliniche	
carenza di folato	↑↑
carenza di B ₁₂	↑↑↑
carenza di B ₆	↑
insufficienza renale	↑↑
disturbi iperproliferativi	↑
ipotiroidismo	↑
Farmaci	
antagonisti dei folati	↑
antagonisti della B ₁₂	↑↑
antagonisti della B ₆	↑↑
...	↑↑
...	↓

* ↑ = aumento nella norma, ↑↑, ↑↑↑ = iperomocistemia moderata (15-30 μmol/L), intermedia (30-100 μmol/L), severa (> 100 μmol/L). Da Refsum H. et al. *Annu. Rev. Medicine*, 1998, 49, 31-62.

Cenni storici dell'associazione tra iperomocistemia e aterosclerosi

Nel 1962 venne descritto in bambini con ritardo mentale il primo errore genetico nel metabolismo della metionina associato a elevati livelli nel plasma ed eccessiva escrezione urinaria di o. (Gerritsen *et al.*, 1962; Carson *et al.*, 1962). La patologia, definita *omocistinuria* (v.), è caratterizzata da dislocazione del cristallino, miopia, anomalie scheletriche come scoliosi e osteoporosi, ritardo mentale, convulsioni e complicazioni del sistema vascolare. Nel 1964 Mudd *et al.* identificarono il difetto genetico a livello dell'enzima CBS come causa di omocistinuria. Successivamente furono individuati altri due difetti genetici più rari responsabili di omocistinuria relativi a) alla metilene-tetraidroloreduttasi (MTHFR) (Rozen *et al.*, 1996; Mudd *et al.*, 1972) enzima che converte il metilene-tetraidrolato in metiltetraidrolato, substrato direttamente implicato nello smaltimento dell'o., e b) alla metionina sintetasi (MS) (McCully *et al.*, 1969), enzima che sintetizza la metionina promuovendo la metilazione dell'o. da parte di MTHF in presenza di vitamina B₁₂. McCully descrisse i danni vascolari in un paziente omocistinurico e per primo ipotizzò che l'agente causale fosse l'eccesso di o. e formulò nel 1975 la sua teoria omocisteinica dell'arteriosclerosi (v. anche ARTERIOSCLEROSI**, col. **592), che individua l'o. come l'agente lesivo precoce nella genesi della placca (McCully *et al.*, 1969; McCully *et al.*, 1975).

Nel 1976 l'osservazione del modello naturale «omocistinuria» (v.), che è associato a un rischio elevatissimo di danni vascolari prima del terzo decennio di età, ha portato Wilcken *et al.* a valutare un possibile contributo di una moderata iperomocistemia nel determinare malattia cardiovascolare. Nel 28% dei pazienti coronaropatici esaminati, contro il 5% dei controlli, si poté evidenziare un alterato metabolismo dell'o. Le concentrazioni di o. osservate erano comparabili a quelle trovate negli eterozigoti obbligati per la deficienza di CBS.

Nei 15 anni successivi una serie di lavori ha correlato i livelli di o. alle coronaropatie, ai disturbi cerebrovascolari, alle arteriopatie periferiche e alla trombosi venosa. Nello

stesso periodo vennero individuati i principali determinanti della tHcy tra cui età, sesso, funzione renale, stato vitaminico di folati e B₁₂.

Nel 1988 Kang *et al.* (1988a; 1988b) scoprirono una nuova variante della MTHFR caratterizzata da una attività enzimatica ridotta e da una aumentata termolabilità della proteina che comporta, anche se non necessariamente, concentrazioni elevate di o.

Questi e altri studi hanno stabilito che la variante termolabile della MTHFR è una causa genetica comune (con frequenza del 10-15% nella popolazione) di moderata iperomocisteina e costituisce un fattore di rischio congenito di disturbi vascolari. A partire dal 1990 vi è stato un incremento esponenziale di pubblicazioni su o. e disturbi vascolari. Una serie di studi retrospettivi e prospettici ha indicato che la iperomocisteinemia moderata è un fattore di rischio indipendente e graduale per la malattia vascolare arteriosclerotica (Clarke *et al.*, 1991), come è stato confermato da una metanalisi condotta su 27 studi e pubblicata da Boushey *et al.* (1995).

Elevati livelli di o. sono un fattore fortemente predittivo di mortalità in pazienti con patologia delle arterie coronarie (Nygård *et al.*, 1997).

In uno studio europeo realizzato in 19 centri su 750 pazienti e 800 controlli si è indagato sull'interazione tra o. e i più importanti fattori di rischio, colesterolo, fumo e ipertensione. Il rischio associato all'o. è simile e indipendente da quelli dei fattori di rischio convenzionali. È emersa una forte interazione tra o., fumo e ipertensione, in entrambi i sessi, ma più pronunciata nelle donne (Graham *et al.*, 1997).

Meccanismi fisiopatologici dell'iperomocisteinemia

I dati disponibili sulla tossicità di elevati livelli di o. non sono ancora inquadrabili in una ipotesi unificante di meccanismo d'azione. I principali effetti della o. nella patogenesi del danno vascolare sono riportati in fig. 2 (Welch e Loscalzo, 1998). L'o., in analogia ad altri tioli, viene ossidata ad omocistina da parte dell'ossigeno che si riduce a perossido di idrogeno. Questa specie reattiva dell'ossigeno esercita azione citotossica sull'endotelio, stimola la proliferazione delle cellule muscolari lisce, produce perossidazione lipidica e ossidazione delle LDL, tutti fattori proaterogeni e protrombotici (Stamler *et al.*, 1996). L'o. reagisce rapidamente con l'ossido nitrico (NO) per formare S-nitroso-omocisteina che agisce come potente fattore antipiastrinico e vasodilatatore. La formazione di questo addotto può attenuare la produzione di H₂O₂ dall'o. e quindi protegge dalle proprietà proaterogene dell'o. Il danno vascolare deriva da uno squilibrio tra produzione di NO e livelli di o.

Terapie per ridurre l'iperomocisteinemia

L'apporto di acido folico, vitamine B₁₂ e B₆, probabilmente riduce i livelli di o. in quasi tutti i soggetti indipendentemente dai valori basali di o. (Brattström *et al.*, 1996). La terapia vitaminica previene parzialmente le complicazioni vascolari dell'omocistinuria (Mudd *et al.*, 1995). L'uso di queste vitamine è associato a un minor rischio di malattie vascolari nella popolazione generale (Graham *et al.*, 1997). Il consumo frequente di frutta e vegetali, che sono fonti ricche di folati, protegge dalle malattie cardiovascolari (Ness *et al.*, 1997). Nonostante questa serie di dati promettenti rimane da dimostrare che in studi clinici prospettici, controllati contro placebo, la riduzione dell'o., ottenuta con l'intervento vitaminico, consenta di prevenire o mitigare i danni vascolari. Uno studio di collaborazione di vari ricercatori europei ha presentato una metanalisi di 12 studi di intervento, evidenziando che l'impiego di acido folico, alle dosi variabili da 0,5 a 5 mg al giorno per almeno tre setti-

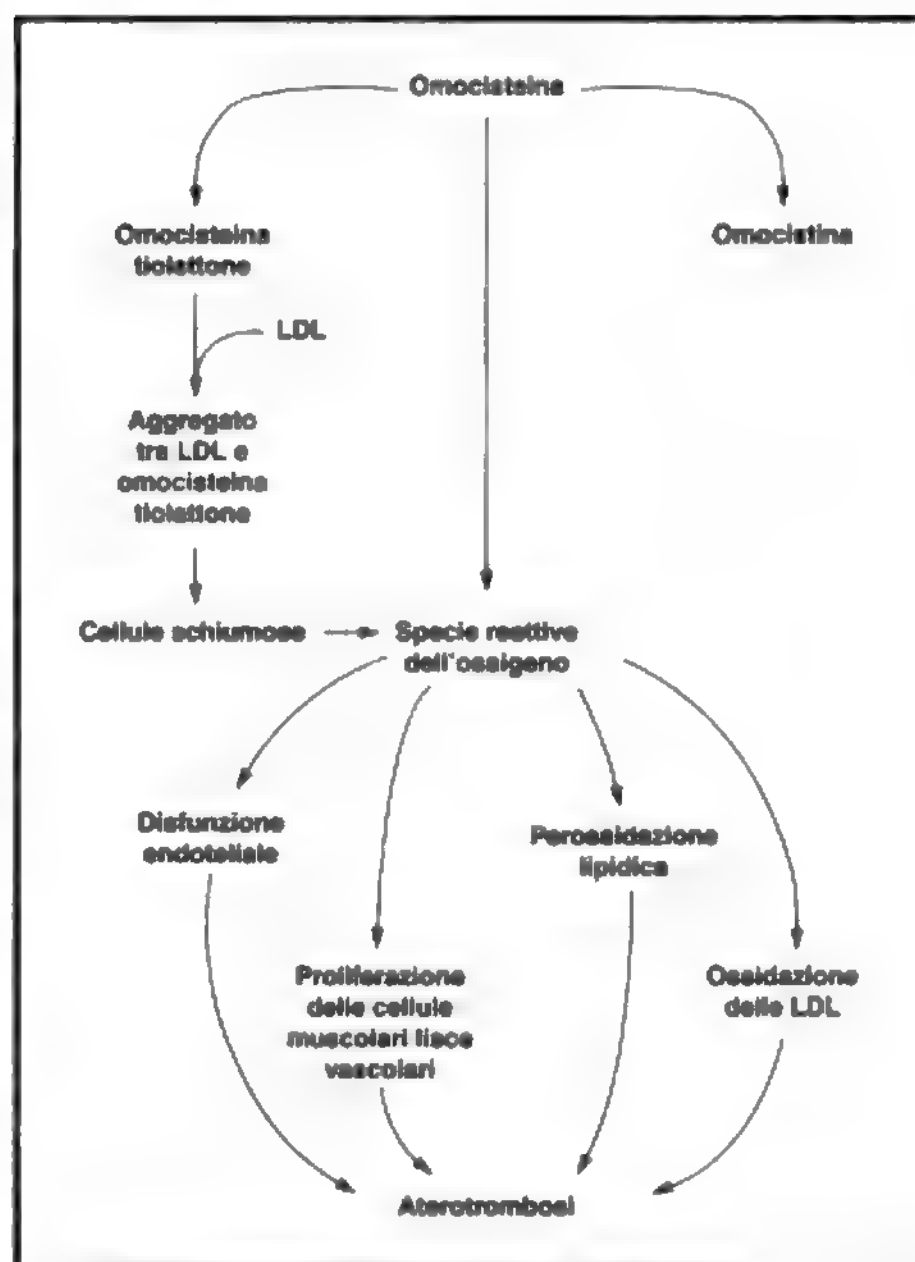


Fig. 2. Ipotesi sui danni vascolari da o. (Da Welch e Loscalzo, 1998, modificata).

mane, riduce mediamente del 25% i livelli di o. (Clarke *et al.*, 1998). L'aggiunta di vitamina B₁₂ incrementa ulteriormente del 7% la riduzione di o., mentre l'apporto di B₆ non produce altro vantaggio. Analoghi risultati hanno raggiunto Malinow *et al.* (1998), che affermano che i cereali addizionati con acido folico sono capaci di ridurre i livelli plasmatici di o.

L'acido folico è considerato non tossico e ben tollerato per un impiego cronico ad alte dosi, ma può essere rischioso in condizioni di carenza di vitamina B₁₂, poiché, in questo caso, l'acido folico migliora i sintomi ematologici senza impedire il peggioramento neurologico (Butterworth *et al.*, 1989). Infatti dall'acido folico si possono ottenere i cofattori N₁₀ formiltetraidrofolato e metiltetraidrofolato, che sono implicati nella duplicazione cellulare, ma non il metiltetraidrofolato la cui carenza è responsabile del danno neurologico. È possibile ovviare a questo rischio somministrando, al posto di acido folico, metiltetraidrofolato che in carenza di B₁₂ non è utilizzato e quindi non può mascherare i sintomi di carenza.

Il metiltetraidrofolato nel trattamento della iperomocisteinemia presenta altri vantaggi: è il cofattore direttamente coinvolto nello smaltimento dell'o., e ciò è particolarmente importante se si considera l'elevata frequenza, nella popolazione generale, della variante termolabile della MTHFR, che comporta una ridotta capacità di produrre proprio metiltetraidrofolato. Inoltre il metiltetraidrofolato a differenza dell'acido folico è già in forma ridotta e quindi non depaupera il potenziale antiossidante dell'ambiente

cellulare, favorendo una migliore protezione dai danni ossidativi provocati dall'eccesso di o.

Infine nell'ambito della 2ª Conferenza Internazionale sul Metabolismo dell'Omocisteina (Nijmegen, 26-29 aprile 1998) è stato presentato il risultato preliminare di uno studio di intervento con metiltetraidrofolato, in confronto con acido folico, in soggetti con episodi di trombosi venosa o arteriosa giovanile, associati a difetto omozigote di MTHFR termolabile con o senza iperomocisteinemia. Il trattamento con MTHF per 3 settimane a 15 mg al giorno ha ridotto nei soggetti con iperomocisteinemia dell'86% i livelli di o., riconducendo in tutti i soggetti meno uno i valori nel range della normalità. E l'effetto di controllo sui livelli di o. permaneva anche dopo tre mesi dall'interruzione del trattamento. Questo dato suggerisce la possibilità di un intervento con metiltetraidrofolato non continuo ma a cicli, ciò che presenta il vantaggio di impedire un adattamento metabolico ad un apporto costante della vitamina.

Conclusioni

Gli studi epidemiologici hanno inequivocabilmente stabilito che i livelli elevati di o. nel plasma precedono e predicono la comparsa di disturbi cardiovascolari. L'iperomocisteinemia è quindi da considerarsi un fattore di rischio modificabile per i danni vascolari perché soddisfa i criteri di causalità, coerenza, forza, temporalità e plausibilità biologica (Hill *et al.*, 1965). La relazione tra livelli di o. e malattia cardiovascolare è graduale senza un apparente valore soglia e rimane forte anche dopo le opportune correzioni per fattori di confondimento. L'effetto congiunto di iperomocisteinemia e altri fattori di rischio convenzionali, quali fumo e ipertensione, può raggiungere un rischio particolarmente elevato. L'alta prevalenza di iperomocisteinemia moderata causata da fattori congeniti e acquisiti rende questa alterazione metabolica un obiettivo ideale per l'intervento nei pazienti con disturbi vascolari e nella popolazione generale. La somministrazione delle vitamine, in particolare dell'acido folico, è un mezzo efficace, sicuro e poco costoso per ridurre i livelli elevati di o. (Malinow *et al.*, 1998; Welch e Loscalzo, 1998; Clarke *et al.*, 1998).

In attesa dei risultati degli studi clinici prospettici di intervento che dovranno sancire definitivamente l'utilità dell'impiego delle vitamine nella prevenzione primaria e secondaria delle malattie vascolari, in considerazione della sicurezza e modesto costo della terapia, non appare inopportuno il ricorso fin d'ora al trattamento con acido folico da solo o eventualmente associato a B₁₂ e B₆, almeno nei pazienti a rischio con elevati livelli plasmatici di o.

Bibliografia

- Boers G. H. J. *et al.*, *Hum. Genet.*, 1985, **69**, 164.
Boushey C. J. *et al.*, *JAMA*, 1995, **274**, 1049.
Brattström L. *et al.*, *J. Nutr.*, 1996, **126**, 1276S.
Butterworth C. E. J. *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, **50**, 353.
Carson N. A. J. *et al.*, *Arch. Dis. Child.*, 1962, **37**, 505.
Clarke R. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1991, **324**, 1149.
Clarke R. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1998, **316**, 894.
Gerritsen T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, **9**, 493.
Graham I. *et al.*, *JAMA*, 1997, **277**, 1775.
Hill A. B. *et al.*, *Proc. R. Soc. Med.*, 1965, **58**, 295.
Homocysteine Metabolism 2nd International Conference, *Netherlands J. Med.*, 1998, **52**, supplement, s50.
Hyland K. *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1992, **579**, 55.
King S. S. *et al.*, *Pediatr. Res.*, 1979, **13**, 1141.
King S. S. *et al.*, *Metabolism*, 1988a, **37**, 611.
King S. S. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1988b, **43**, 414.
King S. S. *et al.*, *Ann. Rev. Nutr.*, 1992, **12**, 279-298.
Mudd S. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338** (15), 1009-1015.
McClure K. S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1969, **56**, 111.
McCully K. S. *et al.*, *Atherosclerosis*, 1975, **22**, 215.
McCully K. S., *Nat. Med.*, 1995, **2**, 386.
Mudd S. H. *et al.*, *Science*, 1964, **143**, 1443.
Mudd S. H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **46**, 905.

- Mudd S. H. *et al.*, *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 1995, Mc Graw-Hill, New York, p. 1279.
Ness A. R. *et al.*, *Int. J. Epidemiol.*, 1997, **26**, 1.
Nygård O. *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, **65**, 136.
Nygård O. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 230-238.
Refsum H. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 624.
Refsum H. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1989, **53**, 1921.
Refsum H. *et al.*, *Annu. Rev. Medicine*, 1998, **49**, 31.
Rozen R. *et al.*, *J. Inher. Metab. Dis.*, 1996, **19**, 589.
Schipchandler M. T. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 881.
Stabler S. *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1987, **162**, 185.
Stamler J. S. *et al.*, *Nutr. Rev.*, 1996, **54**, 1.
Ueland P. M. *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 1989, **114**, 473.
Ueland P. M. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 1764-1779.
Vollset S. E. *et al.*, *Homocysteine From Basic Science to Clinical Medicine*, 1997, Kluwer, Amsterdam.
Welch G. N. e Loscalzo J., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 1042.
Wilcken D. E. L. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1976, **57**, 1079.

ROBERTO GRADNIK E ENRICO CASTINO

OMOCISTINURIA: v. OMOCISTINURIA (X, 1693-1699); TROMBOSI**, l'omocistinuria; v. anche OMOCISTEINA**, col. **4180.

ONCOGENI E PROTONCOGENI

i. *oncogenes and proto-oncogenes.*

SOMMARIO

Introduzione (col. 4184): *Definizione*. - *Scoperta dei virus oncogeni*. - *Oncogeni e protoncogeni*. - *Coinvolgimento degli oncogeni nei tumori umani*. - *Oncogeni virali e cancro*. - *Relazione tra oncogeni e cancro*. *Gli antioncogeni o oncosoppressori*. - *Conversione di protoncogeni cellulari in oncogeni*. - *Trasduzione del segnale e funzione degli oncogeni cellulari* (col. 4193): *Meccanismi di trasmissione dei segnali*. - *Gli oncogeni dei virus a DNA*. - *Cromosomi, traslocazioni e oncogeni*. - *Prodotti di alcuni importanti oncogeni e loro relazione con il cancro* (col. 4199). - *Implicazione diagnostiche e farmacologiche* (col. 4201).

Introduzione

Definizione

Sono così chiamati i geni la cui attività favorisce l'insorgenza del cancro. Essi furono identificati inizialmente nei virus oncogeni (v.), in grado di indurre la formazione di tumori in animali, e quindi nelle cellule cancerose di numerosi tumori umani. L'idea che l'oncogene sia come un nemico interno già presente nelle cellule, ma solitamente inattivo (*teoria dell'oncogene*, v. sotto), è però errata. Gli oncogeni delle cellule non provengono da virus ma derivano da normali geni cellulari non tumorigenici chiamati *protoncogeni* o *oncogeni cellulari*. Questi ultimi hanno una funzione utile, poiché i loro prodotti sono coinvolti nella regolazione di processi vitali per la cellula; essi acquisiscono proprietà oncogene per mutazione o perché la loro attività diventa sregolata.

Gli oncogeni dei virus tumorali si dividono in due classi. Quelli dei retrovirus (v.*; v.***) derivano dai protoncogeni cellulari. Gli oncogeni dei virus tumorali a DNA sono invece dissimili da qualunque gene cellulare; i loro prodotti interagiscono con le proteine cellulari che controllano la crescita delle cellule, alterandone l'attività.

L'azione biologica degli oncogeni è svolta dalle proteine da essi prodotte, chiamate anche oncoproteine.

Scoperta dei virus oncogeni

All'inizio del secolo si credeva che tutte, o quasi, le malattie fossero dovute a cause esterne, in genere microbiche. La scoperta dei virus portò quindi ad interrogarsi sulla loro eventuale relazione col cancro. I primi successi in questa direzione risalgono al 1909, quando il medico inglese Peyton Rous dimostrò l'esistenza di un virus, chiamato il virus del sarcoma di Rous o RSV, in grado di provocare sarcomi

negli uccelli. L'RSV appartiene alla famiglia dei retrovirus: virus a RNA che si replicano per mezzo della trascrittasi inversa e vengono copiati in una molecola di DNA che si inserisce stabilmente nei cromosomi della cellula infettata. Rous abbandonò le sue ricerche, sia perché non veniva creduto sia perché non riuscì a trovare altri esempi di virus oncogeni, il che gli faceva pensare che quello da lui scoperto fosse un caso del tutto particolare. Successivamente, furono identificati numerosi altri virus in grado di provocare il cancro in animali: sia retrovirus, simili a RSV, che virus a DNA quali i virus polio e SV40, i virus papilloma e l'EBV (virus di Epstein-Barr). La scoperta dei virus tumorali fu importante perché la semplicità genetica dei virus ci ha permesso di definire le anomalie genetiche delle cellule cancerose ed ha reso più semplice capire il meccanismo responsabile della loro capacità di produrre tumori (V. VIRUS ONCOGENI).

Oncogeni e protoncogeni

Come fanno i virus a causare il cancro? All'inizio degli anni '70, l'uso di mutanti virali temperatura-sensibili, che causavano la trasformazione neoplastica delle cellule solo ad una data temperatura, permise di chiarire che nel genoma virale erano presenti particolari geni necessari e sufficienti ad iniziare e mantenere la trasformazione neoplastica: questi geni furono chiamati oncogeni virali. Fu quindi isolato il particolare gene che il virus scoperto da Rous utilizza per indurre il cancro; esso fu chiamato *v-src* (v sta per virale) ed è il prototipo degli oncogeni. Fu allora che si diffuse l'uso del termine oncogene e si pose la questione se le cellule stesse possedessero tali geni. Fu formulata da Huebner e Todaro la *teoria dell'oncogene* per spiegare l'origine dei tumori umani. Secondo questa ipotesi, l'origine di tutti i cancri dell'uomo sarebbe dovuta all'attivazione di oncogeni, normalmente repressi, impiantatisi nella linea germinale dei vertebrati attraverso infezioni di retrovirus avvenute moltissimo tempo addietro. Si vide che le cellule dei vertebrati portano realmente una versione del gene *v-src*, ma questo è un normale gene cellulare chiamato *c-src*, che

svolge una funzione importante per le cellule e non è di per sé oncogeno, ma ha la potenzialità di diventarlo se mutato in un certo modo. Il virus di Rous è un pirata involontario che ha acquisito il gene cellulare con un processo di trasduzione e lo ha mutato trasformandolo in un gene del cancro. Questo risultato, mentre confermava che geni simili agli oncogeni dei retrovirus fossero presenti nel genoma delle cellule, rovesciava però la teoria dell'oncogene, secondo la quale gli oncogeni erano presenti come tali nel normale genoma cellulare, all'interno del quale erano stati portati dai retrovirus. Si vide poi che questa osservazione aveva validità generale: anche gli oncogeni degli altri retrovirus originano da geni cellulari: per es. l'oncogene *v-myc* del virus MC29 (un virus particolarmente interessante perché causa carcinomi, il tipo prevalente di tumori umani) e l'oncogene *v-ras* del virus del sarcoma di ratto derivano, per mutazione, dai geni cellulari *c-myc* e *c-ras*. Il progenitore cellulare (*c-src*, *c-myc*, *c-ras* etc.) di un oncogene retrovirale viene chiamato oncogene cellulare oppure protoncogene; se ne conoscono varie decine.

La situazione è invece diversa per gli oncogeni dei virus a DNA, perché essi non hanno una controparte cellulare.

Coinvolgimento degli oncogeni nei tumori umani

Ci si chiese poi se esistesse una relazione tra i cancri di origine non virale, che sono la maggioranza, ed i protoncogeni, e se questi ultimi fossero il bersaglio di mutazioni riscontrabili in cellule cancerose. Questa relazione esiste e venne messa in evidenza in due modi distinti. Una prima prova venne dallo studio di tumori delle cellule B (linfomi) del topo e dell'uomo, che presentavano caratteristiche traslocazioni cromosomiche. Si osservò che in entrambi i casi le traslocazioni causavano l'attivazione del gene *c-myc*. Altre evidenze vennero da esperimenti di trasferimento genico volti a dimostrare la presenza di oncogeni attivi in cellule trasformate; la presenza di un oncogene era rivelata per mezzo della formazione di foci (cloni di cellule trasformate) in cellule NIH3T3. Con questi esperimenti fu messo

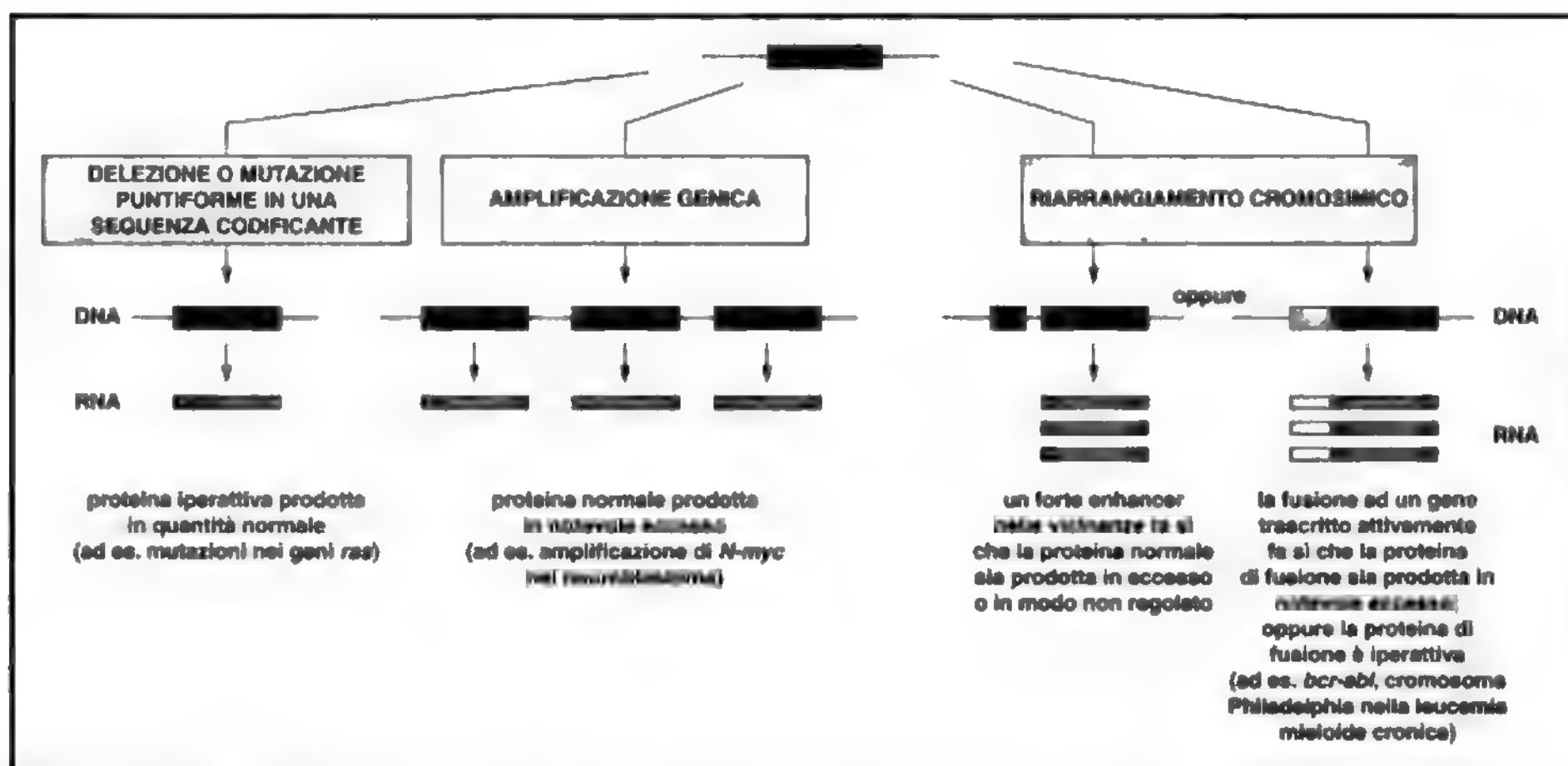


Fig. 1. Diversi modi per convertire un protoncogene in oncogene. (Da Alberts et al., *The Cell*, 1994, per gentile concessione della Garland Publ., New York-London).

ONCOGENI E PROTONCOGENI

in evidenza che svariati tumori umani (circa il 25% del totale) contenevano versioni mutate e oncogeniche del protoncogene *c-ras*; molto frequentemente il gene *c-ras* diviene oncogene in conseguenza di mutazioni nell'aminoacido dodici. Si ritiene ora che tutte, o quasi, le forme di cancro contengano specifici protoncogeni: il loro numero è di circa un centinaio.

Un protoncogene può diventare oncogene in tre modi diversi: 1) per mutazioni, che causano la produzione di una proteina con proprietà nuove o alterate, 2) per amplificazione genica, che causa un eccesso di produzione di una proteina normale, 3) per riarrangiamento cromosomico, che può causare anomalie nella produzione di una proteina altrimenti normale o la creazione di una proteina chimerica iperattiva, tramite fusione di due geni diversi (fig. 1).

Oncogeni virali e cancro

La maggioranza dei cancri umani non ha origine virale; tuttavia virus sono implicati in circa il 10-15% dei cancri umani, in particolare il cancro del fegato (virus HBV), il carcinoma della cervice uterina (virus papilloma), il linfoma di Burkitt ed il carcinoma del naso e della faringe (virus EBV), la leucemia delle cellule T dell'adulto (HTLV-1) e il sarcoma di Kaposi (HIV). HBV, EBV e virus papilloma sono virus a DNA, mentre HTLV-1 and HIV sono retrovirus. Per più ampi particolari v. VIRUS ONCOGENI; RETROVIRUS (v.*; v.**); TUMORI (v.*; v.**). Tutti questi virus devono agire insieme ad altri fattori per causare il cancro. Molti di essi possiedono oncogeni i cui prodotti contribuiscono direttamente alla trasformazione neoplastica delle cellule: pX di HBV, E6 ed E7 dei virus papilloma, EBNA 1 di EBV. L'HIV, invece, partecipa allo sviluppo del sarcoma di Kaposi in maniera indiretta, impedendo che cellule endoteliali, trasformate da altri agenti, vengano distrutte dal sistema immunitario. Nel sarcoma di Kaposi è stato associato anche lo *Human Herpesvirus-8* (HHV8).

Relazione tra oncogeni e cancro. Gli anti-oncogeni o oncosoppressori

Il cancro si manifesta come una crescita cellulare incontrollata: è una malattia delle cellule dovuta alla perdita dei meccanismi di controllo che ne regolano la proliferazione ed il comportamento sociale in relazione alle altre cellule dell'organismo. La perdita di questi meccanismi è di solito la conseguenza di mutazioni nei numerosi geni che li regolano ed è noto che sono necessari molteplici cambiamenti per passare da una cellula normale ad una maligna. I geni regolatori in grado di contribuire, se mutati, alla genesi del cancro possono essere suddivisi in due grandi categorie: quelli che agiscono da acceleratore e quelli che agiscono da freno del motore cellulare che guida il processo di proliferazione. Nel primo caso si parla di *oncogeni cellulari* (o *protoncogeni*), nel secondo di *antioncogeni* (o *geni soppressori tumorali*).

Il cancro è quindi una malattia genetica ed il fenotipo neoplastico è ereditabile, trasmettendosi da una cellula ai suoi discendenti. Il concetto di oncogene è per certi versi paradossale, perché si tende istintivamente a considerare un oncogene come un gene dominante in grado da solo di causare la trasformazione in senso neoplastico di cellule, mentre è noto che una singola mutazione in un gene non è sufficiente a causare il cancro. Questa contraddizione si spiega col fatto che i metodi solitamente usati per saggiare gli oncogeni non riproducono la complessità del controllo della proliferazione delle cellule nell'organismo. Infatti, quando l'attività di questi geni è seguita in linee cellulari permanenti, quali i fibroblasti NIH3T3, essi sono in grado di causare trasformazione delle cellule in senso neoplastico con grandissima efficienza. Utilizzando, invece, che linee cellulari, fi-

broblasti embrionali di roditore o fibroblasti umani, si osservò che la capacità degli oncogeni di causare la trasformazione neoplastica era molto più limitata. Un singolo oncogene, quale *myc* o *ras*, non era più in grado di causare la trasformazione delle cellule, mentre opportune combinazioni degli stessi geni (ad es. *myc* + *ras*) erano attive.

Questi risultati hanno trovato conferma in esperimenti nei quali si è esaminata la capacità degli oncogeni di causare tumori in animali, con la tecnica dei topi transgenici. Topi che esprimono una proteina oncogena come *Myc* o *Ras* in un particolare tessuto, per es. il tessuto mammario, mostrano formazione di tumori in quel tessuto. Tuttavia solo una piccola parte delle cellule sono trasformate, a dimostrazione del fatto che un oncogene non è sufficiente ad indurre il cancro. Utilizzando la combinazione *Myc* + *Ras*, si osservava una insorgenza precoce ed un maggior numero di tumori; tuttavia anche in questo caso molte cellule non erano trasformate, a suggerire la necessità di ancora altri eventi.

Poiché le mutazioni necessarie all'insorgenza del cancro non si producono tutte contemporaneamente, la malattia si sviluppa attraverso un processo di evoluzione clonale. Le cellule cancerose nascono cioè attraverso l'accumulo di mutazioni nei geni che agiscono da acceleratori, i protoncogeni, o da freno, gli antioncogeni. Le mutazioni riscontrate nei protoncogeni sono tali da portare ad un acceleratore più attivo, mentre quelle negli antioncogeni causano una rottura del freno: in ogni caso le mutazioni forniscono un vantaggio nella crescita cellulare.

La grande maggioranza delle mutazioni nel cancro sono somatiche e dovute a fattori ambientali (radiazione solare, fumo di sigarette, radiazioni ionizzanti, carcinogeni chimici, elementi della dieta) per cui sarebbero, in linea di principio, prevenibili. In realtà la relazione con carcinogeni ambientali è molto complessa ed è importante anche la suscettibilità individuale, che può essere correlata a tratti genetici familiari, a caratteristiche etniche, all'età o al sesso.

In una piccola percentuale di casi (5-10%) il cancro si sviluppa in individui con sindromi cancerose ereditarie; in questi casi le mutazioni sono presenti nella linea germinale e quindi ereditarie. Le mutazioni ereditarie colpiscono soprattutto gli antioncogeni (*p53*, *Rb*, *APC*, etc.) e più raramente gli oncogeni; nelle sindromi MEN2 (neoplasia endocrina multipla di tipo 2) e HPRC (cancro renale papillare ereditario) sono coinvolte mutazioni attivanti, rispettivamente, gli oncogeni *ret* e *met*. La conoscenza di queste mutazioni può essere utilizzata per test genetici di suscettibilità al cancro. Le alterazioni genetiche che si hanno durante la carcinogenesi, e che spesso si presentano in modo riproducibile nello stesso tipo di tumore, possono inoltre servire da marcatori per rivelare precocemente cellule cancerose o precancerose in campioni clinici mediante la tecnica PCR (v.*; v.**). Un esempio in tal senso è dato da mutazioni nel gene *K-ras*, in cellule di colite ulcerosa, che sono ad alto rischio per cancro al colon. La presenza di mutazioni in *K-ras*, diagnosticabili in modo relativamente semplice, segnala l'esistenza di lesioni preneoplastiche. I prodotti di alcuni di questi geni sono anche bersagli terapeutici per eventuali farmaci anti cancro.

Agli antioncogeni o geni soppressori tumorali è stata dedicata un'ampia trattazione a se stante in cui vengono descritte analiticamente le loro funzioni. Tra i principali antioncogeni citiamo i seguenti: *p53* (v. anche *p53*, GENE E PROTEINA**), *APL*, *WT1*, *DCC*, *nfl*, *nf2*, *BRCA1*, *BRCA2*, gli antioncogeni della sindrome HNPCC (*hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2*), *RB*, *XP*, *ATM*, *MTS1*, *MTS2*, *VHL*, *MLM* (gene *p16*), (v. ANTIONCOGENI**, coll. **460-474).

Nella tab. I sono elencati i principali oncogeni e antioncogeni e le corrispondenti patologie tumorali.

TAB. I. PRINCIPALI ONCOGENI E ANTIONCOGENI E CORRISPONDENTI PATOLOGIE TUMORALI

Oncogeni e antioncogeni (a.)	Localizzazione cromosomica	Sindrome	Tumori
<i>RB</i> (a.)	13q14.3	Retinoblastoma familiare	Retinoblastoma, osteosarcoma
<i>p53</i> (a.)	17p13.1	Sindrome di Li-Fraumeni	Microcitomi polmonari, sarcomi, cancro della mammella, leucemie, tumori endocranici; coinvolto nell'apoptosi
<i>APC</i> (a.)	5q21	Poliposi adenomatosa familiare (FAP)	Cancro coloretale
<i>hMSH2, hMLH1</i>	2p16; 3p21	Cancro coloretale non poliposico (HNPCC)	Cancro coloretale associato a glioma (sindrome di Turcot)
<i>hPMS1, hPMS2</i> (a.)	2q32; 7p22		
<i>DCC</i> (a.)	18q	Cancro coloretale	
<i>nf1</i> (a.)	17q11.2	Neurofibromatosi tipo 1 (NF1)	Neurofibromi, tumori cerebrali
<i>nf2</i> (a.)	22q12.2	Neurofibromatosi tipo 2 (NF2)	Neuromi dell'acustico; meningiomi
<i>WT1</i> (a.)	11p13	Tumore di Wilms	WAGR (tumore di Wilms, malformazioni genito-urinarie, ritardo mentale)
<i>p57/KIP2</i> (<i>IGF2</i> ; <i>KVLQTI</i>)	11p15	Sindrome di Beckwith-Wiedmann	Tumore di Wilms
<i>PTCH</i> (a.)	9q22.3	Sindrome del carcinoma a cellule nevice basali (NBCCS)	Basaliomi cutanei, tumori del cervello, medulloblastoma
<i>BRCA1</i> (a.)	17q21	Cancro mammario familiare 1	Cancro mammario, cancro ovarico
<i>BRCA2</i> (a.)	13q12	Cancro mammario familiare 2	Cancro mammario, cancro mammario maschile
<i>VHL</i> (a.)	3p25	Sindrome di von Hippel-Lindau	Carcinoma renale a cellule chiare, feocromocitoma
<i>MET</i>	7q31	Cancro papillare renale ereditario	
<i>p16 (CDKN2)</i> (a.)	9p21	Melanoma familiare	Melanoma; cancro pancreatico
<i>CDK4</i>	12q13	Sarcomi	
<i>MEN1</i> (o <i>PRAD1</i> ?)	11q13	Neoplasia endocrina multipla tipo 1 (MEN1); tumore delle cellule delle isole pancreatiche	Iperparatiroidismo; adenomi dell'ipofisi
<i>RET</i> (<i>Ret</i>)	10q11.2	Neoplasia endocrina multipla tipo 2 (MEN2)	Cancro familiare midollare della tiroide
<i>EXT1</i>	8q24.1		
<i>EXT2</i>	11p11-13	Esostosi multiple	Condrosarcoma
<i>EXT3</i>	19p		
<i>PTEN</i> (<i>MMAC1</i>)	10q23	Malattia di Cowden	Cancro follicolare della tiroide, polipi intestinali
<i>MXI1</i>	10q24-q25	Cancro ereditario della prostata	Cancro della prostata
<i>?</i>	17q25	Cheratoderma palmoplantare	Cancro dell'esofago, leucoplachia
<i>ATM</i> (a.)	11q22	Atassia-teleangiectasia, immunodeficienza, atassia cerebellare	Linfomi
<i>BLM</i>	15q26.1	Sindrome di Bloom	Tumori solidi
<i>XPB; HPD; XPA</i> (a.)	Gruppi multipli di complementazione	Xeroderma pigmentoso	Tumori cutanei
<i>FACC</i>	9q22.3	Sindrome di Fanconi	
<i>FACA</i>	16q24.3		
<i>p15</i>	9p21		Tumore della vescica
<i>DPC4</i>	18q21		
<i>FHIT</i>	3q21; 3p14.2		Cancro del pancreas
<i>c-myc</i>	8q24	Variante del SCLC polmonare	Cancro del polmone
<i>N-myc</i>	2p25	Neuroblastoma	Leucemie, tumori dello stomaco
<i>L-myc</i>	1p32	Microcitoma polmonare	
<i>K-ras</i>	19p13.2	Adenocarcinomi polmonari (assente nei microcitomi)	Cancro del colon, cancro del pancreas, sarcomi
<i>H-ras</i>	2q14-q21	Cancro della vescica	Eritroleucemia
<i>N-ras</i>	11p15.5	Leucemia mieloide	Vari tumori
<i>BCL2</i>	18q21.3	Coinvolto nell'apoptosi	Tumori non NSCLC del polmone, linfomi a cellule centrofollicolari
<i>TSC2</i>	16p13.3	Sclerosi tuberosa	Angiofibroma, angiomiolipoma

ONCOGENI E PROTONCOGENI

Conversione di protoncogeni cellulari in oncogeni

Il modo in cui gli oncogeni retrovirali sono attivati a partire dai protoncogeni cellulari ha costituito un valido modello delle alterazioni genetiche riscontrate in tumori umani. I protoncogeni possono diventare oncogeni in tre modi diversi:

1) per mutazione della sequenza codificante del gene con conseguente produzione di una proteina più attiva o con proprietà alterate, come si riscontra ad esempio nei geni *ras* (*H-ras*, *Ki-ras* e *N-ras*), frequentemente alterati in tumori umani da mutazioni puntiformi che cambiano un singolo aminoacido (di solito nella posizione 12, 13 o 61) nella proteina. In alcuni tumori (per es. il carcinoma colorettale), le mutazioni nel gene *ras* (*Ki-ras*) avvengono ad uno stadio precoce e possono costituire un valido indizio diagnostico. Le mutazioni puntiformi aumentano notevolmente la capacità oncogena dei geni *ras*, provocando significativa diminuzione dell'attività GTPasica della proteina;

2) per amplificazione genica, che aumenta il numero di copie del gene fino a 100 e più volte e, di conseguenza, anche la quantità di prodotto genico nella cellula. Un esempio è l'amplificazione del gene *N-myc* nei neuroblastomi. A volte all'effetto dell'amplificazione si somma quello di mutazioni nella regione codificante;

3) per traslocazioni cromosomiche, frequenti in leucemie e linfomi delle cellule *B* e *T* (v. tab. II).

La traslocazione può avere due diverse conseguenze:

a) porre il protoncogene sotto l'influenza di forti elementi di regolazione trascrizionale, alterando così il controllo dell'espressione del gene. Il caso più noto è la traslocazione di *c-myc* nel linfoma di Burkitt, che mette il protoncogene sotto l'influenza degli elementi che regolano l'espressione dei geni per le immunoglobuline;

b) una diversa forma di danno si ha quando la traslocazione porta alla fusione di due geni (il protoncogene ed un altro gene cellulare) in modo tale da creare una proteina ibrida, composta da domini proteici derivati da entrambi i geni coinvolti nella traslocazione. Il primo esempio di questo tipo di eventi è la traslocazione t(9;22) che genera il cromosoma Philadelphia nella leucemia mieloide cronica. La traslocazione causa la fusione del protoncogene *c-abl* con un gene chiamato *bcr*; la proteina Bcr-Abl è localizzata nel citoplasma e contiene il dominio attivo tirosina chinasi del gene *abl*. Un altro caso è la fusione *Pml-Rarα* nella leucemia promielocitica, un ibrido tra il recettore per i retinoidi *RARα* ed il fattore trascrizionale *Pml* (v. anche LEUCEMIE**).

TAB. II. ONCOGENI E ALCUNE TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE

Gene (cromosomi)	Traslocazioni	Tumori
<i>ABL</i> (9q34.1) <i>BCR</i> (22q11)	(9;22) (q34;q11)	Leucemia cronica mieloblastica (cromosoma Philadelphia)
<i>AML1</i> (21q22) <i>EAP</i> (3q26) <i>EVII</i> (3q26)	(3;21) (q26;q22)	Leucemia acuta mieloblastica; mielodisplasia
<i>APL</i> (15q21) <i>RARα</i> (17q21)	t(15;17)	Leucemia acuta promielocitica
<i>ATF1</i> (12q13) <i>EWS</i> (22q12)	(12;22) (q13;q12)	Melanoma maligno delle parti molli (MMSP)
<i>BCL1</i> (11q13.3) <i>IgH</i> (14q32)	(11;14) (q13;q32)	Linfoma delle cellule mantellari
<i>BCL2</i> (18q21.3) <i>IgH</i> (14q32)	(14;18) (q32;q21)	Linfoma follicolare
<i>BCL3</i> (19q13.1) <i>IgH</i> (14q32)	(14;19) (q32;q13)	Leucemia cronica a cellule linfocitiche B
<i>ERG</i> (21q22.3) <i>EWS</i> (22q12)	(22;12) (q12;q22)	Sarcoma di Ewing
<i>FLI1</i> (11q24) <i>EWS</i> (22q12)	(11;22) (q24;q12)	Sarcoma di Ewing
<i>LCK</i> (1p34) <i>TCRB</i> (7q35)	(1;7) (p34;q35)	Leucemia acuta linfocitica a cellule T (ALL)
<i>MLL/ALL1/HRX</i> (11q23) <i>myc</i> (8q24)	(4;11) (q21;q23) (8;14) (q24;q32) (2;8) (p12;q24) (8;22) (q24;q11)	Leucemia acuta linfocitica (ALL) Linfoma di Burkitt; ALL a cellule B
<i>TANI</i> (9q34) delezione <i>WT1</i> (11p13) <i>EWS</i> (22q12)	(7;9) (q34;q34) (11;22) (p13;q12)	ALL a cellule T Tumore desmoplastico a piccole cellule rotonde (DSRCT)
<i>TLS/FUS</i> (16p11) <i>CHOP</i> (12q13)	(12;16) (q13;p11)	Liposarcoma mixoide
<i>PAX3</i> (7q35) <i>FKHR/ATV</i> (13q14)	(2;13) (q35;q14)	Rabdomiosarcoma alveolare
<i>PAX7</i> (1p34) <i>KHR/ATV</i> (13q14)	(1;13) (p34;q14)	Rabdomiosarcoma alveolare
<i>RET</i> (<i>Ret</i>) (10q11.2)	(10;17) (q11.2;q23)	Carcinoma midollare della tiroide

I meccanismi responsabili dei danni genetici a carico dei protooncogeni sono vari e non ben compresi. Mutazioni possono avvenire casualmente e spontaneamente (ad esempio come errori nel processo di replicazione del DNA) o essere provocate da agenti mutageni presenti nell'ambiente, come radiazioni U.V., radioattività, fumo di sigarette, composti aromatici e vari altri agenti chimici. Le cause dell'amplificazione genica sono piuttosto oscure. Le traslocazioni sono frequenti nei tumori di cellule B e T. In queste cellule, esse coinvolgono di solito i geni delle immunoglobuline nei linfociti B o del recettore per l'antigene (*T cell receptor*) nei T. Ciò fa ritenere, anche se mancano prove conclusive in proposito, che le traslocazioni nascono da errori dei meccanismi enzimatici che normalmente riarrangiano segmenti di DNA nelle cellule B e T per assemblare i geni delle immunoglobuline e del *T cell receptor*.

Trasduzione del segnale e funzione degli oncogeni cellulari Meccanismi di trasmissione dei segnali

Lo studio degli oncogeni dei retrovirus e quello degli oncogeni trovati nei tumori di origine non virale ha chiarito che i loro prodotti sono coinvolti nel meccanismo cellulare

di trasmissione di un segnale esterno dalla membrana cellulare al nucleo. In questo processo sono solitamente coinvolti recettori transmembrana con attività tirosina chinasi, che vengono attivati in seguito al legame al loro dominio extracellulare di specifici ligandi, quali fattori di crescita solubili o proteine presenti sulla superficie di cellule vicine. A volte i recettori dei fattori di crescita non hanno attività tirosina chinasi, ma sono comunque strettamente associati a proteine con tale attività. Il legame col ligando porta alla dimerizzazione del recettore, all'attivazione dell'attività tirosina chinasi, alla sua autofosforilazione ed al successivo reclutamento di proteine trasduttrici di segnale che riconoscono le tirosine fosforilate presenti sul recettore attivato. Poiché un recettore è fosforilato in più di una tirosina, esso può legare diverse proteine trasduttrici e attivare più vie di trasmissione del segnale. Molti segnali che risultano dall'attivazione di tirosina chinasi associate alla superficie cellulare transitano per un interruttore costituito dalla proteina Ras e vengono trasmessi al nucleo da chinasi citoplasmatiche quali le MAP-chinasi. Oncoproteine nucleari sono indotte in risposta ai segnali esterni e hanno la potenzialità di agire come fattori di trascrizione (fig. 2).

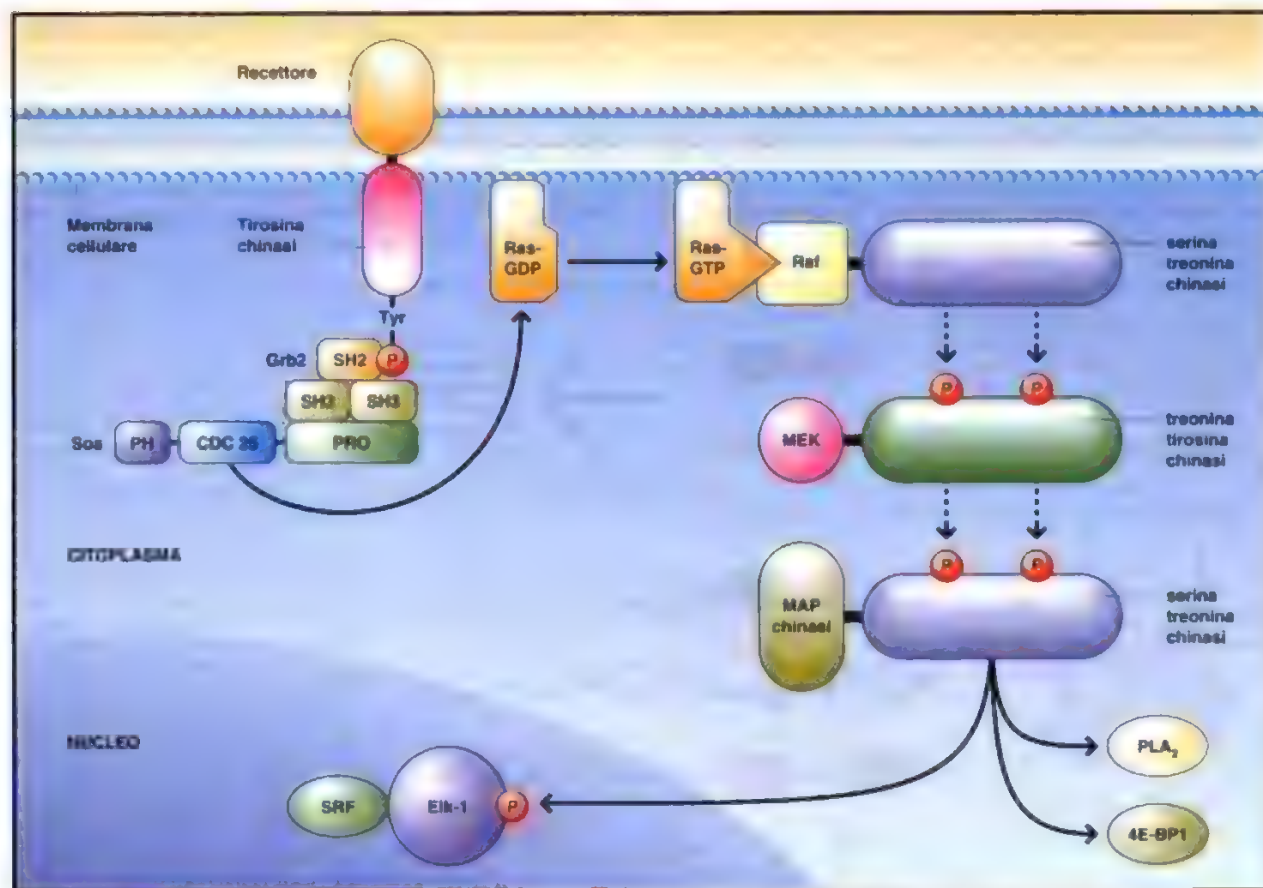


Fig. 2. Via di trasduzione del segnale da un recettore tirosina-chinasi al nucleo. Una volta attivato da un fattore di crescita o da una molecola di superficie di una cellula adiacente, il recettore autofosforila un proprio residuo di tirosina. La tirosina fosforilata del recettore recluta il trasduttore Grb2, caratterizzato dai domini SH2 e SH3, a sua volta fisicamente associato al fattore di scambio Sos. Quest'ultimo viene così portato nelle vicinanze della proteina Ras, localizzata sulla membrana, e la attiva facilitando lo scambio dalla forma inattiva (Ras-GDP) a quella attiva (Ras-GTP). La proteina Ras attivata mette in moto una cascata di tre protein-chinasi (Raf, MEK e MAP chinasi), generando una forte amplificazione del segnale. L'ultimo anello della catena (la MAP chinasi) agisce sia nel citoplasma che nel nucleo regolando, tramite fosforilazione, una varietà di proteine critiche, quali fattori di trascrizione (es. Elk-1), regolatori della sintesi proteica (es. 4E-BP1) ed enzimi (es. la fosfolipasi PLA_2) che controllano il metabolismo dei fosfolipidi. Il Gruppo fosfato. (Da Bishop J. M. e Weinberg R. A., *Molecular Oncology*, 1996, per gentile concessione di Scientific American, New York).

Negli eventi di trasduzione del segnale all'interno della cellula, sono di particolare importanza interazioni molecolari di accoppiamento tra proteine. I più studiati tra i domini proteici che mediano interazioni proteina-proteina coinvolte in questi processi sono i domini SH2 e SH3, identificati inizialmente nella proteina Src. Questi domini sono presenti in tirosina chinasi associate a recettori quali Src, Fyn, Yes, Lyn, Abl, PI-3K o in molecole adattatrici come Grb2, Shc, Crk, etc. Il dominio SH2 lega le tirosine fosforilate, presenti nei recettori una volta attivati dai fattori di crescita, mentre il dominio SH3 lega brevi sequenze aminoacidiche, ricche in prolina, presenti in altre proteine (ad es. Sos) coinvolte nella trasduzione del segnale e che agiscono più a valle dei recettori. Domini SH2 e SH3 di proteine diverse hanno diverse preferenze di legame e ciò spiega in parte come possano prodursi segnali specifici. Altri domini di interazione presenti in molecole trasduttrici sono il dominio di omologia alla pleckstrina (PH), che media l'interazione di proteine segnale a fosfoinositidi (lipidi) di membrana, il dominio PTB, un altro dominio che lega tirosine fosforilate, il dominio EH, coinvolto nell'invio di segnali al citoscheletro, il dominio delle proteine 14-3-3, che media l'interazione con l'oncoproteina Raf e con molecole che regolano il ciclo cellulare, ed ancora altri come i domini PDZ e WW. Per mezzo di questi moduli di interazione, il segnale viaggia all'interno della cellula, passando da una proteina all'altra.

Le proteine Ras, alle quali arrivano molti dei segnali provenienti dai recettori, attivano una cascata di protein-chinasi che inizia con Raf e prosegue con l'attivazione successiva di MEK e delle MAP chinasi ERK1 ed ERK2. La cascata di chinasi porta ad una forte amplificazione del segnale iniziale. Il ruolo di Ras in questo processo è quello di reclutare la chinasi Raf alla membrana plasmatica. MEK è

attivata dalla fosforilazione in serina ad opera della chinasi Raf. La MAP chinasi è attivata da una fosforilazione in treonina e tirosina ad opera di MEK e migra nel nucleo. Questa via promuove la sintesi di DNA, ed è necessaria alla oncogenesi Ras mediata. Comunque, le proteine Ras hanno ulteriori effetti sulle cellule, causando profondi cambiamenti nell'architettura cellulare e nella morfologia di membrana. Questi effetti sono mediati da proteine della famiglia Rac e Rho. Anche questa via è necessaria per la trasformazione. Perciò Ras ha due vie di segnale per una completa trasformazione e le due vie sono sinergiche.

Oltre a quello che transita via Ras, più recentemente è stato riconosciuto un altro meccanismo di trasduzione, il pathway JAK-STAT. Tirosine fosforilate presenti sui recettori servono da siti di ancoraggio per proteine STAT, che a loro volta vengono fosforilate in tirosina dalle chinasi JAK. Le STAT migrano direttamente nel nucleo, agendo da regolatori trascrizionali.

La trasduzione del segnale porta all'attivazione, tramite fosforilazione, o alla nuova sintesi di fattori di trascrizione che convertono segnali esterni in specifici modelli di attività di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e di processi differenziativi. Molti di questi fattori di trascrizione (Myc, Myb, Jun, Fos, Ets) sono prodotti da oncogeni cellulari. Jun è fosforilato in risposta a segnali extracellulari. Le proteine Myc e Fos vengono prodotte rapidamente in risposta al segnale di fattori di crescita. Fos si associa a Jun, a formare il complesso chiamato AP1. Myc è un fattore trascrizionale che funziona in una intricata rete di regolazione genica insieme alle proteine Max e Mad (fig. 3).

Le proteine della famiglia NF- κ B/Rel sono presenti in forma inattiva nel citoplasma, associate ad una proteina inibitoria, I κ B. In seguito ad induzione, ad opera per es. del

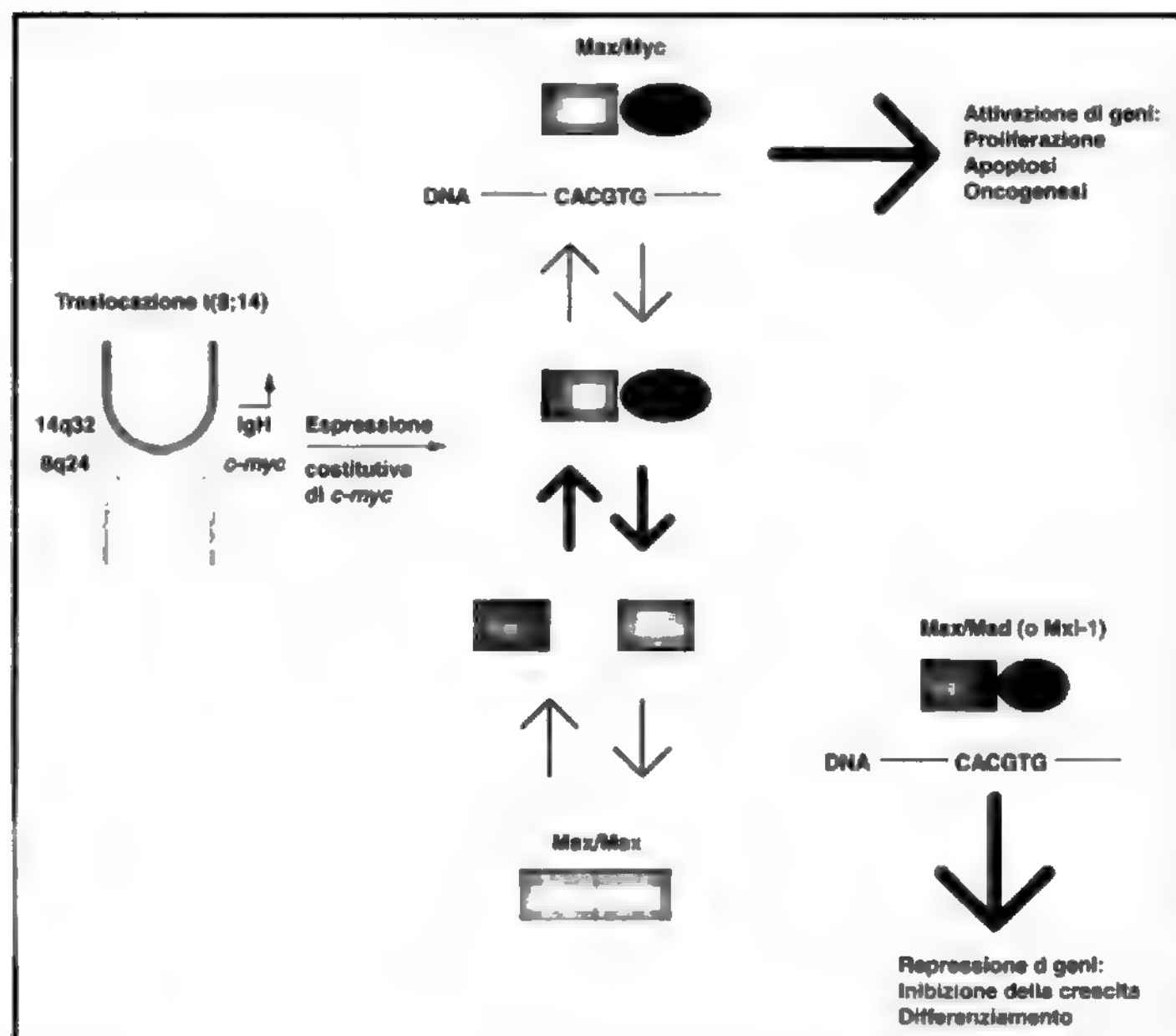


Fig. 3. Il network Myc-Max-Mad è un interruttore molecolare per la proliferazione ed il differenziamento delle cellule. Questo network regolativo ruota intorno alle proteine Max, sempre presenti nelle cellule sotto forma di dimeri. Max è anche in grado di formare etero-dimeri con le proteine Myc e Mad, la cui produzione è fortemente regolata. Le proteine Myc, Max e Mad sono regolatori della trascrizione dei geni che operano come dimeri legando il DNA in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche. Mentre i dimeri Max/Max sono scarsamente attivi, i dimeri Myc/Max e Mad/Max sono antagonisti. I dimeri Myc/Max inducono proliferazione cellulare, ed in certe condizioni apoptosi; i dimeri Mad/Max sono invece coinvolti nella inibizione della crescita e nel differenziamento. Il gene *myc* è coinvolto nella genesi di vari tumori. La traslocazione t(8;14) caratteristica del linfoma di Burkitt (a sinistra), causa un'alterata produzione della proteina Myc, favorendo la formazione di dimeri Myc/Max e alterando l'equilibrio del network. (Per cortesia di Laura Soucek e Sergio Nasi).

TNF, I κ B viene rapidamente degradata, e si ha la comparsa di attività NF- κ B/Rel nel nucleo. NF- κ B è indotto da p75, uno dei recettori per le neurotrofine. I geni bersaglio di questi fattori trascrizionali non sono ancora completamente noti.

Gli oncogeni dei virus a DNA

Questi oncogeni (grande T di SV40, grande T di poliovirus, E6 ed E7 di papillomavirus) non derivano da geni cellulari ed infatti la loro sequenza nucleotidica non è simile ad alcun gene cellulare. Il loro meccanismo d'azione è rimasto a lungo un mistero: si supposeva che essi agissero legando proteine cellulari importanti nel controllo della crescita, ma non si sapeva quali fossero queste proteine né il loro ruolo. Negli anni '80 si osservò che le proteine prodotte da vari di questi oncogeni si associavano, all'interno delle cellule, a prodotti di antioncogeni (geni soppressori tumorali) quali *RB* o *p53*. Risultò quindi chiaro che essi intervenivano nella carcinogenesi legando e bloccando l'attività dei soppressori tumorali e quindi che il loro effetto era simile a quello che si osservava quando gli stessi geni erano inattivati per mutazione. In particolare la proteina grande T (*large T*) del virus SV40 si associa sia a *RB* che a *p53* ed è in grado, da sola, di causare trasformazione neoplastica.

Altri virus a DNA si servono di due oncogeni distinti per trasformare, i cui prodotti si associano uno a *p53* e l'altro a *Rb*. È il caso delle proteine E1A ed E1B di adenovirus (associate rispettivamente a *RB* e *p53*) ed E6 ed E7 del virus papilloma (associate rispettivamente a *p53* e *RB*). Il grande T di poliovirus si associa a *Rb*; il prodotto dell'altro oncogene del virus poliovirus, la proteina middle T, attiva l'attività tirosina chinasi dell'oncoproteina Src. Del prodotto di *EBNA1*, oncogene del virus EBV, non si conosce bene il meccanismo d'azione e lo stesso si può dire della proteina X di HBV, che stimola il percorso Ras-Raf e interagisce anche con *p53*.

Cromosomi, traslocazioni e oncogeni

Molti cancro presentano caratteristiche *traslocazioni cromosomiche*, di origine somatica. Specifiche traslocazioni sono

particolarmente frequenti nelle neoplasie delle cellule emopoietiche (leucemie e linfomi): si riscontrano per es. nel 65% dei casi di leucemie acute. Nella tab. II sono rappresentate le principali traslocazioni cromosomiche collegate a oncogeni che insorgono in malattie maligne. La prima anomalia cromosomale con una associazione specifica ad una neoplasia, la leucemia mieloide cronica, venne identificata nel 1960. Si tratta del cromosoma Philadelphia (Ph¹) che è il risultato di una traslocazione reciproca tra i cromosomi 9 e 22 (fig. 4). Sono successivamente state elencate più di 100 traslocazioni cromosomiche specificamente associate al cancro ed in circa 50 sono stati identificati i geni coinvolti.

Le traslocazioni colpiscono frequentemente i protoncogeni, con due diverse modalità. Nei progenitori delle cellule B e T, questi geni vengono portati in prossimità dei geni che codificano per le catene del recettore T (TCR) o delle immunoglobuline, e si ha come risultato l'espressione inappropriata dell'oncogene traslocato. È il caso degli oncogeni *myc* e *Bcl-2* che sono traslocati in prossimità dei geni delle immunoglobuline: *myc* nel linfoma di Burkitt [t(8;14), t(2;8) e t(8;22)] e *Bcl-2* nel linfoma follicolare [t(14;18)]. Più frequentemente, l'effetto della traslocazione è quello di fondere due geni diversi, con la produzione di una proteina chimerica con proprietà nuove. La traslocazione t(9;22), che genera il cromosoma Philadelphia, come già detto precedentemente, crea la fusione dei geni *bcr* e *abl* con produzione di proteine chimeriche. Il bersaglio delle traslocazioni cromosomiche nelle leucemie sono geni che codificano per fattori di trascrizione, con l'eccezione di *bcr-abl*, che produce una proteina citoplasmatica con il dominio tirosina chinasi ABL costitutivamente attivo.

I fattori di trascrizione, la cui funzione è alterata dalla traslocazione, interferiscono con i circuiti che regolano la crescita, la sopravvivenza ed il differenziamento dei progenitori delle cellule del sangue. Un bersaglio di questa regolazione sembrano essere i geni omeotici (geni *HOX*), una vasta famiglia di geni che regolano lo sviluppo (v. OMEOTICI GENI**). Varie traslocazioni coinvolgono fattori trascrizionali con dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) come TAL1,

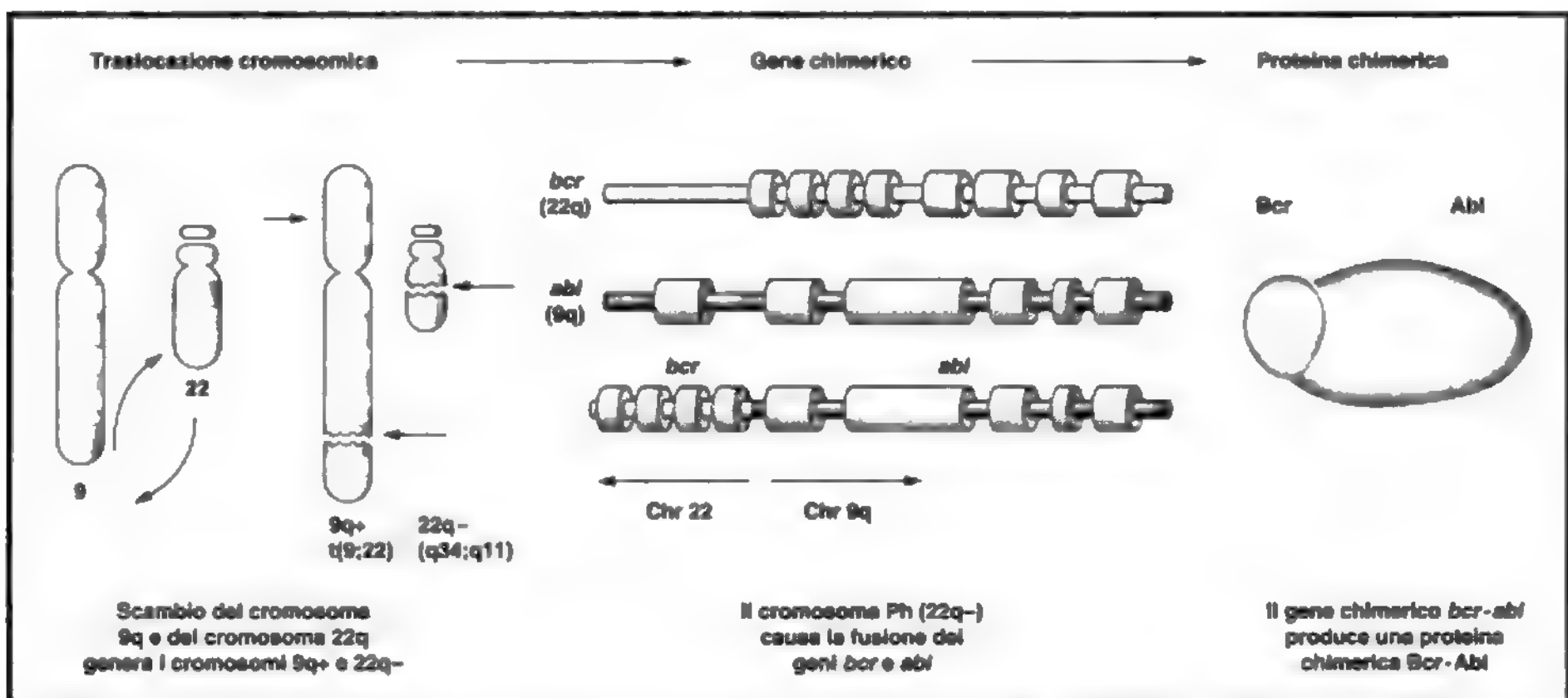


Fig. 4. La traslocazione del cromosoma Philadelphia [t(9;22) (q34;q11)], caratteristica della leucemia mieloide cronica (o CML), fonde le sequenze del protoncogene *abl* (una tirosina chinasi) e del gene *bcr* (di funzione ignota) causando la sintesi della proteina chimerica Bcr-Abl. (Da Bishop J. M. e Weinberg R. A., *Molecular Oncology*, 1996, per gentile concessione di Scientific American, New York).

MYC ed E2A. Il gene *E2A*, che produce una proteina essenziale per lo sviluppo dei linfociti B, è coinvolto in due traslocazioni: una porta alla fusione col fattore bZip Hlf e l'altra alla fusione con Pbx. Pbx è un cofattore che modula il legame al DNA delle omeoproteine, prodotte dai geni *HOX*. Alcune traslocazioni coinvolgono direttamente geni *HOX*. La traslocazione t(15;17), caratteristica della APL (leucemia promielocitica acuta), coinvolge la fusione tra i recettori dell'acido retinoico (RAR) e la proteina nucleare PML. Altre traslocazioni coinvolgono i geni *AML1*, sito in 21q22, e *TEL* in 12p13 o il gene del fattore di trascrizione *CBFβ*.

Prodotti di alcuni importanti oncogeni e loro relazione con il cancro

Riportiamo le proteine prodotte dai più importanti oncogeni nonché i loro rapporti con i geni di provenienza e le patologie oncologiche loro collegate.

1. Ras: piccola proteina del peso molecolare di 21kDa localizzata sulla membrana e che lega il GTP. Esistono tre geni *ras* (*H-ras*, *K-ras* e *N-ras*) codificanti proteine simili. Una proteina Ras è come un interruttore: acceso (cioè invia segnale) quando la proteina è legata al GTP, spento quando è legata al GDP. Ras invia un segnale sulla ser-thr chinasi Raf attivando la cascata delle MAP-chinasi, con varie conseguenze, principalmente quella di modificare l'espressione di geni nella cellula. I retrovirus che portano oncogeni virali *ras* causano sarcomi ed eritroleucemie in roditori. Mutazioni in uno dei geni *ras* si riscontrano nel 25% dei tumori umani; colpiscono particolari aminoacidi (ad es. 12, 61) ed alterano l'attività GTPasica della proteina. La proteina Ras oncogena ha una attività GTPasica inferiore a quella della proteina normale (non mutata) e quindi l'interruttore tende a rimanere acceso. L'attività dell'interruttore è regolata anche da altre proteine, come ad es. Ras-GAP (*GTPase Activating Protein*) e SOS, che favoriscono il legame al GTP o la sua dissociazione. La neurofibromina, prodotto del gene *NFI*, mutato nella neurofibromatosi di tipo I, è omologa a Ras-GAP ed ha attività simile, favorendo la dissociazione del GTP. *NFI* può inibire la crescita in alcuni tipi cellulari, frenando l'attività di Ras. Ras può funzionare solo se è legato alla membrana tramite una catena lipidica di 15 atomi di carbonio (gruppo farnesile) aggiunta alla proteina Ras dall'enzima farnesil-trasferasi.

2. Myc: regolatore dell'espressione genica, appartenente ad una famiglia di fattori con dominio bHLHZip (*basic helix-loop-helix zipper*); il dominio bHLH si riscontra in numerose proteine che regolano processi di sviluppo. Agisce in coppia col suo partner Max e può sia attivare che reprimere l'espressione di geni bersaglio, non ancora noti con precisione, quali la fosfatasi Cdc25 (un regolatore del ciclo cellulare), la ciclina E e la ciclina D. Contrasta l'azione dell'inibitore del ciclo cellulare p27 e riesce a stimolare il ciclo cellulare anche in presenza della forma attiva, non fosforilata, della proteina retinoblastoma. Il retrovirus contenente l'oncogene *myc* causa sarcoma, mielocitoma e carcinoma negli uccelli. Alterazioni nei geni *myc* (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*) si riscontrano in una varietà di tumori umani. In particolare, riarrangiamenti che coinvolgono *c-myc* sono tipici della leucemia delle cellule B e del linfoma di Burkitt (traslocazione Ig/Myc), mentre amplificazione genica di *N-myc* si riscontra nei neuroblastomi; attivazione di *myc* si ha anche nel carcinoma polmonare. Nella traslocazione Ig/Myc, il gene *myc* è permanentemente attivato dalla traslocazione e dà una stimolazione alla proliferazione di cellule che normalmente non proliferano.

3. Src: prodotto di un virus oncogeno, è un recettore di membrana privi di dominio tirosina chinasi. Il virus del sarcoma di

Rous è stato il primo virus oncogeno identificato e causa sarcomi in uccelli.

4. ErbB: proteina oncogena del retrovirus che causa eritroleucemia e fibrosarcoma nel pollo. Ha attività tirosina chinasi e corrisponde al recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGF). La proteina ErbB del retrovirus è un recettore mutato che invia segnali anche in assenza di fattori di crescita. Il gene (*v-ErbB*) è frequentemente soggetto ad amplificazioni e riarrangiamenti in una varietà di tumori. È il prototipo di una famiglia di recettori simili, chiamati ErbB o HER. La proteina HER2 (o ErbB2) è frequentemente iperprodotta nei tumori al seno.

È stato recentemente preparato un anticorpo (Herceptin*) che viene impiegato in quei tumori della mammella legati al gene *ErbB2* (o *HER2*), per neutralizzarne la proteina iperprodotta (*v. MAMMELLA***, col. **3536).

5. Abl: tirosina chinasi non recettoriale. Il virus causa leucemia a cellule pre-B nel topo; il dominio tirosino chinasi è necessario per la trasformazione. Il riarrangiamento cromosomico t(9;22), cromosoma Philadelphia, caratteristico della leucemia mieloide cronica coinvolge il gene *C-ABL* e causa la produzione di una proteina chimerica con attività alterata, risultante dalla fusione dei geni *BCR* e *ABL*.

6. Tall/Scf: fattore trascrizionale bHLH, regolatore dell'emopoiesi. Traslocazioni che lo coinvolgono si trovano in vari casi di leucemia linfoblastica acuta da cellule T (T-ALL).

7. E2A: fattore bHLH, regola lo sviluppo dei linfociti B e forse di altri tipi cellulari quali le cellule muscolari. Due diversi riarrangiamenti genici che coinvolgono E2A [t(1;19), t(17;19)] si trovano in casi di leucemia linfoblastica acuta e portano alla produzione di proteine chimeriche ad alterata attività: E2A-PBX1 e E2A-HLF.

8. Fos e Jun: fattori di trascrizione della famiglia bZip. I prodotti di questi due geni si associano a formare il complesso AP1, che regola l'espressione genica. I virus causano osteosarcomi e fibrosarcomi. Studi in topi mostrano che Jun è vitale per lo sviluppo del fegato, mentre Fos sembra più importante per il *lineage* osteoclasti macrofagi.

9. Bcl-2: regolatore negativo dell'apoptosi (*v.***). È una proteina citoplasmatica associata a membrane intracellulari che promuove la sopravvivenza cellulare di fronte a vari insulti citotossici. Il gene è attivato da traslocazioni (Ig/Bcl2) nel linfoma follicolare umano. Da solo, il gene *Bcl-2* ha un piccolo effetto stimolante sull'insorgenza di linfomi, ma insieme a *Myc* diventa un potente agente linfomagenico. *Myc* stimola l'apoptosi ed i linfociti che esprimono *Myc* in maniera inappropriata muoiono in condizioni di crescita subottimali; l'attivazione di *Bcl-2* impedisce la morte di cellule pre-cancerose, favorendo il loro sviluppo in senso maligno. L'accelerazione nell'insorgenza di tumori che si osserva in topi transgenici in cui sono attivi sia *Myc* che *Bcl*, viene attribuita all'accresciuta longevità dei linfociti, dovuta a *Bcl-2*, in condizioni di citochine limitanti. *Bcl-2* si associa a proteine come Bax e Bcl-x che ne modulano l'attività.

10. Met: recettore transmembrana per l'HGF (fattore di crescita epatocitico). Mutazioni ereditarie nel gene *met* si trovano nella sindrome HPRC (cancro renale papillare ereditario) (*v. RENE E BACINETTO***, tumori).

11. Ret: recettore per il GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*). Forme mutanti del gene *ret* conferiscono predisposizione ereditaria alle sindromi di neoplasia endocrina multipla chiamate MEN 2A e MEN 2B (MEN: *v. NEOPLASIE ENDOCRINE MULTIPLE***), caratterizzate dal tumore midollare della tiroide (*v.***) ed alle ghiandole surrenali. Le mutazioni nel gene *ret* che danno questa predisposizione producono l'attivazione costitutiva (cioè anche in assenza del GDNF) del dominio tirosina chinasi del recettore.

Implicazioni diagnostiche e farmacologiche

L'identificazione dei cambiamenti genetici che coinvolgono protooncogeni ed antioncogeni determinando la progressione cancerosa ha fornito una varietà di marcatori e di saggi molecolari utilizzabili per una diagnosi più precoce ed affidabile. Una accurata diagnosi molecolare può far cambiare l'approccio clinico e la gestione dei pazienti di cancro.

La ricerca sugli oncogeni ha inoltre individuato un gran numero di possibili bersagli di farmaci anticancro. Una prima linea d'attacco, risalente all'inizio degli anni '80, è diretta ai recettori di membrana per fattori di crescita. In alcuni cancri questi recettori sono prodotti in quantità eccessive o hanno mutazioni che ne causano l'iperattività. Vari ricercatori lavorano su anticorpi o su piccole molecole in grado di bloccare l'attività di questi recettori. Anticorpi contro il recettore HER2 (Herceptin®) sono provati in test clinici su larga scala per il trattamento del cancro della mammella, essendo il recettore iperespresso in circa il 30% dei casi. Anticorpi e farmaci inibitori dell'attività tirosina chinasi dei recettori vengono esaminati in una varietà di cancri. Inibitori del recettore PDGF potrebbero essere efficaci nel trattamento del glioblastoma. Si cerca di sviluppare un inibitore della tirosina chinasi Abl, attivata in vari tipi di leucemia. Altri farmaci cercano di bloccare prodotti di oncogeni che trasmettono segnali di crescita all'interno delle cellule, come per esempio la proteina Ras. Per bloccare l'attività di Ras sono stati sviluppati farmaci che inibiscono la farnesil trasferasi, l'enzima che aggiunge una catena lipidica a Ras, necessaria per il suo aggancio alla membrana plasmatica e per la sua funzionalità. Questi farmaci sembrano avere bassa tossicità e sono usati in *trials* clinici.

Altre ricerche sono dirette a ripristinare l'attività di antioncogeni, sviluppando farmaci che colpiscono i bersagli dell'attività di questi geni, ad es. le proteine CDK che fanno da propulsori della proliferazione cellulare.

Un'altra promettente strategia è volta a contrastare mutazioni di oncogeni (*bcl-2*) o di geni soppressori tumorali (*p53*) che indeboliscono la capacità delle cellule di iniziare l'apoptosi, o morte cellulare programmata, che serve a rimuovere cellule precancerose. Si spera che le nuove terapie siano più specifiche degli attuali farmaci chemioterapici e quindi uccidano le cellule cancerose più efficacemente, con minori danni per le cellule normali.

Le lesioni premaligne sono caratterizzate da alterazioni del processo differenziativo ed è possibile contrastare questo differenziamento anormale utilizzando agenti ormonesimili non citotossici. Alcuni di questi agenti, come il tamoxifene (che agisce sul recettore degli estrogeni) e l'acido retinoico (che agisce sul recettore per i retinoidi) sono utilizzati nella prevenzione dello sviluppo del cancro (per es. il cancro al seno), particolarmente nei pazienti cui è stato rimosso un tumore primario e presentano un alto rischio di sviluppare un tumore secondario. Altri farmaci, come gli inibitori degli enzimi ciclossigenasi (coinvolti nella formazione di prostaglandine ed iperespressi nella formazione di cancri al colon) sono utilizzabili nella prevenzione di tumori intestinali.

Bibliografia

- Alberts B., *Molecular Biology of Cell*, 1994, 3ª ediz., Garland, New York-London.
 Bishop J. M., Weinberg R. A., *Molecular Oncology*, 1996, Scientific American, New York.
 Cancer: the rise of the genetic paradigm, *Genes and Development*, vol. 9, 1995, 1309-1313.
 Frontiers in Cancer Research, *Science*, 1997, 278, 995-1077.
 Oncogenes: twenty years later, *Genes and Development*, vol. 9, 1995, 1289-1301.
 Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins, *Science*, 1997, 278, 2075-2080.

The molecular genetics of Cancer, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1994).

SERGIO NASI

OPISTORCHIASI

1. opisthorchiasis.

SOMMARIO

Definizione (col. 4202). - **Etiologia e ciclo biologico** (col. 4202). - **Epidemiologia** (col. 4203). - **Patologia** (col. 4204). - **Sintomatologia** (col. 4204). - **Diagnosi** (col. 4205). - **Prognosi** (col. 4207). - **Terapia e profilassi** (col. 4207). - **Opisthorchiasis e clonorchiasis a confronto** (col. 4207).

Definizione

L'opisthorchiasis è una distomatosi (v.) epatica causata dai Trematodi digenei (Platelminti) *Opisthorchis felinus* e *O. viverrini* (ordine *Prostomatoda*, subordine *Paramphistomata*), i quali, oltre ad essere parassiti abituali di gatti, cani e di numerosi altri mammiferi ittiofagi, occasionalmente possono colonizzare anche l'uomo; si localizzano nei dotti biliari distali (più raramente nei prossimali, nella cistifellea e nei dotti pancreatici) ove, in relazione al numero dei parassiti presenti, possono causare lesioni tessutali anche gravi a carico del sistema biliare e del parenchima epatico (v. OPISTORCHIS GENERE).

Etiologia e ciclo biologico

I vermi adulti delle 2 specie menzionate sono organismi ermafroditi di dimensioni relativamente contenute (7-12 x 2-3 mm), e appaiono difficilmente distinguibili su base morfologica. Hanno un corpo assai appiattito e trasparente, di forma lanceolata con estremità arrotondate che assume un colore grigio-rossastro anche a causa della bile. Delle due ventose presenti (entrambe di circa 0,25 mm), quella orale è subterminale mentre quella ventrale è posta al limite del primo quinto anteriore del corpo. Possiedono 2 testicoli lobati localizzati posteriormente, un ovaio globoso e un utero molto circonvoluto che si orienta in avanti aprendosi in prossimità della ventosa ventrale; i vitellogeni si distendono longitudinalmente e in posizione laterale nel terzo medio del corpo (fig. 1). Vivono adesi con le ventose

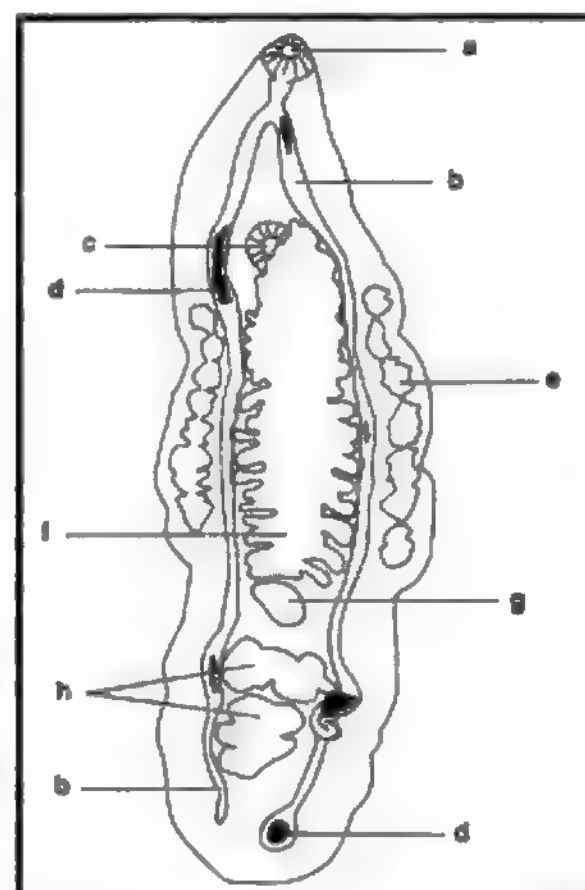


Fig. 1. Adulto di *Opisthorchis felinus*: a) ventosa orale; b) cieco intestinale; c) ventosa ventrale; d) contenuto intestinale; e) vitellogeni; f) utero; g) ovaio; h) testicoli.

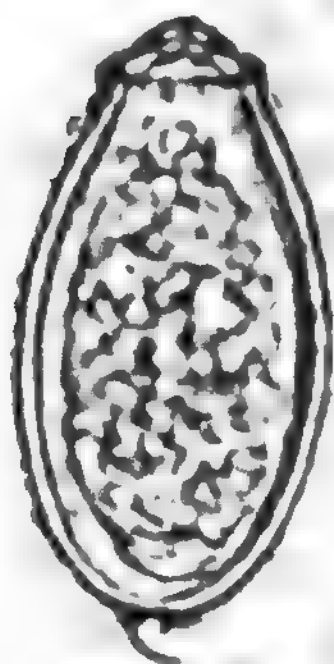


Fig. 2. Uovo di *Cloacorchis sinensis* con all'interno il miracidio (1400 $\times$), praticamente indistinguibile dalle uova dei trematodi del genere *Opisthorchis*.

alle pareti dei dotti biliari distali e producono uova che raggiungono l'intestino con la bile e l'ambiente esterno con le feci dell'ospite. Tali uova (30 $\times$ 12 μ m) sono ovoidali, di colore giallastro ed opercolate, evidenziano un piccolo tubercolo nel polo opposto all'opercolo e, quando eliminate, contengono già un miracidio completamente formato (fig. 2).

Perché il ciclo si possa compiere (fig. 3), le uova devono pervenire in acque dolci ed essere ingerite dal primo ospite intermedio, rappresentato da lumache acquatiche del genere *Bithynia* (*Bulimus*); in tal caso, dopo la liberazione dei miracidi, prevalentemente nell'epato-pancreas del mollusco, si ha la maturazione in successione di sporocisti e di redie con produzione di numerosissime cercarie. Queste ultime forme larvali misurano circa 600 μ m, presentano un paio di macchie oculari e hanno la coda carenata; abbandonano la lumaca in 6-8 settimane e, giunte nell'acqua, nuotano attivamente alla ricerca del secondo ospite intermedio, rappresentato dalle più diverse specie di pesci della famiglia *Cyprinidae* (prevalentemente tinche, carpe, ghiozzi, etc.); superata la barriera delle squame, penetrano attivamente attraverso il tegumento, migrano, poi, nella muscolatura dei pesci e, in circa 6 settimane, si incistano trasformandosi in metacercarie. Se il pesce parassitato viene ingerito crudo o malcotto dagli ospiti definitivi, uomo compreso, in seguito al processo digestivo, nel tratto duodenale o nel digiuno, si attivano e si liberano vermi immaturi; questi risalgono controcorrente il dotto coledoco e, raggiunte le diramazioni intraepatiche delle vie biliari, in circa 4 settimane, completano la maturazione in forme adulte. Sono organismi assai longevi in grado di vivere anche 10-15 anni.

Epidemiologia

La diffusione dell'o. nell'uomo è strettamente correlata all'abitudine alimentare, relativamente frequente in diverse popolazioni della Russia e del Sud-est asiatico, di consumare pesce d'acqua dolce crudo o malcotto. In particolare, *O. felineus* risulta endemico in vaste aree delle regioni dei laghi e lungo i corsi d'acqua della Russia e dell'Europa centro-orientale, nel Sud-est asiatico ed in India; ove, complessivamente si stima siano colpiti 1-2 milioni di persone, mentre *O. viverrini* è diffuso prevalentemente in Vietnam, Laos e Thailandia, ove i soggetti colpiti risultano più di 7 milioni. Per entrambi i parassiti, la prevalenza varia notevolmente nelle diverse popolazioni, ma in tutti i casi può essere tanto elevata da raggiungere e talora superare anche il 50-60%. Le infestazioni più gravi si riscontrano in persone di oltre 40 anni,

anche in relazione alla possibilità di reinfestazioni dovute al mancato instaurarsi di un quadro di immunità nei confronti di parassiti particolarmente longevi.

Patologia

Il danno è strettamente correlato al numero dei parassiti presenti e alla durata dell'infestazione; alcune decine di vermi sono, infatti, relativamente ben tollerati ed è questo ciò che si verifica nella maggior parte delle infestazioni, mentre la presenza di centinaia o migliaia di esemplari causa danni di notevole entità, talora incompatibili con la vita (circa il 16% delle infestazioni gravi).

Nei casi più gravi, in relazione all'azione meccanico-irritativa provocata dal movimento dei parassiti e dalla loro adesione alle pareti mediante le ventose, i dotti biliari evidenziano desquamazione e iperplasia dell'epitelio con inspessimento della parete, mentre per l'azione meccanica legata all'ammassamento dei vermi adulti, si può verificare ostruzione dei dotti con conseguente stasi biliare. L'intensa azione infiammatoria, sempre presente, causa, invece, colangite diffusa con infiltrazione perivasale caratterizzata dalla presenza di molti eosinofili e, spesso, necrosi ed atrofia delle cellule epatiche. Gradualmente nel tempo, si può avere fibrosi dei vasi biliari distali, estesa eventualmente ai dotti prossimali e alla cistifellea, e iperplasia del tessuto connettivo periportale, causa di fibrosi dell'organo. In tale contesto assai intensa risulta l'azione tossica esercitata dai parassiti presenti, legata in particolare all'accumulo dei cataboliti da questi secreti o escreti.

Prevalentemente nella fase cronica dell'infestazione, la presenza dei trematodi all'interno dei dotti biliari può provocare la dilatazione della loro porzione intraepatica e stimolare una proliferazione tissutale di tipo adenomatoso e papillomatoso, con lo sviluppo di formazioni sacciformi che possono anche evolvere in vere e proprie cisti. Non raro, in questi casi, l'instaurarsi di infezione batterica secondaria con eventuale formazione di ascessi.

In relazione al quadro di iperplasia che si determina a carico dell'epitelio dei dotti biliari, sembra esserci, infine, una certa correlazione tra la presenza dei parassiti e l'insorgere di neoplasie epatiche e biliari (adenocarcinomi).

Sintomatologia

In relazione al grado di infestazione, per lo più blando, la maggior parte delle infestazioni decorre in modo paucisintomatico o del tutto asintomatico e la presenza dei parassiti si rileva, in genere, solo in seguito ad esami coprologici di routine.

Nel caso di infestazioni con poche centinaia di vermi (media gravità), dopo un periodo iniziale di 2-3 settimane privo di sintomi, durante il quale si ha la maturazione dei vermi adulti, possono insorgere vaghe turbe gastroenteriche, dolenzia nell'ipocondrio destro con eventuale propagazione del malessere nella regione epigastrica e costale, febbricole, e talora quadri di tipo allergico (orticaria, edemi, crisi asmatiche) accompagnati da eosinofilia anche elevata (sino al 70-80%); tali sintomi si manifestano, in genere, nel pomeriggio inoltrato e permangono per 1-2 ore, manifestandosi per qualche giorno o qualche settimana ma ripresentandosi eventualmente a distanza di mesi o anche di anni, a causa della longevità dei parassiti.

Nelle infestazioni più gravi (diverse centinaia di vermi), con il trascorrere del tempo, i sintomi descritti divengono persistenti e a questi, talora, a causa dell'azione tossica, si possono associare edema facciale, linfadenopatia ed eventualmente mialgie ed artralgie. Per l'interessamento epato-biliare si possono avere attacchi di colangite con febbre elevata, coliche biliari, ed eventualmente crisi di ittero di tipo ostruttivo a cui possono associarsi dispepsia, anoressia e diarrea, accompagnate da perdita di peso, e talora, da anemia. L'eventuale presenza di trematodi nella cistifellea e nel pancreas causa disturbi digestivi di entità variabile ed infiammazione anche grave dei distretti colpiti.

Nella minoranza dei casi relativi a pazienti infestati massivamente (con migliaia di vermi) si può, invece, manife-

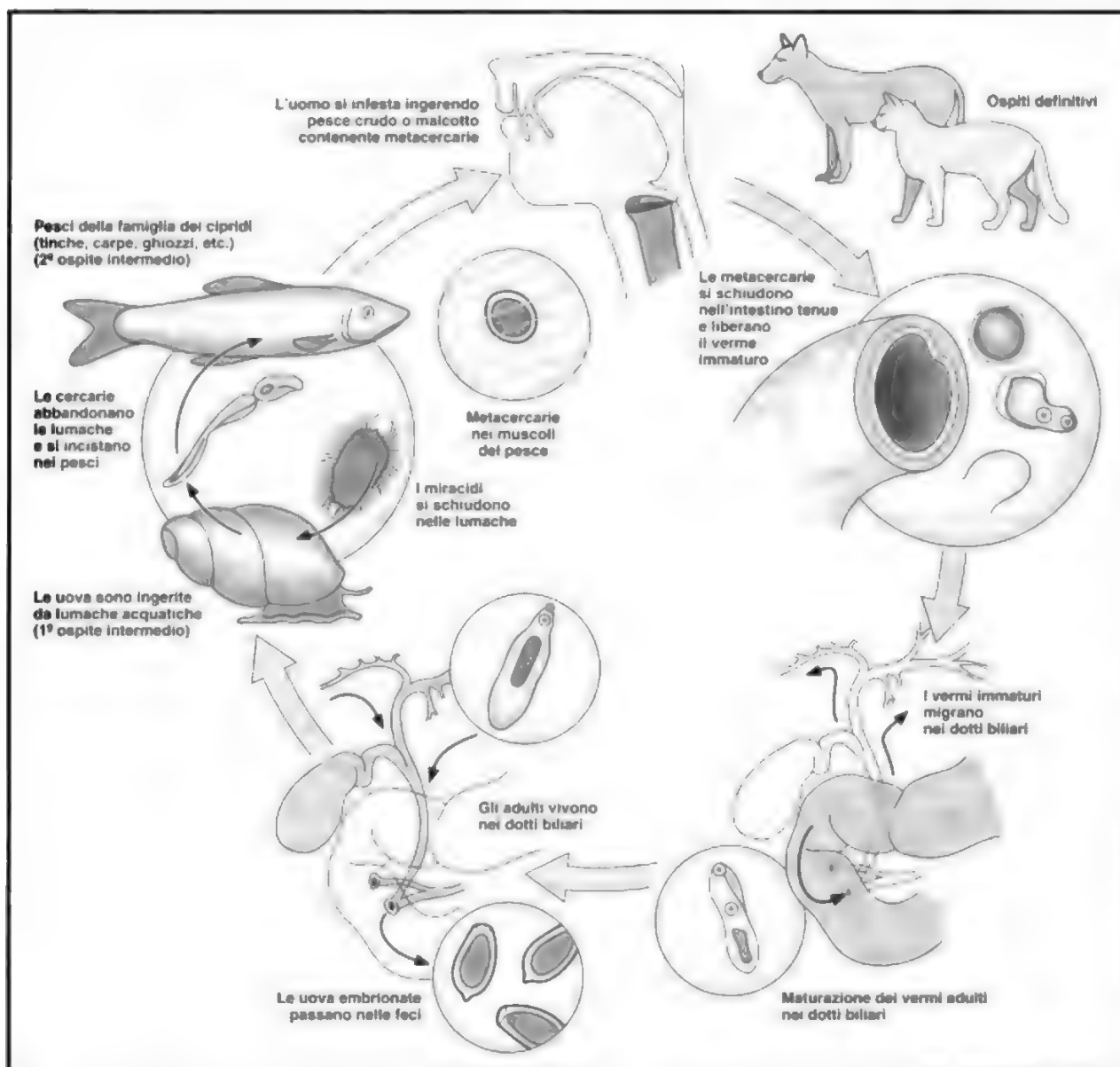


Fig. 3. Ciclo biologico di trematodi del genere *Opisthorchis* e di *Clonorchis sinensis*. (Da Despommier et al., 1995, ridisegnata e modificata).

stare epatite, epatomegalia con dolori intensi all'ipocondrio destro, congestione passiva della milza, ingrossamento della vescica biliare, colangiti e pancreatiti recidivanti che possono anche essere fatali, mentre, a distanza di anni dall'infestazione, relativamente frequenti risultano i quadri di ittero, ipertensione portale ed ascite legate all'instaurarsi rispettivamente di cirrosi biliare ed epatica.

Sebbene la presenza dei parassiti non sia in grado di indurre un quadro di immunità nel soggetto colpito, si ha una risposta immune sia cellulare che umorale con produzione di anticorpi riscontrabili sia nel siero che nella bile; tra questi, le IgE presentano un titolo particolarmente elevato.

Diagnosi

Il sospetto di o. andrebbe sempre posto nei pazienti affetti da disturbi di tipo angiolitico e con manifesta eosinofilia

che abbiano soggiornato per periodi più o meno lunghi nelle diverse aree endemiche.

La diagnosi si basa sostanzialmente sull'identificazione delle uova dei parassiti, eventualmente presenti nelle feci, sia dopo esame diretto che dopo arricchimento dei campioni, tenendo però presente che esse sono molto simili in forma e dimensione alle uova dei trematodi intestinali *Heterophyes heterophyes* e *Metagonimus yokogawai*.

Le uova possono occasionalmente essere riscontrate anche nel materiale biliare prelevato in seguito a sondaggio duodenale; tuttavia va considerato che tale intervento non è necessario ai fini di una diagnosi differenziale, essendo dirimente, in questi casi, il quadro clinico che si manifesta nel soggetto colpito. Risultano, inoltre, solo leggermente più piccole delle uova di *Clonorchis sinensis* (fig. 2), altro trematode parassita del fegato dell'uomo (vedi oltre), per

OPISTORCHIASI

cui in questo caso la differenziazione, assai difficile, si rende possibile solo dopo attenta misurazione di un numero elevato di campioni.

L'utilizzo di metodi immunodiagnostici (ELISA, EAI, FC, ID, IEF), poco indicato in relazione ai costi e alla possibilità di ricerca diretta delle uova, può essere attuato in caso di persistente negatività degli esami coprologici, tenendo però conto dell'elevata possibilità di cross-reazione in soggetti affetti da altre elmintiasi, dovuta alla mancata disponibilità, sino ad ora, di antigeni adeguatamente specifici.

Prognosi

La prognosi dipende ovviamente dalla gravità dell'infestazione: risulta buona nella maggior parte dei casi, riservata nei pazienti in cui si instaura lesione epatiche, mentre può essere infausta nei casi con più esteso coinvolgimento del sistema biliare e del parenchima epatico.

Terapia e profilassi

Il *praziquantel* (v.*) risulta il farmaco d'elezione: somministrato in tre dosi di 25 mg/kg assunte nell'arco della giornata dopo i pasti principali e per 2 giorni, dimostra un'efficacia elevata, prossima al 100%. In seguito al trattamento, in circa una settimana, si ha arresto dell'eliminazione di uova accompagnata dall'espulsione dei vermi, per lo più morti, che evidenziano danni strutturali a carico del tegumento. Le condizioni dei pazienti trattati migliorano gradualmente in poche settimane mentre il ritorno alla completa normalità, riscontrabile anche con tecniche strumentali d'immagine (ecografia, etc.), viene raggiunto in qualche mese. Nel trattamento si possono manifestare effetti collaterali di blanda intensità quali, senso di vertigine, emicrania, mialgie, nausea, vomito e diarrea.

Farmaco alternativo può essere considerato il *mebendazolo*, dimostratosi efficace nell'89% e nel 94% dei casi trattati, rispettivamente per 20 e 30 giorni, con dosi giornaliere di 30 mg/kg.

Un appropriato trattamento antibiotico dovrebbe essere, infine, effettuato in tutti i pazienti in cui la presenza dei parassiti abbia causato colangite, colecistite ed eventualmente setticemia.

La *prevenzione* si basa sostanzialmente nell'evitare di mangiare pesce crudo o malcotto, tenendo conto del fatto che le metacercarie rimangono vitali anche dopo congelamento, salatura o trattamento con aceto del prodotto pescato; tale norma deve essere portata a conoscenza di chiunque debba soggiornare nelle aree endemiche, essendo, come detto, molto diffuso in tali zone l'utilizzo di pesce non adeguatamente cucinato. Difficile risulta, invece, l'eradicazione della parassitosi dal territorio a causa delle difficoltà legate alla eliminazione degli ospiti intermedi e alla sempre possibile contaminazione delle acque con uova del parassita, in seguito alla fecalizzazione dell'ambiente operata dai numerosi possibili ospiti definitivi abituali.

Opisthorchiasi e clonorchiasi a confronto

Un quadro clinico del tutto identico a quello riscontrabile nel corso di o. si può manifestare nell'uomo anche in seguito ad infestazioni provocate da *Clonorchis sinensis*, altro trematode digenico parassita dei dotti biliari e pancreatici, responsabile dell'insorgere della forma di distomatosi epatica (v. *Clonorchis sinensis*) (v. CLONORCHIS GENERE; DISTOMATOSI).

Sia i vermi adulti che le varie forme larvali sono molto simili a quelle delle specie appartenenti al genere *Opisthorchis*; gli adulti, in particolare, differiscono soltanto per es-

sere leggermente più grandi (1-2,5 cm × 2,5-5 mm) e per avere i 2 testicoli ramificati e non lobati. Anche il ciclo di vita non presenta sostanziali differenze, tenendo, però, conto che possono fungere da primo ospite intermedio anche lumache dei generi *Parafossarulus*, *Semisulcospira*, *Melanoides* e *Alocinma* e da secondo ospite intermedio anche pesci delle famiglie *Salmonidae* e *Anabantidae*.

C. sinensis è diffuso in vaste aree dell'Estremo oriente e si riscontra soprattutto in Cina, ove si stima siano colpiti oltre 20 milioni di persone, in Corea (4,5 milioni), a Taiwan, nel Vietnam e in Giappone. Anche in questo caso numerose sono le specie di mammiferi che, come ospiti definitivi di riserva, contribuiscono alla diffusione del parassita in natura.

La patologia è del tutto simile a quella che si riscontra in corso di o., tanto che, come detto, sul piano clinico, è impossibile differenziare i due tipi di infestazione.

La terapia, infine, viene attuata facendo uso, anche in questi casi, del praziquantel, alle stesse dosi risultate efficaci nel trattamento dell'o.

Bibliografia

- Beaver P. C., Jung R. C., Cupp E. W., *Clinical Parasitology*, 1984, 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
Bunnag D., Harinasuta T., *Opisthorchiasis, Clonorchiasis and Paragonimiasis*, in: Warren K. S., Mahmoud A. A. F., *Tropical and geographical medicine*, 1984, pp. 461-470, McGraw-Hill, New York, USA.
Despommier D. D., Gwadz R. W., Hotez P. J., *Parasitic Diseases*, 3th ed., 1995, Springer-Verlag, New York, London.
Esposito R., *Parassitologia Clinica e Medicina Tropicale*, 1985, Masson, Milano.
Harinasuta T., Pungpak S., Keystone J. S., *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 1993, 7, 699-716.
Hillyer G. V., *Fascioliasis, Paragonimiasis, Clonorchiasis and Opisthorchiasis*, in: Walls K. W., Schantz P. M., *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*, vol. I, *Helminthic Diseases*, 1986, Academic Press, London, pp. 50-59.

GIANFRANCO BORTOLETTI

OPPORTUNISTICHE INFEZIONI

F. *infections opportunistes*. - 1. *opportunistic infections*. - 1. *Opportunistische Infektionen*. - S. *infecciones oportunistas*.

SOMMARIO

Premessa (col. 4208). - Generalità (col. 4209). - Diagnosi microbiologica (col. 4211). - Principali deficit immunitari congeniti (col. 4211). - Infezioni nei pazienti oncologici (col. 4213). - Infezioni nei pazienti leucemici (col. 4213). - Infezioni in corso di trapianto (col. 4214): Trapianto di midollo osseo. - Trapianto cardiaco. - Trapianto polmonare. - Trapianto renale. - Trapianto epatico.

Premessa

Le conoscenze scientifiche sui deficit immunitari primitivi (v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]), la diffusione in tutto il mondo del virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), l'uso in oncologia clinica di chemioterapie molto aggressive responsabili di depressione midollare, così come il progressivo sviluppo della trapiantologia d'organo hanno aperto, in questi ultimi decenni, un nuovo capitolo di estremo interesse scientifico, che tratta delle sindromi infettive che occorrono in presenza di compromissione del sistema immunitario.

L'approfondimento e il miglioramento delle conoscenze mediche in questo settore passa attraverso discipline diverse, come l'infettivologia e l'immunologia, che ne rappresentano il maggior supporto culturale.

Allorché il sistema immunitario risulti gravemente compromesso, possono verificarsi soprattutto infezioni da germi cosiddetti opportunisti, che nei soggetti immunocompetenti

sono generalmente asintomatiche, ma che in corso di immunodepressione più o meno severa sono responsabili di forme cliniche gravi, anche mortali.

Per la trattazione delle infezioni opportunistiche che insorgono in corso della sindrome da immunodeficienza acquisita si rimanda alla specifica voce del I e di questo Aggiornamento.

In questo articolo verranno illustrate prevalentemente le infezioni opportunistiche che si verificano in corso di altre condizioni di immunodeficienza.

Generalità

Nell'individuo normale, immunocompetente, la patologia infettiva è il risultato di un'interazione tra soggetto e agente infettante e dipende prevalentemente da variabili relative al microrganismo, come patogenicità, virulenza, carica infettante, invasività, etc.

Nelle infezioni opportunistiche il meccanismo patogenetico fondamentale è rappresentato dalla compromissione dei meccanismi di difesa dell'ospite, favorente microrganismi abitualmente commensali.

I germi opportunisti possono essere di origine endogena o esogena (ambientale). I microrganismi esogeni penetrano nell'organismo ospite attraverso vie di trasmissione naturale (aerea, oro-digestiva, contatto diretto) o artificiale (iatrogena). Il loro impianto e moltiplicazione può essere imputato sia alla fragilità o assenza dei meccanismi deputati alla loro eliminazione meccanica che alla diminuzione dell'effetto barriera, esercitato dalla flora normale.

Un fattore importante nel fenomeno della colonizzazione è rappresentato dalla caratteristica di adesività dei microrganismi; questi ultimi infatti presentano strutture deputate al riconoscimento di recettori specifici, presenti sulla membrana delle cellule dei tessuti bersaglio. L'esistenza o l'assenza dei recettori in funzione della specie microbica, del tessuto e degli individui spiegano la relativa specificità per diversi organi e tessuti dei diversi microrganismi, ad es. di *Streptococcus mitis* quale colonizzatore essenzialmente del cavo orale, o di *Neisseria gonorrhoeae* come ospite esclusivo dell'uomo (Grieco, 1992). È evidente però che, perché un agente patogeno possa penetrare nelle cellule, moltiplicarsi e secernere tossine o altri prodotti tossici, è indispensabile un'alterazione dei meccanismi di difesa più sofisticati, come quelli umorali e cellulari, specifici e non (Tramont e Hoover, 1995). Tale distinzione può apparire però arbitraria, tenendo conto che i meccanismi interagiscono in modo continuo e integrato nella maggior parte dei casi (tab. I).

TAB. I. MECCANISMI DI DIFESA DELL'ORGANISMO

	Non specifici	Specifici
Barriera anatomico-funzionale	barriera meccanica, secretoria, epitelio ciliato	immunoglobuline (IgA)
Difese umorali	complemento lisozima interferoni fibronectina proteina C reattiva	immunoglobuline
Difese cellulari	monociti/macrofagi granulociti neutrofili granulociti eosinofili cellule <i>natural killer</i>	linfociti T linfociti B (cellule presentanti l'antigene)

TAB. II. CARATTERISTICHE DELLE INFEZIONI ASSOCIATE AI PRINCIPALI DEFICIT GRANULOCITARI

Anomalia	Microrganismi in causa	Localizzazioni più frequenti
Neutropenia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Apparato respiratorio, cute, apparato digerente
Chemiotassi	Stafilococchi, <i>Enterobacteriaceae</i>	Cute, apparato respiratorio
Opsonizzazione e fagocitosi	<i>Enterobacteriaceae</i> , Pneumococchi, Stafilococchi	Cute, apparato respiratorio, mucosa orale, sepsi, S.N.C.
Killing	Stafilococchi, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp.	Cute, apparato respiratorio, sistema reticoloendoteliale, ascessi profondi a varie localizzazioni

Sebbene tutti i fattori implicati nel corso delle reazioni di difesa antinfettiva siano importanti, particolare menzione meritano: la *risposta umorale specifica*, la *difesa cellulare* e la *risposta cellulo-mediata*.

Risposta umorale specifica. - Il ruolo degli anticorpi, sintetizzati a livello degli organi linfatici, milza e fegato e secreti nel sangue circolante, è attestato dalla frequenza e gravità delle infezioni in pazienti con deficit dell'immunità umorale. La loro funzione si esplica attraverso diversi meccanismi: agglutinazione batterica; fenomeno di neutralizzazione; lisi degli agenti patogeni; citotossicità dipendente dagli anticorpi (ADCC).

Meccanismi di difesa cellulare. - Va sottolineato il ruolo svolto dai fagociti/mononucleati, che attraverso fenomeni come la fagocitosi e il *killing* provvedono alla eliminazione di patogeni intracellulari come *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e alcuni funghi. Una seconda popolazione cellulare dotata di importante attività fagocitaria è rappresentata dai granulociti neutrofili o polimorfonucleati neutrofili (PMN).

L'efficienza di questo sistema di difesa antinfettiva è legato prevalentemente alla quantità di cellule impegnate in questa attività, che in corso di infezioni acute si mobilitano dal compartimento circolante, midollare e integrato (milza e pareti endoteliali). Mediante fenomeni di chemiotassi, fagocitosi e *killing*, i PMN provvedono alla eliminazione soprattutto di batteri e funghi. Le alterazioni quantitative e/o qualitative dei PMN, congenite o acquisite, determinano infezioni in vari organi o apparati (tab. II).

Mediatori cellulari della risposta cellulo-mediata. - Essi sono rappresentati dai linfociti T e svolgono un ruolo fondamentale nella resistenza a patogeni intracellulari obbligati, lisando le cellule infette o producendo sostanze citotossiche. La presenza di un infiltrato sul sito dell'infezione, ricco di cellule mononucleate (prevalentemente linfociti T e cellule monocito/macrofagiche), riflette l'esistenza di una risposta immunitaria prevalentemente cellulare.

La tab. III riporta i microrganismi più frequentemente responsabili delle infezioni opportunistiche nei pazienti immunocompromessi, in rapporto al tipo di deficit immunitario.

OPPORTUNISTICHE INFEZIONI

TAB. III. INFEZIONI OPPORTUNISTICHE NELL'IMMUNOCOMPROMESSO

Deficit immunitario	Agenti etiologici più frequenti
Difese della barriera anatomico-funzionale	Stafilococchi <i>Pseudomonas</i> Streptococchi
Complemento	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Anticorpi	Stafilococchi Streptococchi Enterobatteri
Linfociti T	Virus Varicella-Zoster Cytomegalovirus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Listeria</i> , <i>Legionella</i> <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> <i>Pneumocystis carinii</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Strongyloides</i>

Diagnosi microbiologica

La diagnosi microbiologica di un'infezione in un paziente immunodepresso pone spesso enormi problemi di gestione clinica. La gravità dell'infezione relativa allo stato di immunodepressione, la difficoltà nell'isolamento dell'agente etiologico e la sensibilità dei microrganismi agli agenti antinfettivi condizionano spesso un decorso clinico complesso.

Una *diagnosi microbiologica di presunzione* è indispensabile allorché non sia possibile isolare l'agente etiologico (*diagnosi di certezza*). L'epidemiologia relativa al tipo di patologia di base, il deficit immunitario e i dati microbiologici ottenuti dai siti colonizzati rappresentano le linee direttive da seguire nell'approccio terapeutico.

Nella *diagnosi microbiologica di certezza*, il valore dell'identificazione del microrganismo opportunistica dipende essenzialmente dal sito del prelievo. L'isolamento da siti non generalmente colonizzati da flora microbica, come il sangue, il liquido cefalorachidiano, il liquido pleurico e i tessuti prelevati in corso di biopsia hanno un grande valore diagnostico (Young, 1994). Per siti normalmente colonizzati da flora microbica abituale (cutanea, orofaringea, intestinale e vaginale) o occasionale (albero tracheobronchiale e cateteri venosi centrali) la diagnosi di certezza può essere ottenuta solo se i dati microbiologici e clinici sono rigorosamente confrontabili.

Principali deficit immunitari congeniti

La tab. IV riporta la classificazione delle sindromi da immunodeficienza primitiva congenita (v. IMMUNODEFICIENZE [v.; v.*; v.**]).

Nel paziente immunodepresso per deficit congenito, tutte le infezioni hanno in comune la gravità, la resistenza alle terapie antinfettive abituali e la tendenza a recidivare, rappresentando inoltre la principale causa di morte. Sul piano clinico, a deficit dell'immunità umorale, si osserva una spiccata suscettibilità alle infezioni batteriche, specie a carico del tratto respiratorio e gastrointestinale, mentre in corso di deficit dell'immunità cellulare si osservano frequenti infezioni virali, micotiche e da micobatteri.

TAB. IV. CLASSIFICAZIONE DELLE SINDROMI DA IMMUNODEFICIENZA PRIMITIVA CONGENITA

(da Brostoff J. et al., *Immunologie clinique*, 1993, De Boeck Université)

Deficit dell'immunità specifica

Sindromi da deficit di anticorpi
Deficit selettivo di immunoglobuline
Deficit selettivo dell'immunità cellulare
Immunodeficienze combinate

Deficit dei meccanismi effettori non specifici

Deficit del complemento
Deficit dei neutrofili

TAB. V. PRINCIPALI DEFICIT IMMUNITARI E TIPO DI PATOLOGIA INFETTIVA PREVALENTE

Deficit immunitario	Età di insorgenza	Tipo di infezione
Severe Combined Immune Deficiency (SCID)	primi 6 mesi di vita	Infezioni da funghi, batteri, virus, ad evoluzione fatale
Malattia di Bruton Sindrome di Nezeloff	primi 2 anni precoci	Infezioni polmonari, urinarie e cutanee, candidosi cutanea grave, varicella disseminata
Sindrome di DiGeorge	precoci	Infezioni gravi o moderate del tratto respiratorio
Deficit di IgA selettivo Immunodeficienza Comune Variabile (CVI) IperIgM	precoci adulti	Infezioni senopolmonari ricorrenti
Atassia teleangiectasia	precoci	Infezioni senopolmonari ricorrenti
"	precoci (1 anno)	Otite media, polmoniti, meningiti
Sindrome di Wiskott-Aldrich	tardiva	Polmonite da <i>P. carinii</i> , herpesvirus ad evoluzione fatale
Candidosi mucocutanea cronica		Infezione da <i>Candida albicans</i> ; infezioni da <i>S. aureus</i>
Sindrome da iperIgE		<i>Haemophilus influenzae</i> , pneumococchi, Gramnegativi, <i>Candida albicans</i>
Deficit di nucleoside fosforilasi	precoci	Varicella generalizzata
Deficit del complemento		Infezioni da <i>Neisseria</i>
Neutropenia		Infezioni multiple moderate e gravi
Disfunzioni dei polimorfonucleati	precoci	Infezioni fungine e piogene
Deficit di mieloperoxidasi	tardiva	Infezioni rare (<i>Candida albicans</i>)
Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)	precoci	Infezioni da piogeni e funghi, da moderate a gravi

La tab. V riporta le principali forme cliniche di deficit immunitario primitivo, l'età di insorgenza e gli agenti etiologici responsabili delle complicanze infettive.

Infezioni nei pazienti oncologici

Nei pazienti oncologici, l'infezione è espressione dello stato di immunodepressione che, a sua volta, è legato, in modo variabile nel tempo, a differenti fattori: tipo di tumore e suo stadio evolutivo, conseguenze del trattamento chemioterapico e immunosoppressivo, uso estensivo di cateteri venosi centrali (CVC) e di antibiotici a largo spettro, chirurgia demolitiva, radioterapia.

Differenti tipi di patologia oncologica possono condurre preferenzialmente a specifiche infezioni. L'aplasia midollare post-chemioterapica e l'insufficienza midollare secondaria a metastasi ossee si complicano con infezioni batteriche e micotiche, per deficit di polinucleati. Le sindromi linfoblastiche e le metastasi ossee responsabili di deficit della funzione linfocitaria T aumentano la sensibilità alle infezioni da patogeni intracellulari, miceti, parassiti e virus. Il linfoma maligno, il mieloma e la leucemia linfatica cronica, infine, predispongono ad infezioni da batteri capsulati, per inibizione prevalente dell'immunità umorale.

Particolarmente frequenti nei pazienti oncologici sono le infezioni sistemiche da stafilococchi e da enterobatteri, con letalità dell'ordine del 10-20%. Infezioni da gramnegativi (*Pseudomonas aeruginosa*), anche se descritte in questi ultimi anni con frequenza relativamente più bassa, mantengono una mortalità più elevata, anche fino al 45% (Pizzo, 1993). Infezioni da *Listeria monocytogenes*, *Legionella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia*, più rare, si osservano prevalentemente in occasione di turbe profonde dell'immunità cellulare.

L'uso di farmaci antimicotici, pur determinando una diminuzione della frequenza delle candidosi superficiali, favorisce la comparsa di infezioni viscerali profonde, gravate da un'elevata mortalità (60-80%) (Guoit *et al.*, 1994). Tra le infezioni virali, particolarmente temibili sono le forme disseminate da Virus Varicella-Zoster (VZV); la loro mortalità è diminuita in modo drammatico dopo l'introduzione di antivirali specifici.

L'uso prolungato di corticoterapia massiva predispone in particolare ad infezione da *Pneumocystis carinii*, responsabile di una grave pneumopatia interstiziale. L'uso profilattico del cotrimossazolo è d'obbligo nel paziente oncologico.

Infezioni nei pazienti leucemici

Il vantaggio ottenuto dall'applicazione di protocolli di terapia antibiotica nelle complicanze infettive dei pazienti con leucemia è ampiamente documentato dai dati di letteratura (Hughes *et al.*, 1990).

Fattori predisponenti, come la neutropenia e l'immunodepressione cellulare, sono responsabili rispettivamente di infezioni batteriche e fungine e di infezioni da batteri intracellulari, virus, parassiti e funghi.

A partire dagli anni '70 in particolare, si è osservato un aumento di frequenza e gravità di infezioni da cocchi grampositivi (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) e da enterococco. Le infezioni fungine, specie da *Candida* e *Torulopsis* si osservano particolarmente nelle recidive leucemiche.

La profondità e la durata della neutropenia, la presenza o meno di germi resistenti (stafilococchi meticillinoresistenti e *Pseudomonas* multiresistenti), le infezioni fungine condizionano tutti pesantemente l'andamento clinico e la prognosi (Guoit *et al.*, 1994). Nel trattamento delle leucemie acute, l'utilizzo di fattori di crescita G-CSF o GM-CSF, sebbene ancora con molte riserve, sta trovando sempre più largo impiego.

TAB. VI. MICRORGANISMI ISOLATI NELLE EMOCOLTURE, DOPO TRAPIANTO DI MIDOLLO, ESPRESSI IN VALORI ASSOLUTI

Microorganismo	Bukner, 1978	Meyers, 1986	Brunet, 1989
Cocchi grampositivi	60	57	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	4	13
Stafilococchi coagulasi-negativi	29	22	26
<i>Streptococcus</i>	6	8	9
<i>Corynebacterium</i>	6	4	0
Bacilli gramnegativi	28	33	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	8	17
<i>Escherichia coli</i>	13	0	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0	4
<i>Candida</i>	9	0	17

Infezioni in corso di trapianto

Trapianto di midollo osseo

Tra tutti i trapianti, quello di midollo osseo si caratterizza per il maggior numero di infezioni gravi (cfr. tab. VI). Il periodo immediatamente post-trapianto (prime 4 settimane) è caratterizzato da una elevata frequenza di infezioni da cocchi grampositivi, candidosi viscerali e aspergillosi polmonare maligna, in ragione della spiccata neutropenia. L'applicazione di protocolli di terapia antibiotica triplice associata a terapia antimicotica, in caso di persistenza di temperatura febbrile, rappresenta una strategia terapeutica indispensabile (Pizzo, 1993). L'uso profilattico di chinoloni, cotrimossazolo, decontaminazione intestinale ed alimentazione con cibi sterilizzati riduce, secondo alcuni AA., l'incidenza delle infezioni. Grande interesse, nel ridurre il numero dei giorni di aplasia, ha destato l'uso di fattori di crescita.

Nel periodo tardivo del trapianto di midollo osseo predominano le infezioni virali (Cytomegalovirus [CMV] e Varicella-Zoster [VZV]), infezioni parassitarie (pneumopatie da *P. carinii* e toxoplasmosi cerebrale) e infezioni fungine sistemiche. L'uso profilattico di gancyclovir e cotrimossazolo nella prevenzione, rispettivamente, delle infezioni da CMV e *P. carinii* / *Toxoplasma* si è dimostrato efficace.

Trapianto cardiaco

Il trapianto cardiaco rappresenta un'opzione terapeutica ormai comune anche nella popolazione pediatrica, come trattamento delle cardiopatie congenite complesse e cardiomiopatie non curabili con terapie convenzionali. A 2 anni dal trapianto, circa il 70% dei bambini di età < 1 anno e tra 1 e 5 anni sopravvive; tale percentuale è maggiore del 10%, per pazienti compresi tra 5 e 18 anni (Miller *et al.*, 1994).

I primi 90 giorni dal trapianto rappresentano il periodo a maggior rischio di infezioni; l'incidenza va progressivamente riducendosi nei periodi successivi anche se la maggior parte dei bambini con trapianto cardiaco presenta almeno un'infezione grave entro i primi due anni.

Le infezioni più comuni sono rappresentate da infezioni batteriche, presenti nel 47% dei casi, seguite da quelle virali (41%), fungine (7%) e protozoarie (5%). Tra le infezioni batteriche prevalgono quelle da germi grampositivi (oltre il 50% dei casi) e tra questi circa il 70% è rappresentato da stafilococchi (*S. aureus* > *S. epidermidis*) (Miller *et al.*, 1994). Particolarmente frequenti nel 1° mese post-trapianto e cor-

relate all'uso di cateteri venosi centrali, tubi endotracheali e cateteri urinari, le infezioni batteriche riflettono essenzialmente gli aspetti clinici delle infezioni nosocomiali.

Tra le infezioni virali, i virus erpetici (CMV; *Herpes simplex*; EBV; VZV) rappresentano la maggior causa di malattia. Il CMV in particolare è responsabile di quasi il 70% delle infezioni virali e di circa il 30% di tutte le infezioni riportate, con picco di incidenza tra 4 e 6 settimane post-trapianto. La capacità del virus di rimanere in uno «stato di latenza», entro cellule *reservoir* (linfociti, monociti periferici e forse granulociti) condiziona sempre una infezione a «lungo termine» caratterizzata da possibili riattivazioni, mediate dalla terapia immunosoppressiva, e da manifestazioni cliniche anche gravi. Un ruolo importante, ma non unico, dell'infezione da CMV inoltre è da ricercarsi nello sviluppo della *graft coronary disease*, espressione di una insufficienza cronica del *graft* (Everett *et al.*, 1992).

Le infezioni fungine in corso di trapianto di cuore più frequentemente rilevate sono quella da *Candida albicans*, meno frequentemente da *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans*.

Il decorso clinico di un'infezione fungina è sempre gravato da un'alta mortalità (36%), contro il 13% delle infezioni batteriche. Fattori condizionanti l'alta mortalità sono: la difficoltà della diagnosi, l'uso di procedure diagnostiche invasive e l'incidenza entro il 1° mese dal trapianto (fase di massima immunosoppressione).

L'infezione da *Toxoplasma gondii*, presente nel 12-17% dei pazienti adulti sottoposti a trapianto cardiaco, è evento più raro nella popolazione pediatrica. Sebbene sia possibile una riattivazione di un'infezione latente, il toxoplasma può essere trasmesso anche con l'organo da pazienti positivi a riceventi negativi. Di più raro riscontro sono le infezioni da *Pneumocystis carinii*, *Legionella* e *Nocardia* responsabili tutti di gravi pneumopatie.

Tra tutte le infezioni descritte, l'organo più frequentemente colpito è il polmone (28%), seguito dal sangue (26%), tratto gastrointestinale (17%) e urinario (2%). Le infezioni della ferita chirurgica sono rilevate nel (3%) dei casi.

Trapianto polmonare

I progressi ottenuti con il trapianto cuore-polmone e polmone nei pazienti adulti hanno permesso, in tempi recenti, l'estensione di tali procedure anche a pazienti in età pediatrica, con malattia polmonare in stadio terminale. Ipertensione polmonare primitiva, cardiopatie congenite complesse e fibrosi cistica rappresentano le indicazioni più significative.

Il decorso clinico del trapianto polmonare a medio e lungo termine è gravato da molte complicanze: di natura chirurgica, rigetti, infezioni e problemi correlati all'uso di terapia immunosoppressiva combinata.

Relativamente alle infezioni, esse sono presenti in oltre il 60% dei pazienti, specie nei primi 6 mesi post-trapianto, con massima incidenza nel 1° mese. Il polmone trapiantato risulta particolarmente vulnerabile per la diretta comunicazione con l'ambiente esterno, per l'alterazione del riflesso della tosse (per denervazione) e per le anomalie della clearance muco-ciliare.

Il 50% delle infezioni sono rappresentate da infezioni batteriche e il 14% da infezioni fungine (entro il 2° mese), sostanzialmente correlate a manovre chirurgiche e/o infezioni preesistenti.

Polmoniti da stafilococchi multiresistenti e micoplasmi caratterizzano il decorso iniziale (1° e 2° mese); micobatteri *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium fortuitum* sono diagnosticati successivamente. La colonizzazione polmonare nei pazienti con fibrosi cistica, da parte di *Pseudomonas cepacia* e secondo alcuni AA., predispone ad un'aumentata morbilità e mortalità (Kurland e Orenstein, 1994). Di particolare rilievo, tra le infezioni fun-

gine, quelle da *Candida* e *Aspergillus*, che specie nel periodo immediatamente post-operatorio sono responsabili di quadri clinici spesso fatali (deiscenze in sede di anastomosi tracheobronchiali, mediastiniti, polmoniti).

Tra le infezioni virali, da segnalare è la netta prevalenza del CMV (oltre l'80% nei bambini e fino al 100% negli adulti), entro le prime due settimane dal trapianto, sia nei riceventi CMV positivi che nei riceventi CMV negativi da donatore positivo (Jeffrey *et al.*, 1994). L'infezione da CMV nel polmone trapiantato condiziona in modo rilevante la funzionalità del *graft* a medio e lungo termine, favorendo sia il possibile rigetto cronico (bronchiolite obliterante), che predisponendo ad infezioni batteriche e fungine.

I programmi di profilassi antivirale specifica con farmaci come il ganciclovir, nel periodo post-trapianto, sono indispensabili per pazienti CMV-negativi riceventi un organo CMV-positivo.

L'infezione da Epstein Barr virus (EBV; v. EPSTEIN E BARR, VIRUS DI [V.; V.*]), più frequente nei primi 6 mesi post-trapianto, è particolarmente più frequente nei bambini che negli adulti, sia per i riceventi positivi che per quelli negativi riceventi un organo positivo. Clinicamente caratterizzata da febbre, linfadenopatia e pneumopatia, l'infezione da EBV può essere in alcuni casi disseminata e fatale (Kurland e Orenstein, 1994).

Rilevante è il ruolo dell'EBV nello sviluppo della PTL (post transplant lymphoproliferative disorder), proliferazione incontrollata dei linfociti B infettati dal virus e con possibilità di trasformazione maligna. Sebbene dimostrata in tutti i trapianti d'organo, la PTL predilige trapianti di polmone, fegato, cuore, meno quelli di rene e di midollo osseo.

Pneumocystis carinii è responsabile di gravi pneumopatie interstiziali, specie nel periodo compreso tra 1 e 6 mesi post-trapianto. Programmi di profilassi con cotrimossazolo sono raccomandati in tutti i riceventi, fino ad 1 anno dal trapianto.

Trapianto renale

I trapianti renali sono da considerarsi come il trattamento di scelta per pazienti con insufficienza renale cronica. La sopravvivenza a 5 anni dal trapianto è circa del 90%. L'elevata immunodepressione, specie nell'immediato post-trapianto, condiziona però significative morbilità e mortalità legate ad infezioni. Le infezioni del tratto urinario (UTI) rappresentano la sede più frequente di infezioni batteriche, con un'incidenza variabile tra il 35 e 70% secondo i diversi AA. e sono responsabili del 60% circa delle batteriemie. L'uso routinario di cateteri vescicali e la terapia immunosoppressiva sono fattori determinanti nella patogenesi dell'UTI (Rubin, 1994). Un'infezione del tratto urinario, specie nelle prime epoche post-trapianto, condiziona l'evoluzione del trapianto stesso sia direttamente (morbilità e mortalità legata alle infezioni) che indirettamente (rischio di rigetto).

Oltre il 20% dei pazienti sottoposti a trapianto renale sviluppano infezioni virali, specie da CMV e VZV e ad esse è correlata una maggiore mortalità. L'infezione da CMV è presente in oltre il 75% dei pazienti trapiantati renali, sia come prima infezione che come riattivazione (Harmon, 1991). Tipica nel periodo compreso tra sei settimane e tre mesi dal trapianto, può presentarsi con vari gradi di gravità: febbre, leucopenia e alterazione delle transaminasi, fino a forme più avanzate come polmoniti, retiniti, epatiti, disfunzione o rigetto del trapianto renale. I fattori di rischio predisponenti allo sviluppo o alla gravità della malattia sono lo stato sierologico per CMV del ricevente, il tipo di terapia immunosoppressiva, il numero dei rigetti.

L'uso di programmi di profilassi con antivirali (aciclovir

o ganciclovir) e/o immunoglobuline è ampiamente dibattuto dalla letteratura specifica. Il VZV, considerato particolarmente contagioso per i bambini con trapianto renale, è responsabile oltre che di varicella, di infezioni disseminate, di polmoniti ed encefaliti. L'approccio al trattamento dell'infezione da VZV prevede, oltre all'uso di acyclovir, la riduzione dell'immunosoppressione, soprattutto attraverso la sospensione dell'azatioprina.

Appare evidente, infine, in alcune casistiche, l'incidenza dell'infezione da *P. carinii* (variabile tra il 4,5 e l'8%) con mortalità anche fino al 60%, ma che si giova di programmi di profilassi con cotrimossazolo.

Trapianto epatico

Il trapianto epatico deve essere considerato l'approccio terapeutico adeguato per pazienti con malattia epatica in stadio terminale. Nei bambini le indicazioni comprendono: processi malformativi a carico delle vie biliari e del fegato, disordini metabolici, insufficienza epatica acuta, secondaria ad agenti infettivi o tossici.

Nel trapianto di fegato le infezioni rappresentano la maggior causa di morbidità e mortalità con incidenza superiore a quella riscontrata nei trapianti di cuore e rene. Condizioni precedenti al trapianto, quali pneumopatia da aspirazione, peritoniti batteriche recidivanti e sepsi correlate all'uso di cateteri venosi centrali, rappresentano importanti fattori di rischio. Nel primo mese post-trapianto, le infezioni sono correlate strettamente alle procedure chirurgiche, in particolare alle anastomosi vascolari e biliari. Quadri clinici di colangiti, ascessi epatici e sepsi sono sostenuti da infezioni batteriche (enterobatteriacee, anaerobi, streptococchi e stafilococchi ne rappresentano l'etiologia più frequente).

Le infezioni micotiche sistemiche, presenti con incidenza variabile tra il 26 e il 40%, sono gravate da un'alta mortalità, compresa tra il 50 e il 70%, e sono rappresentate prevalentemente da *Candida* e *Aspergillus* (Tollemar *et al.*, 1995). Tuttavia l'uso profilattico di antimicotici per via sistemica ha mostrato efficacia nella riduzione dell'incidenza delle infezioni micotiche.

Il CMV è frequentemente responsabile di episodi di compromissione della funzione dell'organo trapiantato, specie nei primi quattro mesi dal trapianto. L'alterazione dell'espressione degli antigeni di istocompatibilità del tessuto trapiantato da parte del virus, inoltre, predisporrebbe a fenomeni di rigetto cronico.

Speciale menzione meritano infine gli studi relativi all'azione dei virus dell'epatite B e C sull'organo trapiantato, come possibili responsabili di infezioni croniche.

Bibliografia

- Everett J. P., Hershberger R. E., Norman D. J. *et al.*, *J. Heart Lung Transplant.*, 1992, **11**, 5133-137.
 Grieco M. H., *Approach to the immunocompromised patient*, in Gorbach S. L., Bartlett J. G., Blacklow N. R., *Infectious diseases*, 1992, Saunders, Philadelphia, pp. 1024-1030.
 Guoit H. F. L., Fibbe W. E. *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 1994, **18**, 525-532.
 Harmon W. F., *Pediatr. Nephrol.*, 1991, **5**, 118-125.
 Hughes W. T., Armstrong D. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 1990, **161**, 381-396.
 Jeffrey D., Hosenpud R. J. *et al.*, The Registry of the international Society for Heart and Lung Transplantation: Eleventh Official Report, 1994, *J. Heart Lung Transplant.*, 1994, **13**, 561-570.
 Kurland G., Orenstein D. M., *Current opinion in paediatrics*, 1994, **6**, 262-271.
 Miller L. W., Naftel D. C., Bourge R. C. *et al.*, and the Cardiac Transplant Research Database Group, "Infection after Heart Transplantation: A Multinstitutional Study", *J. Heart Lung Transplant.*, 1994, **13**, 381-393.
 Pizzo P. A., *N. Engl. J. Med.*, 1993, **328**, 1323-1332.
 Rubin R. H., *Infection in the organ Transplant Recipient*, in Rubin R. H., Young L. S., *Clinical approach to infection in the Compromised Host*, 3 ed., 1994, pp. 629-686.

Tollemar J., Hockerstedt K., Ericzon G., Halanko H., Ringden O., *Transplantation proceedings*, 1995, **27**, 1193-1195.

Tramont E. C., Hoover D. L., *Host Defense Mechanism*, Section B, in Mandell G. L., Douglas R. G., Dolin R., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1995, 4 ed., Churchill Livingstone, New York, pp. 30-35.

Young L. S., *Fever and septicemia*, in Rubin R. H., Young L. S. eds., *Clinical approach to infection in the compromised host*, 3 ed., 1994, Plenum, New York, pp. 75-78.

LUIGI ELIA, PATRIZIA D'ARGENIO,
MAURIZIO CANIGLIA E SUSANNA LIVADIOTTI

ORBIVIRUS

Il genere *Orbivirus* appartiene alla famiglia *Reoviridae*: le caratteristiche biologiche generali di questi virus sono descritte sotto la voce *Reoviridae* (v.**). Gli o. prendono il loro nome dal termine latino *orbis* che significa anello o cerchio, perché i capsomeri che formano il capsido interno del virione appaiono in colorazione negativa al microscopio elettronico con un'ampia cavità centrale, per cui il capsomero assume una forma ad anello.

Gli o. comprendono 14 specie a loro volta suddivise in più di 70 sierotipi. Tutti gli o. sono *Arbovirus* cioè, unici fra i membri della famiglia *Reoviridae*, sono trasmessi all'uomo e agli animali da insetti vettori, generalmente zecche e zanzare. Oltre agli animali di grossa taglia, alcuni piccoli roditori selvatici, quali topi, scoiattoli e porcospini vengono parassitati dagli insetti vettori e divengono serbatoi naturali dell'infezione.

Gli o. sono causa prevalentemente di malattie degli animali. Determinano infatti nei cavalli, nelle pecore, nei bovini e negli ungulati selvatici una sindrome che è clinicamente simile in queste diverse specie animali, caratterizzata da febbre, iperemia ed edema della pelle e delle mucose della bocca e del naso, degenerazione muscolare accompagnata da rigidità. Se questi virus infettano una femmina gravida, l'infezione viene spesso trasmessa al feto con conseguente aborto o nascita di un neonato malformato, affetto da paralisi spastica, cecità, sordità, ritardo nella crescita e idrocefalo. Soltanto alcune specie di o., Changuinola, Kemeroovo, Lemombo e Orungo infettano l'uomo e i casi di queste malattie descritti in letteratura sono molto pochi. Questi virus sono endemici in America Centrale, Russia e Siberia, Europa Centrale, Africa e sono trasmessi all'uomo da zecche e zanzare. La sintomatologia delle malattie da essi determinate è abbastanza aspecifica, essendo caratterizzata da una sindrome febbrile talvolta accompagnata da meningoencefalite.

La più studiata affezione umana da questi virus è la *febbre da zecche del Colorado*, trasmessa all'uomo principalmente dalla zecca *Dermacentor andersoni* e da altre zecche. Questa malattia è determinata in realtà da un virus che è stato separato dagli o. perché ha un genoma costituito da 12 segmenti invece che da 10 segmenti come i classici o. Perciò il virus della febbre da zecche del Colorado, e un virus simile, virus Eyach, di recente isolato da zecche del genere *Ixodes* in Germania e Francia, sono stati classificati insieme in un nuovo genere della famiglia *Reoviridae*, denominato *Coltivirus*. La febbre da zecche del Colorado è abbastanza frequente nella regione delle montagne rocciose negli Stati Uniti ed è caratterizzata clinicamente da una sindrome febbrile, accompagnata da forte astenia e spossatezza, che può talvolta complicarsi con meningo-encefalite e sintomi emorragici. In tutte le malattie da *Orbivirus* e *Coltivirus* degli animali e dell'uomo la diagnosi di laboratorio si pone con l'isolamento del virus dal sangue che generalmente riesce in una elevata percentuale di casi. La diagnosi può essere confermata sierologicamente ricercando gli anticorpi antivirali con la fissazione del complemento, con l'ELISA o con l'im-

ORBIVIRUS

munofluorescenza utilizzando cellule in coltura infettate dai virus in esame quale sorgente di antigeni virali.

Bibliografia

- Anderson R. D. et al., *J. Infect. Dis.*, 1985, **151**, 449.
Barber T. L., Jochim M. M. eds., *Progress in Clinical and Biological Research*, vol. **178**: *Bluetongue and Related Orbiviruses*, 1985, Alan R. Liss, New York.
Fields B. N. ed., *Virology*, 3 ed., vol. 2, 1996, Raven Press, New York.
Karabatsos N. et al., *J. Gen. Virol.*, 1987, **68**, 1463.
White D. O., Fenner F. J., *Medical Virology*, 1994, Academic Press, New York.

GIUSEPPE BARBANTI-BRODANO

ORECCHIO [v. vol. X, coll. 1783-1844]

INDAGINI E DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

SOMMARIO

Introduzione (col. 4219). - **Malformazioni** (col. 4219): *Orecchio esterno*. - *Orecchio medio*. - *Orecchio interno*. - *Condotto uditivo interno (CUI)*. - **Patologia acquisita** (col. 4222): *Orecchio esterno*. - *Orecchio medio*. - *Otosclerosi*. - *Orecchio interno*. - **Impianti cocleari** (col. 4226). - **Patologie dell'angolo ponto-cerebellare** (col. 4226). - **Lesioni traumatiche della rocca** (col. 4229). - **Glomi o paragangliomi** (col. 4231).

Introduzione

Le indagini radiologiche e di diagnostica per immagine hanno trovato, negli ultimi anni, spazi sempre più ampi di applicazione, grazie alla larga diffusione di apparecchiature digitalizzate quali la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN). La notevole precisione e definizione di tali apparecchi hanno decretato, di fatto, la fine della radiologia tradizionale (v. ORECCHIO, X, 1806).

Infatti l'esame TC consente una ideale visualizzazione delle strutture ossee dell'orecchio e la RMN una più precisa valutazione della componente membranosa e, se necessario, anche di quella vasale mediante l'angio RMN.

Malformazioni

Orecchio esterno

Le malformazioni del condotto uditivo esterno (CUE), che ha un'origine ectodermica, possono interessare sia la componente membranosa che quella ossea. Nel primo caso la TC dimostra la presenza di tessuti molli che occupano il

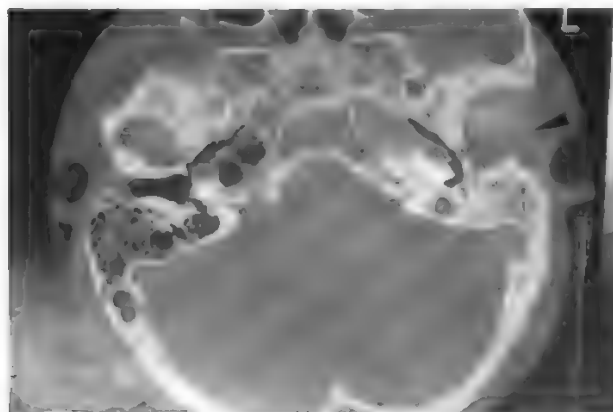


Fig. 1. Agenesia del CUI, scansione TC assiale: oblitterazione e mancanza della parete ossea anteriore del CUI (punta di freccia).

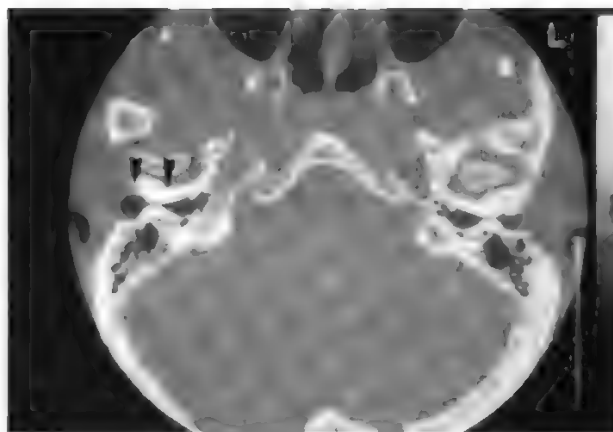


Fig. 2. Ipoplasia dei CUE, indicata a destra dalle punte di freccia. Scansione TC assiale.

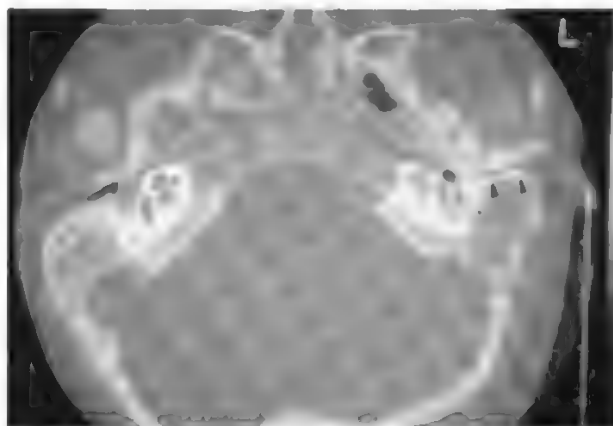


Fig. 3. A sinistra, ipoplasia del CUE che appare filiforme (punta di freccia) associata a malformazione della cassa timpanica, piccola e priva di ossicini (freccia).

CUE e che lo obliterano parzialmente o in modo completo. La componente ossea risulta talvolta indenne, ma, più frequentemente, anch'essa viene interessata. Il CUE è così sostituito da un blocco di tessuto osseo compatto con atresia (fig. 1). Quest'ultimo aspetto può associarsi a malformazioni della cassa timpanica e della catena ossiculare. All'esame TC quindi, spetta di valutare se la malformazione sia a carico della componente membranosa, di quella ossea o di entrambe e se essa determini una stenosi settoriale (fig. 2) oppure una vera atresia del condotto uditivo esterno.

Orecchio medio

La TC permette di riconoscere alterazioni di forma e di volume dell'orecchio medio, struttura con un'origine embriologica endodermica. Indicazioni radiologiche utili ai fini di un eventuale intervento chirurgico correttivo sono relative alla presenza di eventuali anomalie vascolari, allo stato della finestra ovale, al decorso del nervo facciale, alla condizione della mastoide, alle dimensioni della cassa timpanica (fig. 3).

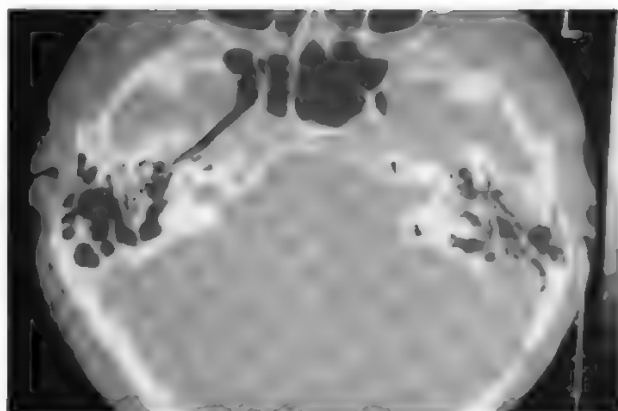


Fig. 4. Malformazione di Mondini, chiocciole assai piccole, associata ad un anormale allargamento del CUI.

Le malformazioni della catena ossiculare sono caratterizzate radiologicamente dalla deformità delle singole componenti, dalla fusione delle stesse o dall'agenesia degli ossicini o di parte di essi.

Orecchio interno

Nel sospetto di una malformazione dell'orecchio interno, che come quello esterno ha un'origine ectodermica (placode acustico), sarebbe necessario completare l'esame TC con uno studio RMN della componente membranosa. Infatti esistono malformazioni che interessano solo il labirinto membranoso ed altre a carico anche di quello osseo. In rapporto al periodo dello sviluppo fetale, queste malformazioni presentano aspetti diversi.

Esse consistono in: aplasia labirintica, cavità labirintica comune, aplasia o ipoplasia cocleare (*malformazione di Mondini*) (fig. 4), aplasia o displasia dei canali semicircolari, acquedotto del vestibolo ampio.

Condotto uditivo interno (CUI)

Non meno importante è il contributo dell'indagine radiologica nella valutazione topodiagnostica di una lesione malformativa che interessa il canale acustico interno: ipoplasia, aplasia o anormale allargamento.

Patologia acquisita

Orecchio esterno

La TC trova indicazione nella valutazione di alcune forme patologiche a carattere espansivo dell'orecchio esterno, sia di origine mesodermica (angiomi, linfangiomi, fibromi, sarcomi, esostosi, osteomi) che epiteliale (ceruminomi, cisti epidermiche, *keratosis obturans*). La TC offre in questi casi una documentazione utile ai fini diagnostici e per valutare il grado di infiltrazione delle parti molli e di rimaneggiamento o di erosione della componente ossea del temporale (fig. 5).

Nelle forme flogistiche dell'orecchio esterno il ruolo della TC è essenzialmente quello di valutare il quadro anatomico-topografico di un'otite esterna maligna e di controllarne l'evoluzione durante e dopo il trattamento. Tale patologia può comportare oltre all'obliterazione del condotto uditivo esterno, anche l'erosione dell'osso contiguo e la diffusione agli spazi anatomici limitrofi (mastoide, naso-faringe, parotide, etc.).

Orecchio medio

Il ruolo della diagnostica per immagini in corso di otite media cronica è teso ad identificare l'estensione del processo flogistico, a confermare la diagnosi differenziale tra forma semplice e forma colesteatomatosa (fig. 6), a orientare verso un trattamento medico o chirurgico e, infine, a controllare l'andamento della patologia dopo trattamento. Nel caso di un'otite cronica colesteatomatosa è possibile riconoscere con la TC la sede di origine della cisti epidermoidale (fig. 7), l'eventuale danno da ero-

Fig. 6. Scansione coronale: demolizione del muro della loggetta e presenza di modesta quantità di tessuto a ridosso della parete mediale della cassa timpanica in corrispondenza del canale semicircolare laterale, la cui parete ossea appare assottigliata e quasi cancellata (fistola labirintica, punta di freccia).

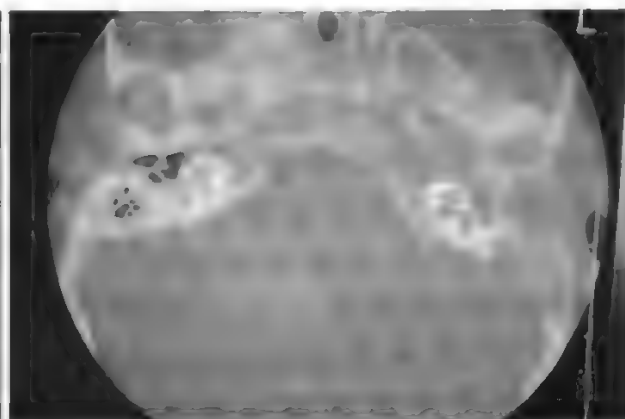
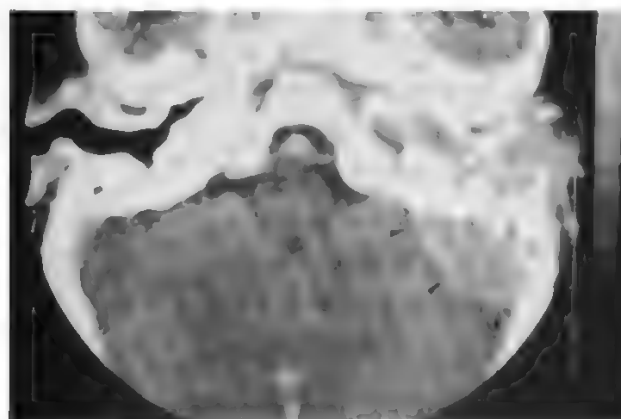
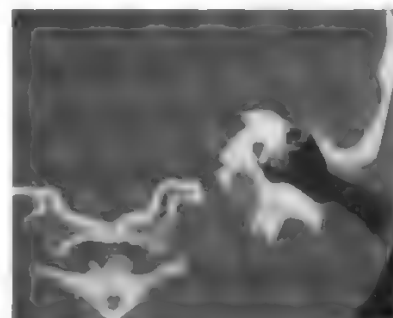


Fig. 5. Nell'immagine a sinistra rhabdomyosarcoma della rocca indicato dalle *punte di freccia* (TC dopo introduzione endovenosa di mezzo di contrasto). Nell'immagine a destra con finestra per osso si evidenzia l'ampia demolizione della rocca e della mastoide.

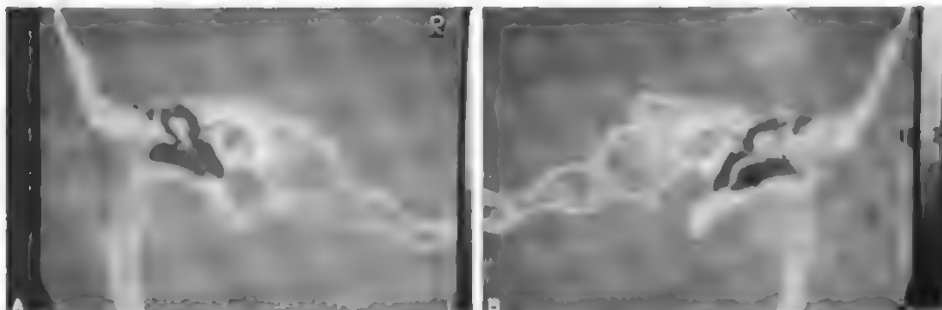


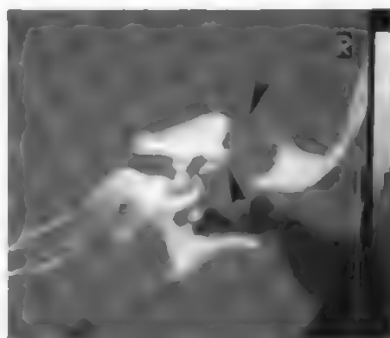
Fig. 7. Scansioni TC coronali: in A si apprezza il normale spessore della membrana timpanica che appare ispessita e calcifica in B (punta di freccia). Da questo lato presenza di tessuto in corrispondenza della tasca di Prussak (freccia), iniziale colesteatoma.

sione determinato sulle strutture anatomiche contigue, soprattutto di quelle che richiedono una particolare attenzione dal punto di vista chirurgico come finestra rotonda, seno timpanico e nervo facciale. Un'eventuale estensione del processo flogistico all'orecchio interno, la demolizione del *tegmen* con la possibilità di complicanze endocraniche sono pure facilmente documentabili dalla TC, in qualche caso anche con l'ausilio di un esame RMN (fig. 8).

La diagnostica per immagini rappresenta pure un'indagine indispensabile all'approccio chirurgico dell'orecchio.

Poiché l'otite cronica rappresenta la causa più frequente di questi interventi, un esame TC della rocca può dirimere il sospetto di un colesteatoma, di una fistola labirintica (fig. 9), qualora sia presente una sintomatologia vertiginosa, di una lisi ossea del canale di Falloppio quando vi siano i segni di una paralisi iniziale del facciale. L'esame TC è pure utile per valutare una eventuale recidiva del cole-

Fig. 9. Grosso colesteatoma occupa la cassa timpanica, erode la parete mediale della cassa fino a raggiungere il canale semicircolare laterale (fistola labirintica) e assottiglia marcatamente il *tegmen* timpani (punta di freccia). L'apice del muro della loggetta appare arrotondato e la catena ossiculare non è riconoscibile.



steatoma, per riconoscere la persistenza di tessuto nella neocavità dopo l'intervento chirurgico, l'occupazione di sedi critiche quali la finestra ovale o il seno timpanico, lo stato dei canali semicircolari, dei recessi dell'orecchio medio e degli ossicini.

Otosclerosi

L'utilità dell'esame TC consiste essenzialmente nel confermare la diagnosi clinica, nell'indicare la localizzazione della «placca» otosclerotica (a livello della finestra [fig. 10] o del canale cocleare) e nell'escludere la presenza di patologie concomitanti. Va considerato però che i segni radiologici non sono apprezzabili nei primi due stadi anatomoclinici della malattia riportati dalla classificazione di Portmann (tab. 1).

Lo studio va condotto a strato fine sulla regione della finestra ovale ove si possono riconoscere, in funzione dello stato evolutivo della malattia, i segni di otospongiosi o di rarefazione ossea a livello della platina, dei bordi della finestra o la presenza di una sclerosi più evidente in corrispondenza della regione della *fissula ante fenestram* o, addirittura, la completa oblitterazione sclerotica della finestra stessa. Dopo l'intervento chirurgico di stapedectomia l'esame radiologico è indicato per controllare lo stato del posizionamento della protesi (fig. 11).

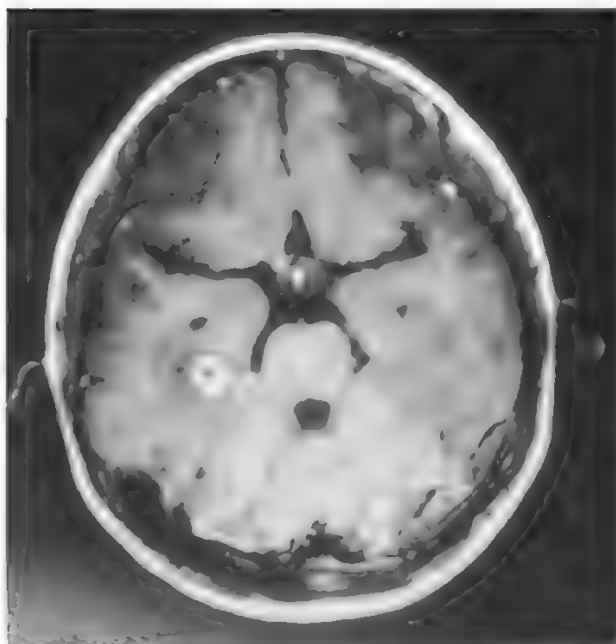
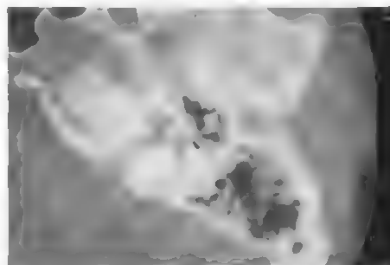


Fig. 8. La risonanza magnetica nucleare (scansione T₁ assiale dopo mezzo di contrasto paramagnetico) evidenzia una localizzazione ascessuale complicata da una forma flogistica cronica dell'orecchio. La lesione appare evidente per la presenza di un anello iperintenso circondato da un alone ipointenso di edema.

Fig. 10. Grossolana calcificazione nella sede della finestra ovale tra il bordo della stessa e la platina (*fissula ante fenestram*) otosclerosi fenestrale.



TAB. I. STADI ANATOMOCLINICI DELL'OTOSCLEROSI SECONDO PORTMANN

Stadio I:	invasione del legamento anulare con blocco della platina.
Stadio II:	invasione del bordo della platina con conseguente ispessimento localizzato della stessa.
Stadio III:	invasione pressoché completa della platina che appare ispessita fatta eccezione per una piccola area centrale. Bordi della finestra ovale ispessiti.
Stadio IV:	completo ispessimento della platina.
Stadio V:	blocco otospongiotico della finestra ovale che aggetta nella fossa ovale o nel vestibolo.

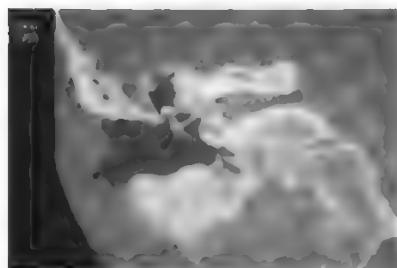


Fig. 11. Protesi stapediale (punta di freccia) correttamente posizionata.

Nelle forme cocleari dell'otosclerosi (fig. 12) l'indagine radiologica permette di evidenziare i focolai otospongiotici che appaiono come aree di rarefazione ossea che circondano la coclea, più frequentemente in corrispondenza del giro basale. Solo tardivamente, la componente di sclerosi circonda la coclea raddoppiando il profilo della stessa e offrendo un'immagine «a doppio contorno». Spesso la parete cocleare appare frastagliata e nel lume aggettano grossolane spicole ossee.

Orecchio interno

L'esame TC permette di riconoscere i segni di un interessamento labirintico solo quando si realizzi un sovrvertimento e un rimaneggiamento della componente ossea: per esempio in caso di labirintiti ossificanti, fistola labirintica, erosioni ossee soprattutto di origine neoplastica benigna

(neurinomi del VII) e maligna (carcinomi primitivi e metastatici).

L'elevata risoluzione di contrasto della RMN, invece, è utile nell'identificare forme flogistiche acute che assumono disomogeneamente il mezzo di contrasto, determinando un incremento del segnale in T₁, e nel differenziare formazioni occupanti spazio quale il granuloma colesterinico dell'apice della rocca dal colesteatoma.

Impianti cocleari

Prima dell'intervento, un esame TC, completato con RMN, dovrà accertare le condizioni anatomiche della rocca petrosa. A tale scopo, una RMN condotta a strato fine sui piani assiale e coronale con adeguate sequenze di impulsi, permetterà di verificare lo stato della regione temporale, del condotto uditivo interno e del fascio vascolo-nervoso che vi decorre, le caratteristiche dell'osso della capsula labirintica e delle strutture membranose in esso contenute. Con tale indagine si dovrà stabilire la presenza di alcuni fattori che controindichino l'intervento quali malformazioni dell'orecchio, dilatazione del condotto uditivo interno, stenosi del condotto uditivo interno e assenza del nervo cocleare, calcificazioni o fibrosi dell'orecchio interno, processi flogistici dell'orecchio interno, anomalie della finestra rotonda ed ovale, procidenze o tragitti anomali di vene giugulari ed arterie carotidee.

Qualora l'indagine radiologica risulti negativa, con l'esame RMN si dovrà stabilire il lato dove eseguire l'impianto e il tipo della protesi da impiegare.

Il controllo TC postoperatorio è indicato per verificare il corretto posizionamento e decorso degli elettrodi, la comparsa di processi flogistici dell'osso con conseguente fibrosi o calcificazione.

Patologie dell'angolo ponto-cerebellare

La regione dell'angolo ponto-cerebellare è uno spazio liquorale subaracnoideo delimitato dal ponte e dal cervelletto medialmente, dalla rocca anterolateralmente, dal tentorio e dall'emisfero cerebrale superiormente e dal pavimento cranico inferiormente.

È attraversato dal nervo facciale ed intermedio di Wrisberg, dal nervo acustico e da alcuni rami del circolo vertebro-basilare. La patologia neoplastica primitiva che qui si localizza è generalmente rappresentata da forme espansive di natura benigna. I neurinomi dell'ottavo (fig. 13) costituiscono l'evenienza di gran lunga più frequente; essi predili-

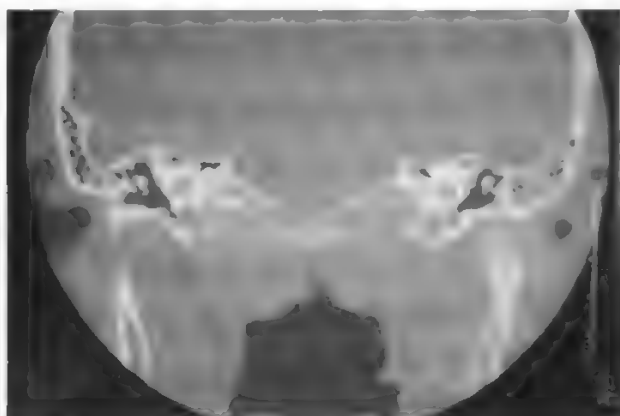
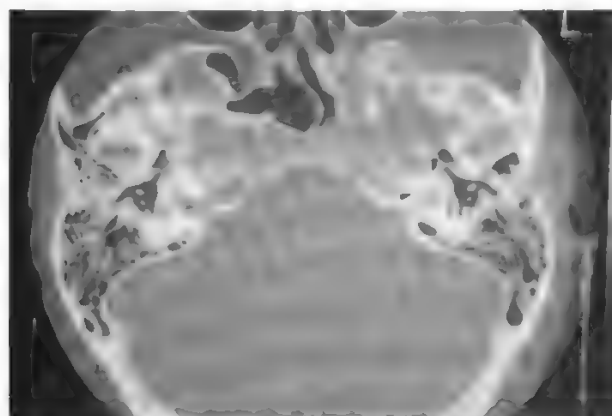


Fig. 12. Otosclerosi cocleare bilaterale di grado avanzato (immagini assiale e coronale). Estese aree di rarefazione ossea circondano le chioccioline e sembrano raddoppiare il profilo delle stesse.

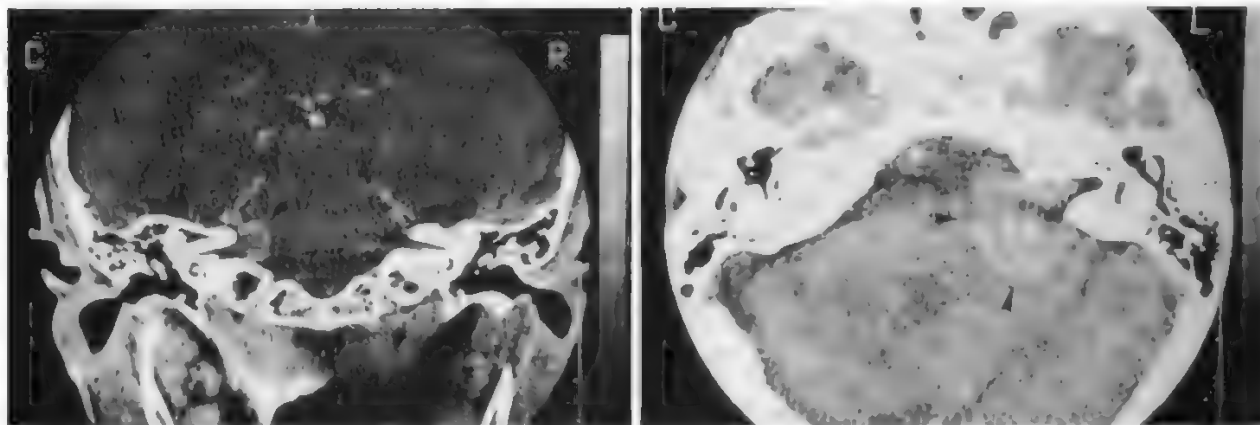


Fig. 13. Neurinomi dell'acustico. A sinistra (immagine TC coronale dopo contrasto) si riconosce una formazione iperdensa rotondeggiante che sporge dal CUI. A destra (immagine TC assiale dopo contrasto) un neurinoma di notevoli dimensioni allarga il CUI ed occupa la regione dell'angolo ponto-cerebellare.

gono la porzione più mediale del CUI per poi accrescersi occupando la cisterna dell'angolo ponto-cerebellare. Sono seguiti per frequenza dai meningiomi e da altre forme neoplastiche di origine disembrionica quali le cisti aracnoidiche, le cisti epidermoidi ed i lipomi.

Per via ematogena o liquorale possono colonizzare questa sede anche forme neoplastiche metastatiche, le più fre-

quenti delle quali sono carcinomi della tiroide, della mammella e della prostata.

La TC e la RMN rappresentano le tecniche diagnostiche di elezione nelle lesioni di questo distretto endocranico. I neurinomi dell'acustico possono presentare dimensioni variabili da pochi millimetri a qualche centimetro. Crescendo, possono erodere le strutture ossee contigue, nel caso più raro in cui si localizzino nel tratto più laterale del condotto uditivo interno, lo possono allargare (fig. 14). Dopo infusione endovenosa di mezzo di contrasto iodato o paramagnetico, i neurinomi hanno la caratteristica di incrementare in modo significativo la propria densità o l'intensità del segnale (fig. 15).

La regione dell'angolo ponto-cerebellare può essere coinvolta da processi neoplastici cerebrali intraassiali (medulloblastomi, gliomi e ependimomi) (fig. 16) o da tumori extracranici (cordomi, condromi, chemodectomi, lipomi) (fig. 17).

La patologia non neoplastica è essenzialmente di tipo vascolare e sostenuta da aneurismi, da malformazioni arte-

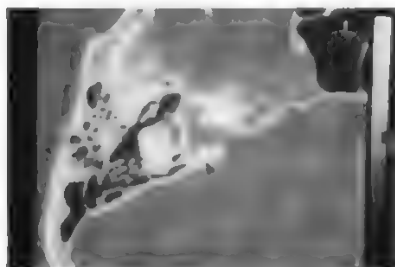


Fig. 14. Raramente il neurinoma può localizzarsi completamente in sede intracanalare. In tal caso, crescendo, erode ed allarga le pareti ossee del CUI (punta di freccia).

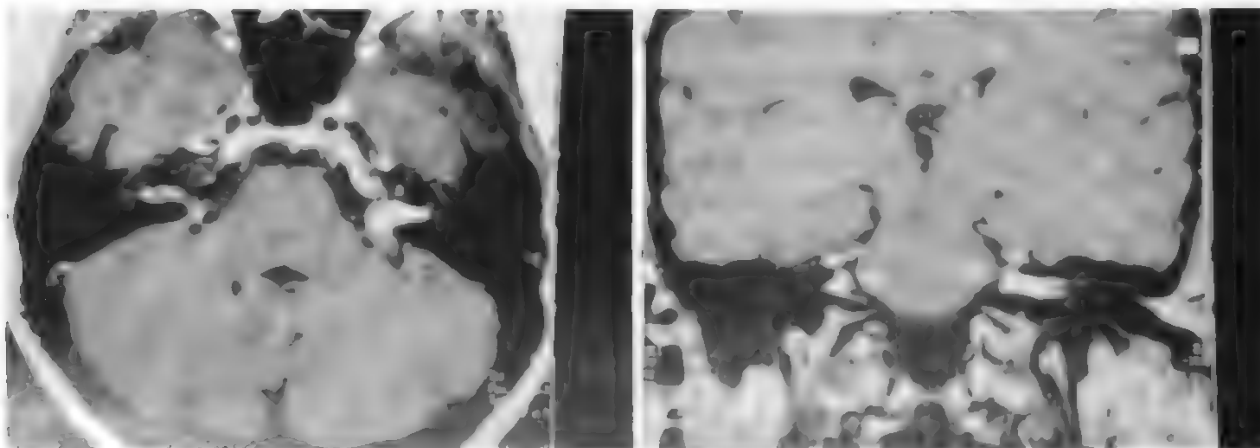


Fig. 15. RMN assiale T1. Il neurinoma si presenta come una massa iperintensa dopo introduzione endovenosa di mezzo di contrasto paramagnetico. A sinistra (immagine T1 assiale) si riconosce un neurinoma che occupa entrambi i CUI ed appaiono nettamente iperintensi per effetto del mezzo di contrasto.

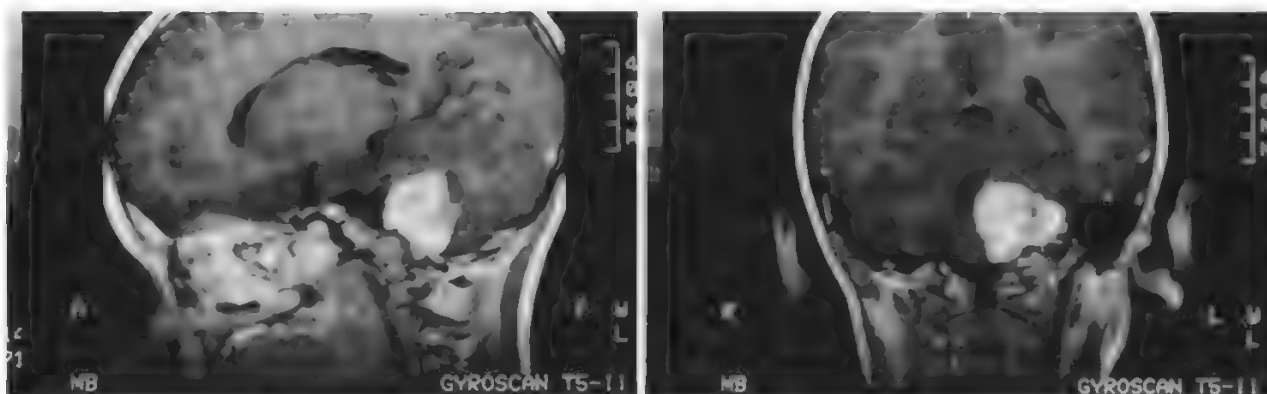


Fig. 16. Grosso ependimoma dell'angolo ponto-cerebellare, disomogeneo ed iperintenso nelle immagini RMN T_1 dipendenti condotte dopo introduzione endovenosa di mezzo di contrasto paramagnetico. (Per gentile concessione del Dott. F. Spigariol).

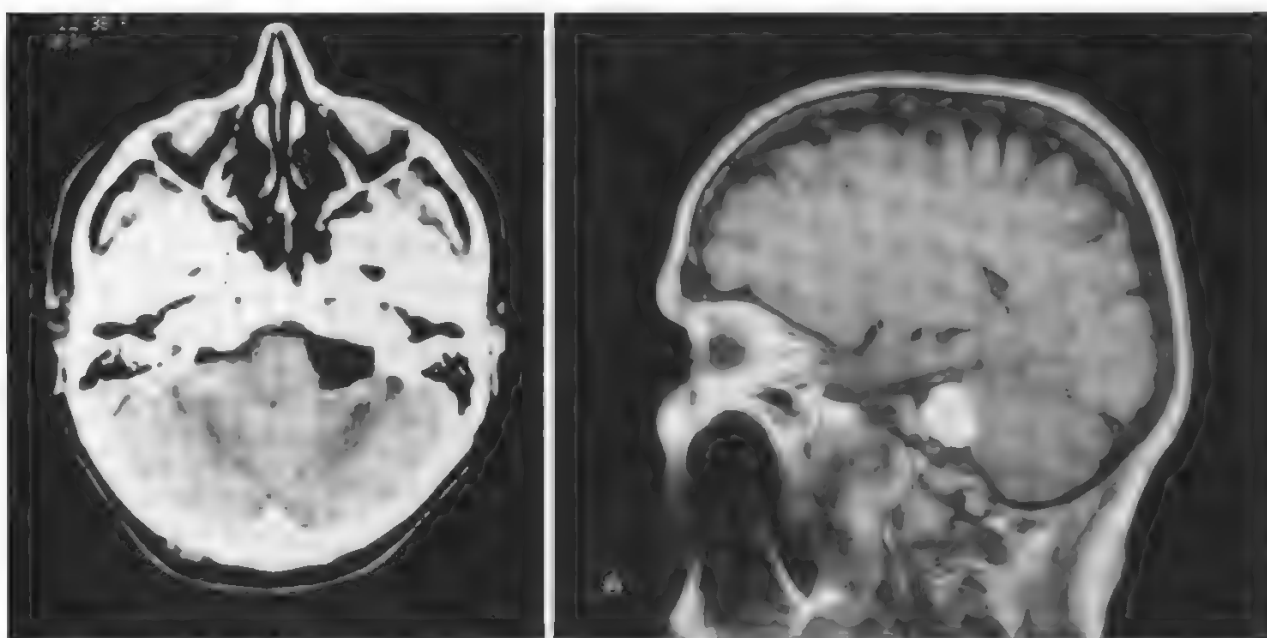


Fig. 17. La TC (a sinistra) evidenzia una formazione ipodensa in sede di angolo ponto-cerebellare a destra. La risonanza magnetica (a destra) conferma la presenza di tessuto adiposo, iperintenso nelle immagini T_1 pesate, di un lipoma. (Per gentile concessione del Dott. F. Spigariol).

ro-venose e da anomalie di forma e decorso (megadolico-basilare).

Lesioni traumatiche della rocca

Le fratture della rocca vengono generalmente classificate in longitudinali, trasverse e complesse in relazione alla direzione del loro andamento rispetto all'asse maggiore della rocca.

Le longitudinali (fig. 18) interessano la squama del temporale, generalmente raggiungendo in profondità il forame lacero e lo sfenoide. Le fratture trasversali (fig. 19) sono quelle più frequentemente responsabili di coinvolgimenti della colea, del vestibolo e dei canali semicircolari giustificando così la formazione di fistole perilinfatiche e lesioni della finestra ovale. Le fratture com-

plesse sono costituite da multiple linee di frattura a decorso vario.



Fig. 18. Frattura longitudinale della rocca localizzata in corrispondenza della volta del CUE.

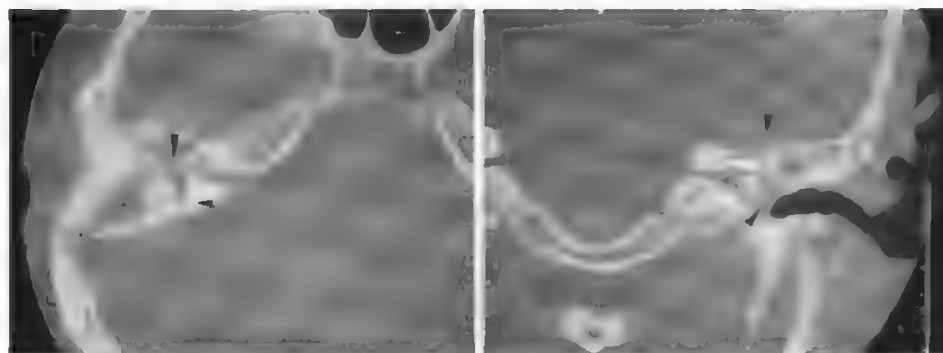


Fig. 19. Frattura trasversale della rocca che interessa il vestibolo ed il giro basale della coclea (punte di freccia).

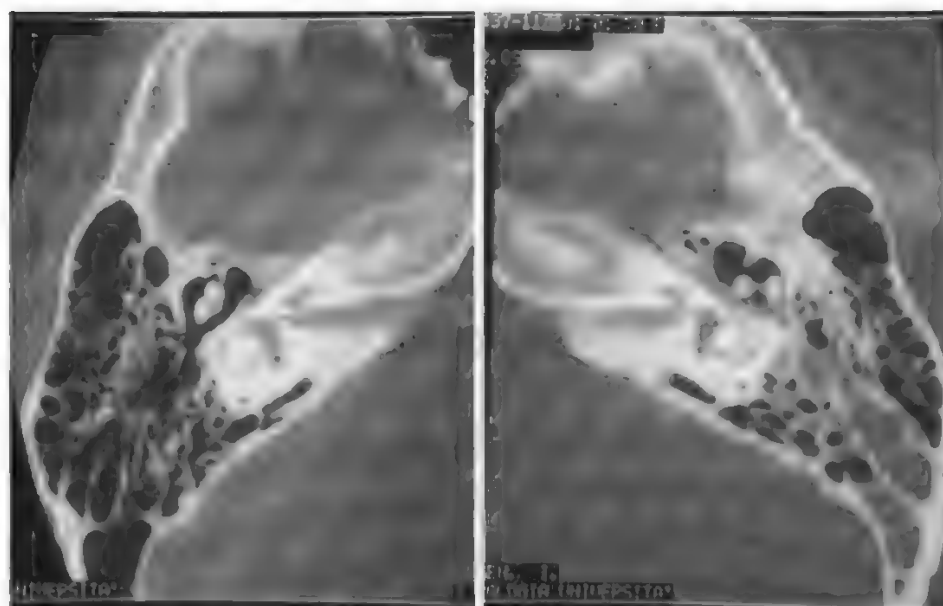


Fig. 20. Articolazione incudo-malleolare regolare a sinistra, a destra lussazione post traumatica con medializzazione del martello e lateralizzazione dell'incudine.

In caso di trauma con TC possono riconoscersi eventuali lesioni ossee della catena ossiculare o lussazioni delle articolazioni ossiculi (fig. 20).

Glomi o paragangliomi

Sono tumori generalmente benigni che originano dai paragangli, organi chemo- e barocettori di origine neurectodermica.

Solo nell'1% dei casi secernono catecolamine, mentre nella maggior parte dei casi danno segno di sé per l'effetto compressivo sulle strutture contigue. In funzione della sede di origine possono essere classificati in paragangliomi timpanici, più o meno circoscritti all'orecchio medio, e paragangliomi giugulari con localizzazione al forame lacero posteriore.

La diagnosi si pone con TC, RMN ed eventualmente con esame angiografico.

Alla TC i glomi timpanici appaiono come masserelle ad origine dal promontorio e che aggettano nella cassa con aspetto nodulopuntiforme (fig. 21), dopo contrasto, incrementano significativamente ed omogeneamente la propria densità. Gli esami TC non mostrano le strutture ossee con cui vengono in contatto.

RMN presentano un segnale intenso dopo infusione endovenosa di contrasto paramagnetico con aspetto a «sale

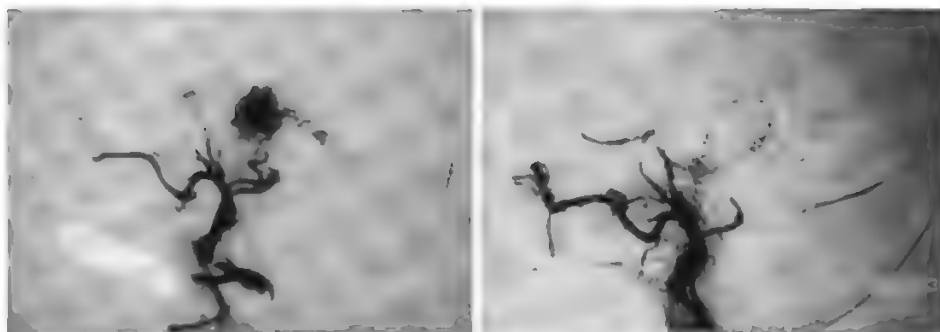
e pepe». All'esame angiografico presentano un ricco circolo vascolare. I glomi giugulari (fig. 22), più frequenti dei timpanici, tendono ad accrescersi lentamente lungo le vie di minor resistenza costituite dalle strutture vascolari e nervose. Nel loro accrescersi possono erodere il setto osseo ipotimpano-giugulare guadagnando la cassa timpanica. L'esame TC e la RMN hanno il compito di indicare i limiti di estensione della neoplasia ed eventualmente dimostrare il coinvolgimento della carotide.

Circa il 3% dei glomi metastatizzano, soprattutto all'osso, ai linfonodi e al fegato.

Fig. 21. Glomo timpanico. Immagine TC eseguita senza mezzo di contrasto. Il tessuto indicato dalla punta di freccia aggetta nella cassa timpanica con aspetto nodulopuntiforme.



Fig. 22. L'angiografia evidenzia un'area di ricca vascolarizzazione in un caso di glomo giugulare; nel corso dell'angiografia si è provveduto all'embolizzazione dello stesso (a destra). (Per gentile concessione del Prof. D. Megighian).



Bibliografia

- Bird C. R., Hasso A. N., Stewart C. E., Hinshaw D. B. jr., Thompson J. R., *Radiology*, 1983, **149**, 171.
 Ettore G. C., *Diagnostica per immagini dell'orecchio*, 1992, Idelson Liviana, Napoli.
 Farabola M., *Neuroradiology of the Ear: State of the Art*, in *Rivista di Neuroradiologia*, 1995, Edizioni del Centauro, Udine.
 Holland B. A., Brant-Zawadzki M., *Am. J. Neuroradiol.*, 1984, **5**, 291.
 Phelps P. D., Wright A., *Clinical Radiology*, 1990, **41**, 156.
 Salvolini U., Chiesa A., Ettore G. C., Maroldi C., Pandolfo L., Perugini S., *Otoradiologia*, 1994, Guido Gnocchi Editore, Napoli.
 Swartz J. D., *Imaging of the Temporal Bone*, 1986, Thieme Medical Publishers, New York.

ALBERTO TREGNAGHI

ORLISTAT: v. OBESITÀ** (coll. **4089-4090).

ORMONI [v. vol. X, coll. 1912-1947]

MECCANISMI DI AZIONE DEGLI ORMONI

SOMMARIO

PREMESSE

col. 4233

Il sistema endocrino quale trasmettitore, intercellulare e intracellulare, di informazioni (col. 4233). - Aspetti evolutivi della funzione endocrina (col. 4235). - Le strutture recettoriali e l'interazione ormone-recettore (col. 4236). - Classificazione degli ormoni e dei meccanismi di trasduzione recettoriale del segnale ormonale (col. 4239).

MEDIAZIONE DEL SEGNALE ENDOCRINO A LIVELLO DEGLI ORGANI E DELLE STRUTTURE CELLULARI BERSAGLIO

col. 4241

Interazione del segnale endocrino con recettori di membrana (col. 4241): Brevi richiami sulla struttura dei recettori di membrana. - Meccanismi di trasduzione transmembrana del segnale ormonale. - La mediazione intracellulare del segnale ormonale trasdotto dal recettore di membrana. - Interazione del segnale endocrino con recettori intracellulari (col. 4251): La superfamiglia dei recettori steroidei/tiroidei: domini funzionali e strutturali. - Interazione recettori-DNA. - Interazione dei recettori steroidei/tiroidei con i fattori basali di trascrizione. - I co-attivatori e i co-repressori nella regolazione degli effetti trascrizionali.

INTERRELAZIONI TRA DIVERSE FAMIGLIE DI RECETTORI ORMONALI

col. 4256

Prospettive fisiopatologiche e cliniche (col. 4256).

PREMESSE

Il sistema endocrino quale trasmettitore, intercellulare ed intracellulare, di informazioni.

Con il tumultuoso progredire delle spettacolari tecniche della biologia molecolare e con la trasposizione alla endocrinologia della metodologia propria della ingegneria genetica, le più recenti conquiste hanno consentito non solo la sintesi *in vitro* delle molecole ormonali ma anche la de-

finizione molecolare dei meccanismi che presiedono alla trasduzione del segnale ormonale a livello di specifiche strutture cellulari bersaglio effettrici dell'azione endocrina. Si sono così precisati gli eventi evocati dal messaggio ormonale, che nei diversi compartimenti intracellulari, si esprime con la attivazione di reazioni, di tipo stimolatorio od inibitorio, modulatrici di specifiche funzioni biologiche.

Alla luce dell'attuale patrimonio di conoscenze, biomolecolari e fisiologiche, l'apparato endocrino può essere definito quale sistema di comunicazione, intersistemico, intercellulare ed intracellulare, reciprocamente integrato con gli altri sistemi di comunicazione, il sistema nervoso ed il sistema immunitario, preposti al trasferimento di informazioni da un distretto all'altro dell'organismo, onde consentire specifiche reazioni adattative. Dalla variabile interazione tra questi tre sistemi di comunicazione che, con diversificati meccanismi, trasmettono messaggi ai molteplici compartimenti organici, si configura una complessa rete di segnali, che innescano gli eventi reattivi promossi dal variare delle condizioni ambientali, esogene ed endogene. Grazie alla interconnessione dei tre sistemi di trasmissione di segnali è garantito l'adattamento dell'organismo al mutare dell'ambiente, esterno ed interno, assicurando anche la sopravvivenza e la conservazione della specie.

Con il progredire delle conoscenze si è riconosciuta la funzione endocrina, oltre che alle ghiandole endocrine, intese secondo l'accezione classica, anche ad altre strutture cellulari che, tramite un prodotto riversato nell'ambiente extracellulare, trasferiscono informazioni a cellule finitime, delineandosi così un sistema paracrina. Inoltre, ancor più di recente, sono state identificate molecole che svolgono ruolo di segnale ormonale nel contesto della stessa cellula produttrice, configurandosi un sistema di trasmissione intracellulare di segnali, il sistema autocrino, modulatore di definite funzioni cellulo-specifiche (fig. 1).

In sintesi, l'organismo per l'espletamento delle sue reazioni omeostatiche dispone di una complessa rete di trasmissione di segnali (v. anche SEGNALI CELLULARI**), intersistemici, intercellulari ed intracellulari, i quali a livello delle strutture cellulari bersaglio sono coinvolti in un intenso traffico di messaggi, reciprocamente interdipendenti, che modulano definite attività e che si riflettono in reazioni complesse, di tipo sinergistico od antagonistico, modulando l'espressione di specifiche funzioni.

In ultima analisi, attività endocrine sono riconoscibili a livello di ogni stipite cellulare, le cui peculiari attività, geneticamente pre-determinate, si traducono in definite, specifiche, funzioni biologiche, grazie all'intervento adattativo dei diversi segnali veicolati dalle molecole a funzione ormonale.

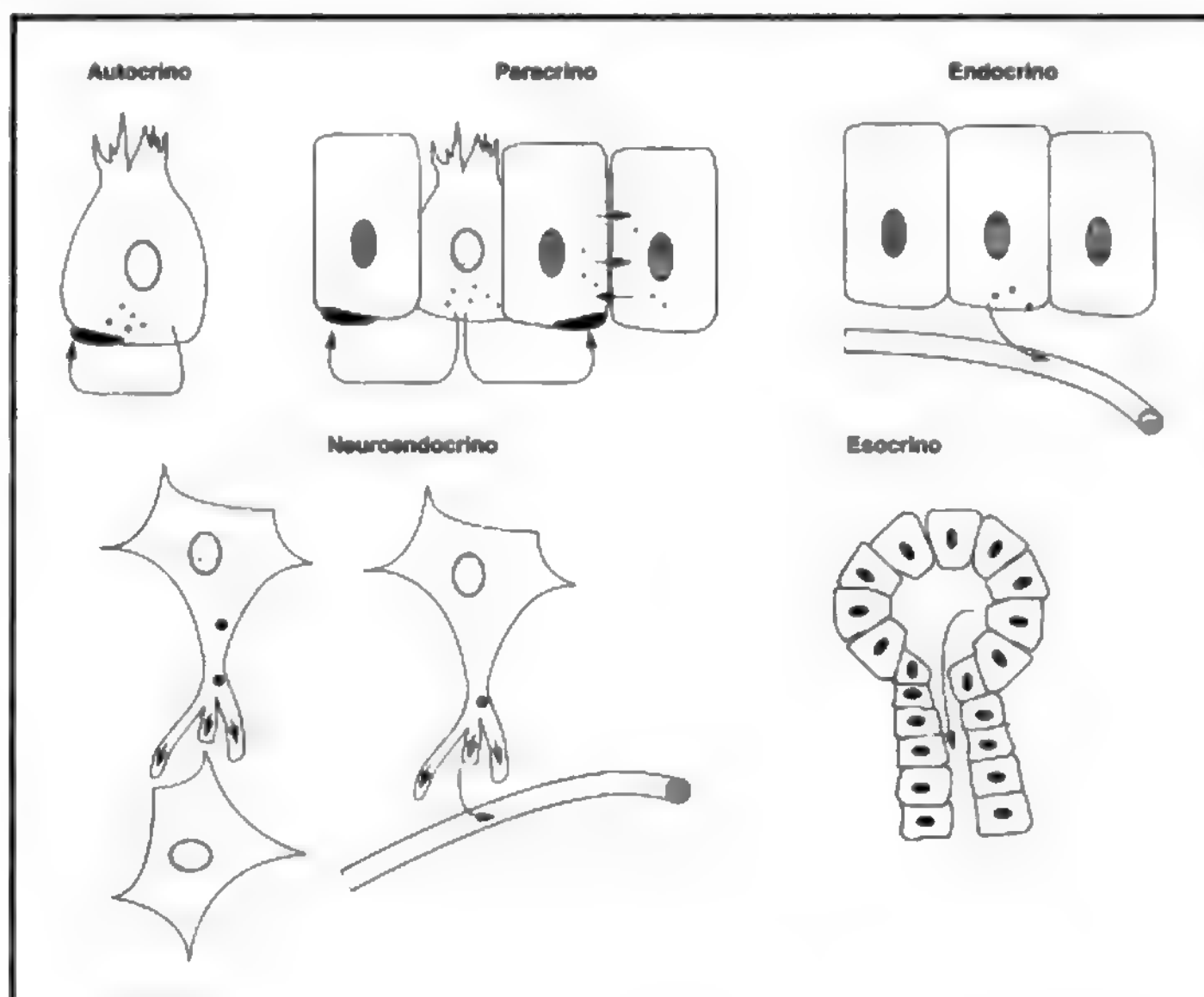


Fig. 1. Trasmissione del segnale ormonale. A differenza delle ghiandole esocrine, che secernono un composto che viene riversato all'esterno dell'organismo o comunque in spazi comunicanti con l'esterno, il sistema endocrino è costituito da strutture altamente specializzate o da specifici stipiti cellulari che secernono esigue quantità di peculiari molecole vettici di specifici messaggi, che vengono immesse nel torrente circolatorio ed evocano a distanza dal luogo di produzione specifiche reazioni a livello di specifici organi bersaglio, regolandone le funzioni. Messaggeri chimici di tipo ormonale possono essere trasmessi a cellule finitime a quelle produttrici del segnale stesso, delineandosi così il sistema paracrino. Inoltre, il segnale ormonale può essere trasmesso a strutture dislocate nell'ambito delle stesse cellule produttrici, configurandosi un sistema autocrino. Nel sistema neuroendocrino i messaggeri chimici a funzione ormonale, liberati da cellule con caratteristiche intermedie tra sistema nervoso e sistema endocrino, sono trasferiti tramite terminazioni assoniche sinaptiche oppure sono versati direttamente nel torrente circolatorio.

Aspetti evolutivi della funzione endocrina

Sul piano *evolutivo*, oggi si ritiene che i geni codificanti per le molecole ormonali preposte all'espletamento di specifiche funzioni biologiche siano andati incontro a duplicazioni, riarrangiamenti, mutazioni e delezioni, onde consentire lo svolgersi di attività sempre più complesse. Tali modificazioni genomiche hanno comportato la sintesi di molecole «evolute», che hanno acquisito specifiche funzioni endocrine, di ordine *regolatorio* e/o *adattivo*, al modificarsi dell'ambiente extracellulare.

Ad esempio, la presenza diffusa in tutti i vertebrati della ghiandola tiroide e degli ormoni da essa sintetizzati, le iodotiroine, suggerisce che queste molecole esplicino un ruolo ininterrotto nel corso dell'evoluzione. Probabilmente la funzione tiroidea, evolutivamente conservata nei poichilotermi, può essere identificata nell'accumulo da parte dell'organismo dello iodio disponibile nell'ambiente, per assolvere funzioni metaboliche. È da sottolineare che la funzione della tiroide, lenta, protratta, inizialmente incidentale, senza cioè un'influenza direzionale, e quindi non determinante, acquisisce il compito di segnale chimico nel corso della metamorfosi degli anfibii. E la sequenza temporale della metamorfosi degli anfibii è governata da meccanismi genetici che regolano l'espressione delle strutture recettoriali, differenzialmente distribuite nei vari tessuti. Così come, per quanto attiene il ruolo regolatorio del metabolismo energetico nei vertebrati, si può ritenere che nell'evoluzione dell'omeotermia gli or. tiroidei siano utilizzati come segnale chimico primario, acquisendo così quella che, negli uccelli e nei mammiferi, rappresenta la più cospicua ed evidente funzione.

L'analisi comparativa della sequenza aminoacidica che si osserva in alcune delle famiglie degli or. peptidici induce a ritenere che, per l'assunzione di nuove funzioni, molteplici duplicazioni genomiche, costituite da eventi di duplicazione e/o delezione, abbiano dato origine a quella lattoenica nelle diverse organizzazioni filitiche. È probabile che l'or. prolattina, rappresentante di questo gruppo sia un or. ancestrale, modificatosi all'attuale or. prolattina, sia l'or. dotato

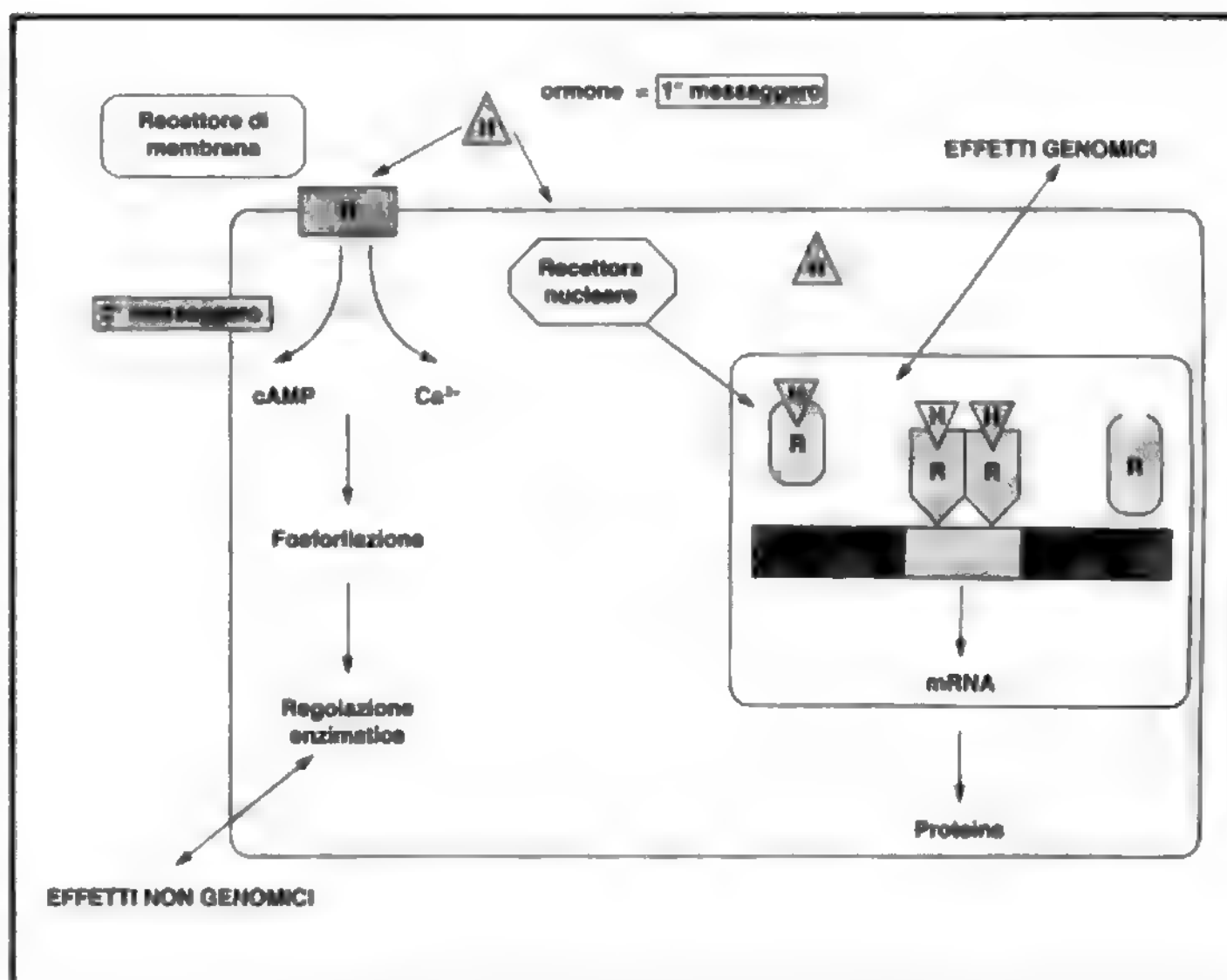
di funzioni stimolanti la crescita e l'eliminazione idrica urinaria, così come di altri effetti, quali quello uterotonico e galattobolico dell'ossitocina. Successivamente, un gene duplicativo è responsabile della comparsa degli or. ipofisari della crescita e, assai più tardivamente, nella evoluzione dei mammiferi compaiono gli or. lattoenici placentari, quale risultato di un'ulteriore duplicazione genica. E le moderne conoscenze in tema di endocrinologia molecolare sostengono questi postulati evolutivi della funzione ormonale.

Le strutture recettoriali e l'interazione ormonale-recettore

È noto che per l'espletarsi della funzione endocrina è necessaria a livello delle cellule effettrici una preliminare interazione delle molecole ormonali con uno specifico *recettore*, dislocato o sulla membrana cellulare o nell'ambito dei compartimenti intracellulari, preposto al riconoscimento del segnale ormonale ed alla sua trasduzione. L'interazione ormonale-recettoriale innesca così una cascata di eventi che si esprime in specifici effetti biologici (fig. 2).

In analogia alle tappe evolutive descritte per le molecole ormonali, anche per la struttura recettoriale variabilmente distribuita nei diversi distretti degli organi bersaglio è stata documentata una selettiva sequenza evolutiva. Ed in particolare, valutando comparativamente le omologie di sequenza fra i diversi domini proteici, più conservati in termini evolutivisti, sono stati definiti i complessi fenomeni di duplicazione dei geni codificanti i recettori ormonali. E così, dall'analisi evolutiva della transizione dagli invertebrati ai vertebrati, è stato possibile identificare un recettore primordiale (*Ancestral Receptor*), che rappresenterebbe il capostipite di un recettore cosiddetto *orfano*: trattasi di strutture variabilmente riscontrabili nel corso dei processi evolutivi, la cui presenza inizialmente è disgiunta da quella di sostanze con cui legarsi ma che durante la graduale tran-

Fig. 2. Interazione ormono-recettoriale nella trasmissione del segnale e nella trasduzione della funzione ormonale a livello delle strutture effettrici, citoplasmatiche e nucleari, degli organi bersaglio. La molecola ormonale (H), presente nell'ambiente extracellulare, interagisce a livello della cellula bersaglio con un recettore (R). Le molecole ormonali (primo messaggero) sono classificabili (tab. II) sia in funzione delle loro proprietà chimiche (idrosolubili e liposolubili), sia in ragione della localizzazione della struttura recettoriale (preposta al riconoscimento ed alla trasduzione del segnale ormonale) che può trovarsi nel contesto della plasmamembrana, recettore di membrana (R), od a livello nucleare, recettori nucleari (RR). La interazione degli ormoni idrosolubili con i recettori di membrana innescava la sintesi di un secondo messaggero che attiva specifiche reazioni della cellula bersaglio (reazioni effettrici non genomiche). L'interazione degli ormoni liposolubili con le sequenze nucleotidiche specifiche evoca reazioni modulatrici della sintesi di specifiche proteine (effetti genomici).



sizione in organismi sempre più complessi acquisiscono la capacità di interagire con molecole in grado di modificarne la funzione.

Si può ritenere, dunque, che la sequenza evolutiva degli o., e dei loro recettori, si sia realizzata quale risultato di duplicazioni geniche codificanti sia per gli o. che per i recettori. In alcuni casi, peraltro, appare chiaro che l'o. compare prima e che la risposta cellulare, se non il recettore, compare successivamente. Per esempio, la prolattina compare prima dei mammiferi e l'o. antidiuretico appare, nelle specie acquatiche, circa 150 milioni di anni prima della loro migrazione terrestre.

Nonostante la molteplicità dei segnali ormonali e la variabilità della loro struttura e funzione, e nonostante la varietà delle strutture recettoriali, gli effetti biologici indotti dal segnale ormonale sono riconducibili in linea generale: a) a fenomeni innescati a livello nucleare, modulando l'espressione genica (effetti *genomici*), oppure b) a fenomeni regolatori della funzione ormonale, operanti in maniera indipendente dai meccanismi nucleari (effetti *non genomici*) (tab. I). Questi ultimi possono, peraltro, rappresentare l'effetto di funzioni geneticamente modulate. Ad esempio, l'azione ubiquitaria della molecola iodotironinica può essere interpretata alla luce delle più recenti acquisizioni che, sul piano molecolare, rendono ragione sia dell'azione pluri-sistemica sia dei molteplici effetti morfogenetici e metabolici espletati dall'o. tiroideo. E sulla base di queste considerazioni generali è possibile interpretare l'azione ormonale non più in termini di specificità della struttura chimica della molecola ormonale, ma in termini di specificità delle variabili strutture recettoriali.

In sintesi, l'azione biologica ormonale è riconducibile ad una preliminare interazione tra la molecola ormonale e le specifiche strutture recettoriali. Il formarsi del complesso ormone-recettore comporta un'alterazione conformazio-

nale delle strutture recettoriali, così come confermato anche dall'analisi cristallografica. Il modificarsi della configurazione del recettore rappresenta il *primum movens* di una cascata di eventi che, in ultimo, si traducono nella trasmissione di specifiche informazioni che si esprimono in specifici effetti biologici, variabilmente modulati sia dal patrimonio genetico dei tessuti bersaglio, sia dal microambiente organospecifico, che condiziona l'espletarsi delle diverse funzioni cellulari così come la variabilità della risposta allo stesso segnale.

TAB. I. PRINCIPALI CARATTERISTICHE CHE DISTINGUONO GLI EFFETTI GENOMICI E NON GENOMICI DEGLI ORMONI TIROIDEI

	Effetti non genomici	Effetti genomici
Interazione con i recettori nucleari	Indipendenza	Mediazione
Tempo di latenza	Secondi o minuti, fino ad 1 ora	Sufficientemente protratto per consentire l'azione trascrizionale
Struttura iodotironinica - Attività	T ₄ , T ₃ , rT ₃ , T ₂ : possono essere attive	T ₃ unica forma attiva
Entità dell'effetto	< 1 fino a più volte di induzione	> 1
Meccanismo di trasduzione del segnale	Coinvolgimento di un secondo messaggero (cAMP, calmodulina, fosfatidilinositolo, proteinchinasi)	Scarsa o minima dipendenza da meccanismi di trasduzione tradizionali

ORMONI

Classificazione degli ormoni e dei meccanismi di trasduzione recettoriale del segnale ormonale.

Sulla base delle più recenti innovative informazioni molecolari, succintamente sopra descritte, la tradizionale *classificazione delle molecole ormonali* basata sulla *struttura chimica* dell'o. (aminoacidica, peptidica, proteica, steroidea, lipidica) può oggi essere integrata catalogandole sia in base alle *proprietà chimiche*, in funzione della loro solubilità (*idrosolubili* e *liposolubili*), sia in ragione del loro *meccanismo d'azione* e segnatamente in funzione della *sede* della struttura recettoriale con la quale interagiscono, che può trovarsi a livello della superficie cellulare oppure all'interno della cellula (tab. II).

Gli *agenti peptidici, proteici e glicoproteici* che fungono da o. oppure da fattori di crescita (v.*; v.**), unitamente con i trasmettitori, quali le catecolamine e l'acetilcolina, caratterizzati dall'essere carichi elettricamente nonché dalla *proprietà idrofila*, costituiscono il *gruppo I* e tipicamente interagiscono con *recettori di membrana* altamente selettivi, posizionati nel contesto della plasmamembrana. L'interazione ormone-recettore a livello della plasmamembrana comporta l'attivazione di «secondi messaggeri», che costituiscono i trasduttori del segnale ormonale, che si esprime in effetti metabolici molteplici (v. sotto).

Il *gruppo II* di o., che comprende gli o. steroidei del surrene e delle gonadi, così come gli o. tiroidei, retinoidi e Vit. D, è caratterizzato dalla interazione con *recettori intracellulari*, sia a livello nucleare sia a livello citoplasmatico, mediante legami ad alta affinità. Gli o. che interagiscono con gli specifici recettori intracellulari influenzano in maniera più immediata l'espressione dei geni bersaglio, agendo direttamente a livello trascrizionale.

I due principali modelli di meccanismo d'azione ormonale, già proposti alla fine degli anni '60, sono stati sviluppati a metà degli anni '80 con l'acquisizione di una massa d'informazioni inerenti sia la sequenza nucleotidica dei geni codificanti per i vari recettori sia la loro struttura proteica. Inoltre, mediante sofisticati sistemi *in vitro*, è stato possibile ottenere una dissezione molecolare dei vari domini funzionali dei diversi recettori e quindi modificare i singoli domini recettoriali, definendone le specifiche proprietà funzionali espletate in sistemi biologici complessi. Pertanto oggi possiamo ritenere che per l'esplicarsi del-

TAB. II. CLASSIFICAZIONE DELLE MOLECOLE ORMONALI IN FUNZIONE DELLE LORO PROPRIETÀ CHIMICHE E DEL LORO MECCANISMO D'AZIONE

	Gruppo I	Gruppo II
Struttura chimica	Polipeptidi Proteine Glicoproteine Catecolamine Prostaglandine	Steroidi Iodotironine Vitamina D Retinoidi
Solubilità	Idrosolubili	Liposolubili
Legame a plasmoproteine di trasporto	No	Sì
Azione biologica	Breve (minuti)	Protratta (ore, giorni)
Interazione recettoriale	Recettori di membrana	Recettori intracellulari
Meccanismo del segnale ormonale	2. messaggeri (cAMP, Ca ²⁺ , IP ₃)	Complesso ormone-recettore

TAB. III. FATTORI MODULATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA ALL'AZIONE ORMONALE E POTENZIALI MOMENTI PATOGENETICI COINVOLTI IN ANOMALIE QUANTITATIVE E QUALITATIVE DELL'ESPRESSIONE DEL SEGNALE ORMONALE

Ormone	— Concentrazione — Effetto agonistico o antagonistico su definite funzioni biologiche
Organo bersaglio	— Diversificata espressione del gene recettoriale — Presenza di enzimi attivanti e/o inattivanti — Interazione con proteine leganti (extra- o intracellulari)
Recettore	— Localizzazione (citoplasmatica, Nucleare) — Isoforme («Splicing alternativo», Duplicazione genica) — Dimerizzazione (Etero/Omodimerizzazione, Polarità)
Fattori nucleari	— Isoforme antagoniste — Squelcing
DNA	— Interazione con elementi responsivi (Affinità, Complessi negativi, Numero di copie, Posizione, Adiacenze altri elementi)
Geni bersaglio	— Fattori gene-specifici — Fattori cellule-specifici

l'azione ormonale sia necessario, oltre ai prerequisiti della disponibilità di adeguate concentrazioni ormonali e della presenza nonché della integrità di specifici recettori, l'intervento di molteplici fattori che agiscono a diversi livelli (realizzandosi una fitta rete di interazioni) nell'ambito dello specifico contesto cellulo- o tessuto-specifico.

Nella tab. III sono schematizzate le possibili variabili che possono influenzare l'esprimersi della risposta ormonale. Si può disegnare una sofisticata tessitura che sostiene e regola finemente i fondamentali eventi biologici implicati nei processi di proliferazione, sviluppo e differenziamento.

Dalla tabulazione dei vari fattori che possono intervenire nel regolare l'attività della molecola ormonale, dotata di funzione *agonista* o *antagonista*, in ragione anche della sua *concentrazione* a livello delle strutture bersaglio, si può evincere che l'effetto biologico può essere modulato a diversi livelli: *a)* in corrispondenza del *tessuto bersaglio*, a seconda della diversificata distribuzione, quantitativa e qualitativa, del recettore specifico (in termini di espressione del gene codificante il recettore), oppure a seconda dell'intervento di diversi *sistemi enzimatici* che attivano od inattivano gli eventi indotti dall'interazione ormone-recettore; *b)* a livello della *struttura recettoriale*, la cui attività può essere influenzata dalla presenza di varie isoforme dello stesso recettore (originatesi sia a seguito di «*splicing alternativo*» dello stesso gene, oppure con un meccanismo di duplicazione genica), nonché dal formarsi nel microambiente cellulare di complessi recettoriali dimerici, sia *omodimerici* che *eterodimerici*; *c)* a livello *nucleare*, dove intervengono alcuni fattori trascrizionali che influenzano la trascrizione di base dei geni bersaglio dell'azione ormonale; *d)* inoltre a livello del *DNA*, quindi nella *regione regolatrice del gene bersaglio*, la presenza di specifici segmenti nucleo-

tidici, denominati *Hormone Response Elements* (HRE), determina il variare dell'affinità per una specifica struttura recettoriale, influenzando la risposta biologica. Quest'ultima è regolata anche dalla molteplicità e dall'orientamento, lungo il filamento di DNA, dei segmenti nucleotidici costitutivi degli HRE, che possono anche strutturarsi in unità ripetute, che risultano costituite da unità identiche oppure da unità non identiche ma complementari, definite *palindromi*. Inoltre, la capacità del recettore di interagire con il DNA è influenzata dalla presenza di altri fattori che si legano a sequenze adiacenti o viciniori agli HRE.

Il complesso ormone-recettore, dunque, inteso come unità funzionale, induce a livello della regione regolatrice dei geni bersaglio la trascrizione specifica di un gene, in funzione anche dell'intervento di altri fattori trascrizionali specifici del gene stesso oppure presenti nel particolare contesto cellulare.

In sintesi, la risposta ormonale è modulata, nella sua funzione agonistica o antagonista, sia dalla *concentrazione dell'o.* nell'ambiente extracellulare sia dalla presenza nel *tessuto bersaglio* di strutture recettoriali specifiche e dalla loro variabile distribuzione, qualitativa e quantitativa. Inoltre, la funzione ormonale, in termini agonistici o antagonisti, può essere regolata dall'intervento di diversi *sistemi enzimatici*, attivatori oppure inibitori, così come dal variare del *microambiente*, che modula, a livello dei segmenti nucleotidici costitutivi della regione regolatrice dell'evento trascrizionale, la integrazione ormono-recettoriale.

MEDIAZIONE DEL SEGNALE ENDOCRINO A LIVELLO DEGLI ORGANI E DELLE STRUTTURE CELLULARI BERSAGLIO

Interazione del segnale endocrino con recettori di membrana

Brevi richiami sulla struttura dei recettori di membrana

Gli o. del gruppo I, come si è detto sopra, interagiscono con recettori di membrana, la cui funzione è quella di trasferire tramite la *mediazione di un secondo messaggero* il segnale ormonale dal compartimento extracellulare alle strutture effettrici intracellulari, ove il messaggio viene trasdotto evocando specifici effetti biologici (tab. IV e V). Nella fig. 3 è rappresentata schematicamente la struttura dei principali recettori di membrana (v. anche: RECETTORI [v.*; v.**]). I domini funzionali delle strutture recettoriali sono catalogabili in tre principali gruppi, in ragione della loro localizzazione: *extra-cellulare*, *transmembrana* ed *intracellulare*.

La porzione *extracellulare* del recettore, deputata all'interazione con la molecola ormonale, può essere del tutto esterna alla membrana cellulare oppure essere dislocata all'interno di quest'ultima. Le molecole ormonali possono legarsi al recettore, in forma monomerică oppure dimerica, proprio in questa sede. L'interazione ormone-recettore comporta il verificarsi di alterazioni conformazionali del recettore, che si estendono tramite il dominio *transmembrana* al dominio *intracellulare*.

Le modificazioni all'interno del *dominio transmembrana* costituiscono l'*evento innescante i complessi fenomeni post-recettoriali*. Le porzioni transmembrana di questa classe di recettori sono altamente idrofobiche, proprio al fine di facilitare la loro interazione con la membrana plasmatica.

Il dominio *intracellulare* svolge funzioni effettrici, trasmettendo con diverse modalità informazioni all'interno del citoplasma, questi meccanismi di trasmissione e trasduzione del segnale implicano l'*attivazione di un secondo messaggero*, quale ad es. l'adenil- o la guanilciclasi, la fosfolipasi A₂ oppure C, le tirosinchinasi, così come i canali del calcio. È da sottolineare che in diverse evenienze, ed in funzione del tipo di recettore di membrana coinvolto, possono attivarsi molteplici substrati in variabili combinazioni.

Inoltre, le complesse cascate di eventi innescati dai mediatori intracellulari consentono la *cospicua amplificazione della risposta ai segnali extracellulari*, con la possibilità di attivare più di una cascata.

TAB. IV. PRINCIPALI SECONDI MESSAGGERI PREPOSTI ALLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE ORMONALE

2° messaggero	Effetto ormonale
Sistema adenilato-ciclasi AMP ciclico	<i>stimolatorio</i> : β-adrenergico: GRH; CRH; VIP; Prostaglandine (E, D, I); glucagone; vasopressina; LH; FSH; TSH; gonadotropina corionica (CG); ACTH; PTH. <i>inibitorio</i> : α-adrenergico; oppiodi; somatostatina; angiotensina II; acetilcolina (muscarinico); dopamina.
Fosfolipasi C, inositolo trifosfato-Ca ²⁺ , proteinchinasi C	α-adrenergico; GnRH; TRH; dopamina; leucotrieni; vasopressina; bradichinina; acetilcolina; sostanza P; neuropeptide Y; endotelina; PTH; angiotensina II.
Tirosinchinasi	insulina; fattore di stimolazione dei macrofagi; fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF).
Guanilciclasi	fattore natriuretico atriale; acetilcolina; istamina; bradichinina; fattore rilassante di derivazione endoteliale (EDRF).

Meccanismi di trasduzione transmembrana del segnale ormonale

Esistono tre famiglie principali di recettori di membrana, ciascuna delle quali trasduce segnali extracellulari con meccanismi diversificati (fig. 4).

1) I recettori preposti alla trasduzione del segnale ormonale modulata dalla presenza di *canali ionici* sono implicati nelle rapide segnalazioni sinaptiche fra cellule eccitabili elettricamente. Questo tipo di trasduzione del segnale è

TAB. V. RISPOSTE CELLULARI AL SEGNALE ORMONALE TRASDOTTO DALL'AMP CICLICO

Tessuto bersaglio	Ormone	Risposta principale
Tiroide	o. tireostimolante (TSH)	sintesi e secrezione dell'o. tiroideo
Surrene	o. adrenocorticotropo (ACTH)	secrezione di cortisolo
Ovaio	o. luteinizzante (LH)	secrezione di progesterone
Muscolo	adrenalina	demolizione del glicogeno
Cuore	adrenalina	aumento della frequenza e della forza di contrazione cardiaca
Tessuto osseo	paratormone (PTH)	riassorbimento dell'osso
Fegato	glucagone	demolizione del glicogeno
Rene	vasopressina	riassorbimento di acqua
Tessuto adiposo	adrenalina, ACTH, glucagone, TSH	demolizione dei trigliceridi

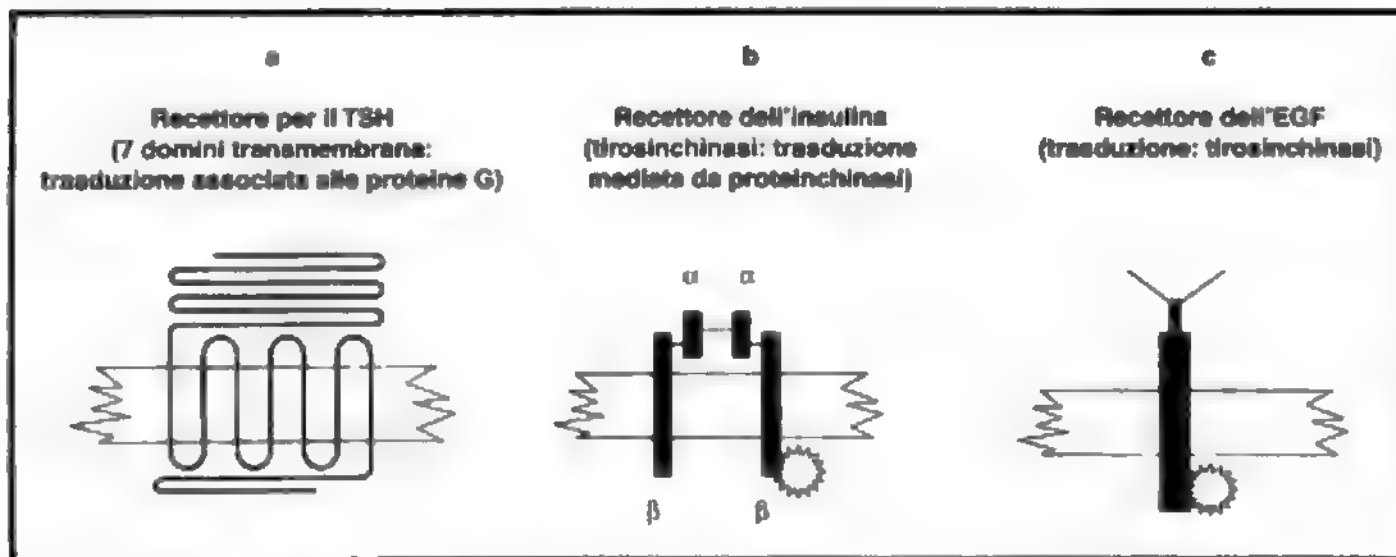


Fig. 3. Schematizzazione della struttura dei recettori di membrana. L'interazione della molecola ormonale, in forma monomérica o dimerica, che si lega al segmento extracellulare del recettore, comporta modificazioni conformazionali che si estendono tramite il segmento transmembrana, altamente idrofobico, al dominio intracellulare che svolge funzioni effettrici.

attivato da un esiguo numero di neurotrasmettitori che, legandosi alle proteine recettoriali, aprono o chiudono temporaneamente il canale ionico, alterando la permeabilità della membrana plasmatica e quindi l'eccitabilità della membrana postsinaptica.

2) I recettori la cui funzione è regolata da *proteine G* (v.***) agiscono indirettamente per modulare l'attività di una proteina bersaglio legata alla membrana, rappresentata da un enzima o da un canale ionico. Infatti, la interazione fra il recettore e la proteina bersaglio è mediata da una proteina G. L'attivazione della proteina bersaglio altera la concentrazione di uno o più mediatori intracellulari (se la proteina bersaglio è un enzima), oppure altera la permeabilità ionica della membrana plasmatica (se la proteina bersaglio è un canale ionico). Tutti i recettori funzionalmente legati a proteine G appartengono ad una grande superfamiglia di proteine che presentano sette domini dislocati nel

contesto della lamina costitutiva della membrana cellulare (v. RECETTORI [v.; v.*; v.**]).

3) I recettori la cui attività di trasduzione è regolata da *enzimi* funzionano direttamente come enzimi, oppure sono associati ad enzimi. La maggior parte sono proteine transmembrana, a passaggio singolo, con il sito che lega la molecola ormonale all'esterno della cellula (dominio extracellulare) ed il sito catalitico all'interno (dominio intracellulare). L'interazione della molecola ormonale con il dominio extracellulare del recettore comporta l'attivazione del dominio catalitico intracellulare, inattivo in assenza dell'o.

Gli enzimi coinvolti nella trasmissione del segnale sono, in genere, delle *proteinchinasi* che attivate dalla interazione ormono-recettoriale fosforilano proteine specifiche nella cellula bersaglio. Mediante la fine regolazione di cascate di fosforilazioni proteiche, la maggior parte dei segnali viene trasmessa, tramite la interazione di una serie di altre pro-

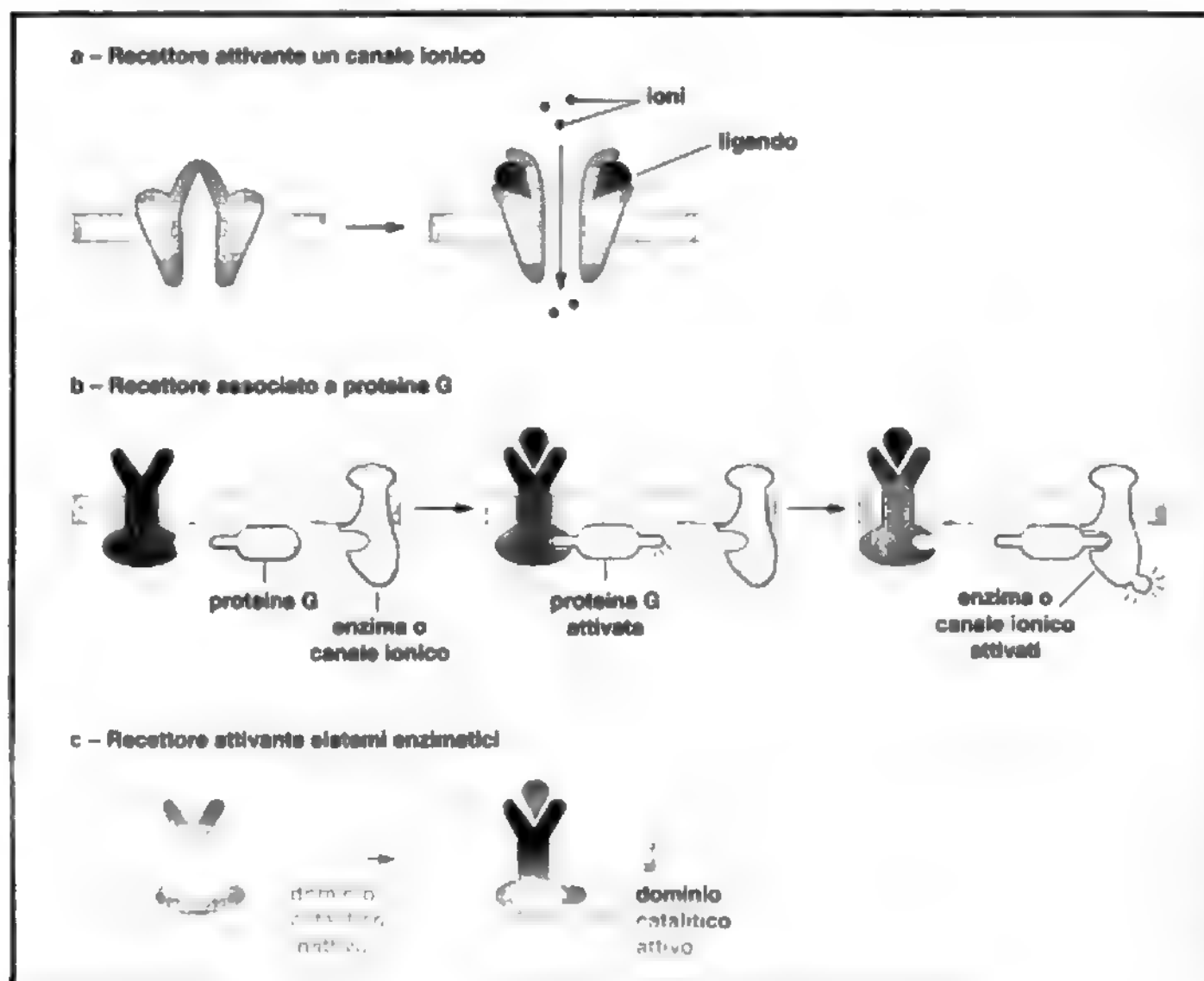


Fig. 4. Classi dei recettori di membrana. La trasmissione e la trasduzione del segnale all'interno del citoplasma comporta l'attivazione di un *secondo messaggero*, come canali ionici (a), proteine G (b), sistemi enzimatici (c). a) L'interazione dell'o. con le strutture recettoriali, modulata dalla presenza di canali di calcio, comporta l'apertura dei canali stessi modificando la permeabilità della membrana e quindi la funzione. b) I recettori funzionalmente legati alle proteine G, interagendo con la molecola ormonale, inducono le attività di una proteina bersaglio legata alla membrana, rappresentata da un enzima o da un canale ionico. c) La trasmissione recettoriale modulata da sistemi enzimatici, in genere *proteinchinasi*, è attivata dall'interazione dell'o. con il dominio extracellulare, che tramite l'attivazione dell'unità catalitica, allo stato inattivo in assenza di o., presiede alla fosforilazione di specifiche proteine nelle cellule bersaglio. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland).

teine, dalla superficie cellulare al nucleo, modulando così l'espressione genica. La molteplicità di tali processi fosforilativi, a livello di substrati diversi, consente l'esplicarsi di risposte cellulari a più segnali, reciprocamente integrantesi, conseguendosi così un coordinamento delle attività tessutali necessarie per specifici adattamenti a variazioni ambientali.

La mediazione intracellulare del segnale ormonale trasdotto dal recettore di membrana

Avviene con modalità diverse a seconda che siano in gioco recettori legati a proteine G o recettori collegati ad enzimi.

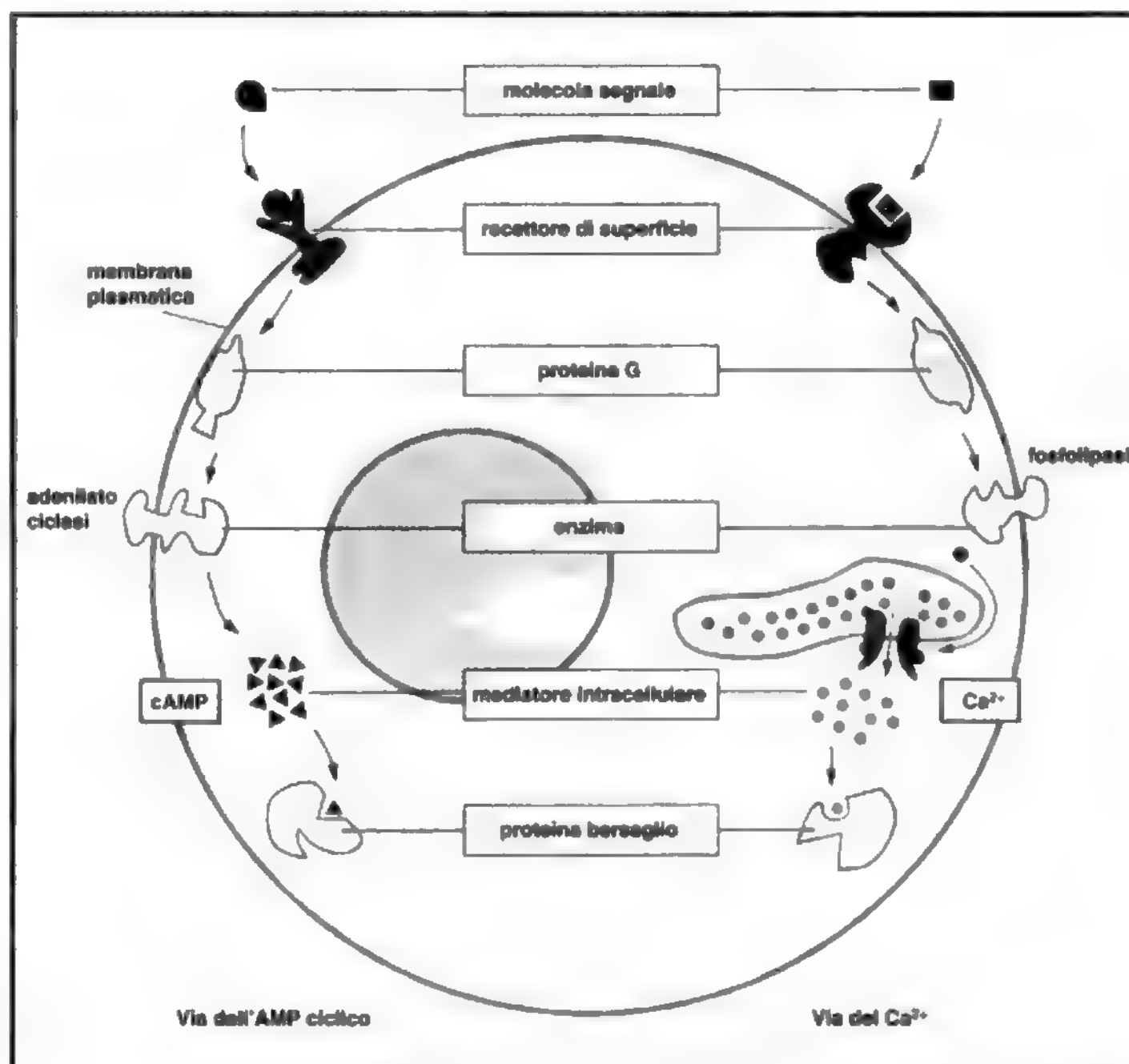
Mediazione di segnali ormonali trasdotti da recettori legati a proteine G. – I recettori legati a proteine G mediano le risposte cellulari di un'ampia varietà di molecole segnale, compresi o., neurotrasmettitori e mediatori locali, molto diverse per struttura e per funzione. Nonostante la diversità chimica e funzionale delle molecole segnale che si legano alle strutture della membrana cellulare, tutti i recettori noti funzionalmente legati a proteine G hanno una struttura simile e sono correlati evolutivamente. Esistono due vie principali, tramite le quali l'attivazione di questi recettori determinata dalla interazione con la molecola ormonale comporta il prodursi di mediatori intracellulari di esigue dimensioni: la *via dell'AMP ciclico* e la *via del Ca^{2+}* . In entrambi i casi il legame di una molecola segnale determina il variare della conformazione del dominio citoplasmatico del recettore, variazione cui consegue il legarsi di una proteina G e la successiva attivazione (o inattivazione) di un enzima della membrana plasmatica (fig. 5). Al pari di altri

mediatori intracellulari, sia l'AMP ciclico che il Ca^{2+} , i secondi messaggeri, trasmettono il segnale agendo da effettori allosterici: cioè si legano a proteine specifiche della cellula, alterandone la conformazione, e tale effetto si esprime nella regolazione di specifiche funzioni biologiche.

1. Via dell'AMP ciclico. – L'AMP ciclico (cAMP) viene prodotto direttamente per attivazione dell'enzima adenilato ciclasi. Per poter svolgere la funzione di mediatore intracellulare, la concentrazione di AMP ciclico (normalmente $< 10^{-7} M$) deve aumentare, e rapidamente diminuire, in risposta a segnali extracellulari. Infatti, a seguito della stimolazione ormonale, i livelli di cAMP variano di cinque volte in pochi secondi. Questa capacità di rapida risposta richiede che la sintesi rapida della molecola sia bilanciata da una rapida degradazione. Ed infatti l'AMP ciclico origina dalla conversione dell'ATP intracellulare ad opera dell'enzima *adenilato ciclasi* legato alla membrana plasmatica ed è rapidamente e continuamente degradato da una (o più) *AMP ciclico fosfodiesterasi*, che catalizza la reazione idrolitica da AMP ciclico ad adenosina 5' monofosfato (5'-AMP). La mediazione dell'azione ormonale tramite la via dell'AMP ciclico è operante in diversi tessuti bersaglio (tab. V).

L'AMP ciclico esercita i suoi effetti nelle cellule animali soprattutto attivando l'enzima *proteinchinasi dipendente da AMP ciclico* (chinasi A), che catalizza il trasferimento del gruppo fosfato terminale da ATP a residui di aminoacido serina o treonina, specifici di proteine selezionate. La proteinchinasi A si trova in tutte le cellule animali e si ritiene sia responsabile di tutti gli effetti dell'AMP ciclico nella maggior parte di queste cellule (fig. 6). Allo stato inattivo la chinasi A è costituita da un complesso formato da due subunità *catalitiche* e due subunità *regolatrici*, che legano l'AMP ciclico. L'AMP ciclico si lega alle subunità regolatrici della proteinchinasi, provocando il distacco delle subunità catalitiche.

Fig. 5. Schematizzazione dell'attivazione del secondo messaggero che trasmette il segnale agendo da effettore allosterico. L'interazione di molecole segnale (ormoni, mediatori locali, neurotrasmettitori) con strutture recettoriali funzionalmente legate a proteine G comporta il variare della conformazione del dominio citoplasmatico del recettore, cui consegue il legarsi di una proteina G e la successiva attivazione (od inattivazione) di un enzima della membrana plasmatica: per la via dell'AMP ciclico l'enzima è l'adenilato ciclasi che produce direttamente l'AMP ciclico, mentre per la via del Ca^{2+} l'enzima è una fosfolipasi che produce *inositolo trifosfato* che a sua volta rilascia Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico.



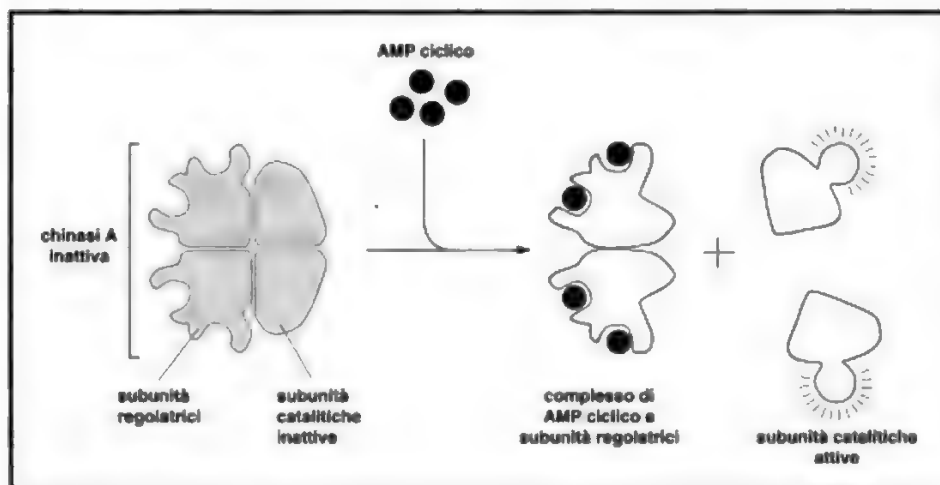


Fig. 6. Attivazione della proteina chinasi A da parte dell'AMP ciclico. Il legame dell'AMP ciclico con le subunità regolatrici della chinasi A inattiva comporta il dissociarsi dal complesso delle unità catalitiche, che sono così attivate per fosforilare specifici substrati proteici. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland).

dissociandole dal complesso. Le subunità catalitiche, dissociatesi dalla chinasi inattiva, sono così attivate per fosforilare specifici substrati proteici.

2. *Via del Ca^{2+}* . – Il Ca^{2+} agisce da messaggero intracellulare in un'ampia varietà di risposte cellulari. Sono state definite due vie di trasmissione del segnale veicolato dal Ca^{2+} , una utilizzata soprattutto da cellule elettricamente attive (eccitabili) e l'altra operante in quasi tutte le cellule eucariotiche. La prima di queste vie (fig. 7, A) è stata studiata in maniera assai approfondita nelle cellule nervose; mentre per la seconda via, ubiquitaria, utilizzata da tutte le cellule, il legame di molecole segnale extracellulari a recettori della superficie cellulare provoca il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico, tramite un altro messaggero intracellulare, l'*inositolo trifosfato*, IP_3 (fig. 7, B), derivato dagli inositolofosfolipidi delle membrane cellulari. Gli inositolofosfolipidi rivelatisi più importanti nella trasduzione del segnale sono due derivati fosforilati del *fosfatidilinositolo* (PI), il PI-fosfato ed il PI-bisfosfato, rispettivamente PIP e PIP_2 , localizzati soprattutto nella membrana interna del doppio strato lipidico della membrana plasmatica (fig. 8, A).

La catena di eventi che porta alla demolizione di PIP_2 inizia con il legame di una molecola segnale ad un recettore legato a proteine G nella membrana plasmatica. È stato dimostrato che più di 25 recettori di membrana utilizzano questa via di trasduzione; numerosi esempi di risposte mediate con questa modalità sono riportati nella tab. IV. Sebbene il processo di attivazione non sia stato definito nei suoi meccanismi causali si ritiene che, al pari della via dell'AMP ciclico, a livello della membrana plasmatica operi lo stesso tipo di meccanismo a più passaggi. Un recettore attivato stimola una proteina G trimerica chiamata *Gq*, che a sua volta attiva una fosfolipasi C specifica, denominata *fosfolipasi C- β* . Questa fosfolipasi C attivata taglia il PIP_2 per generare due prodotti: *inositolo trifosfato* e *diacilglicerolo* (fig. 8, B), il primo dei quali provoca l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare ed il secondo l'attivazione della proteina chinasi C.

Il recettore del Ca^{2+} più studiato, in relazione all'azione ormonale, è la *calmodulina* (fig. 9), presente in tutte le cellule eucariotiche, che agisce da recettore polivalente del Ca^{2+} intracellulare (v. CALMODULINA*). È costituita da una singola catena polipeptidica,

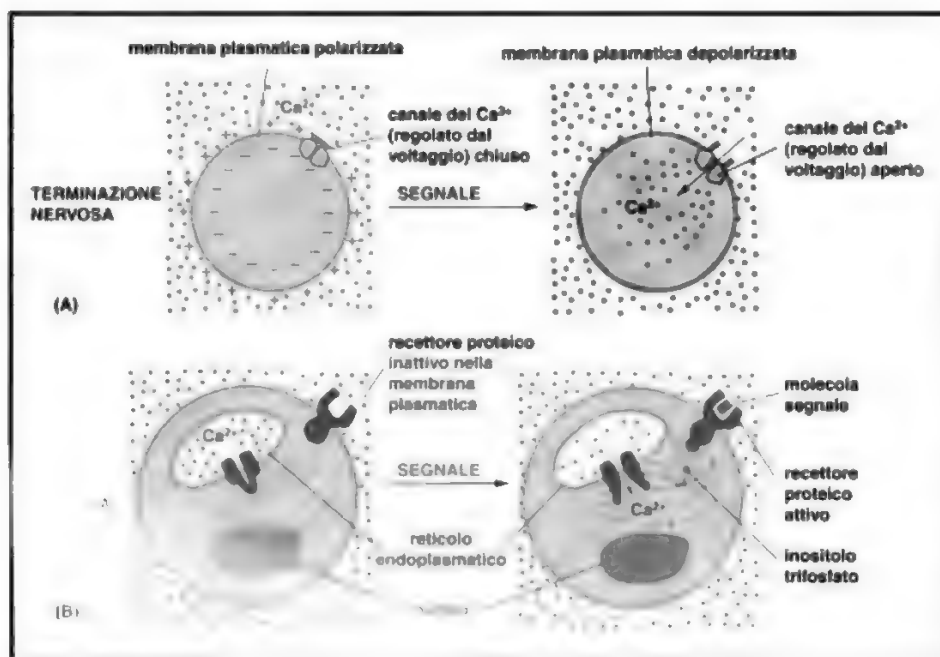
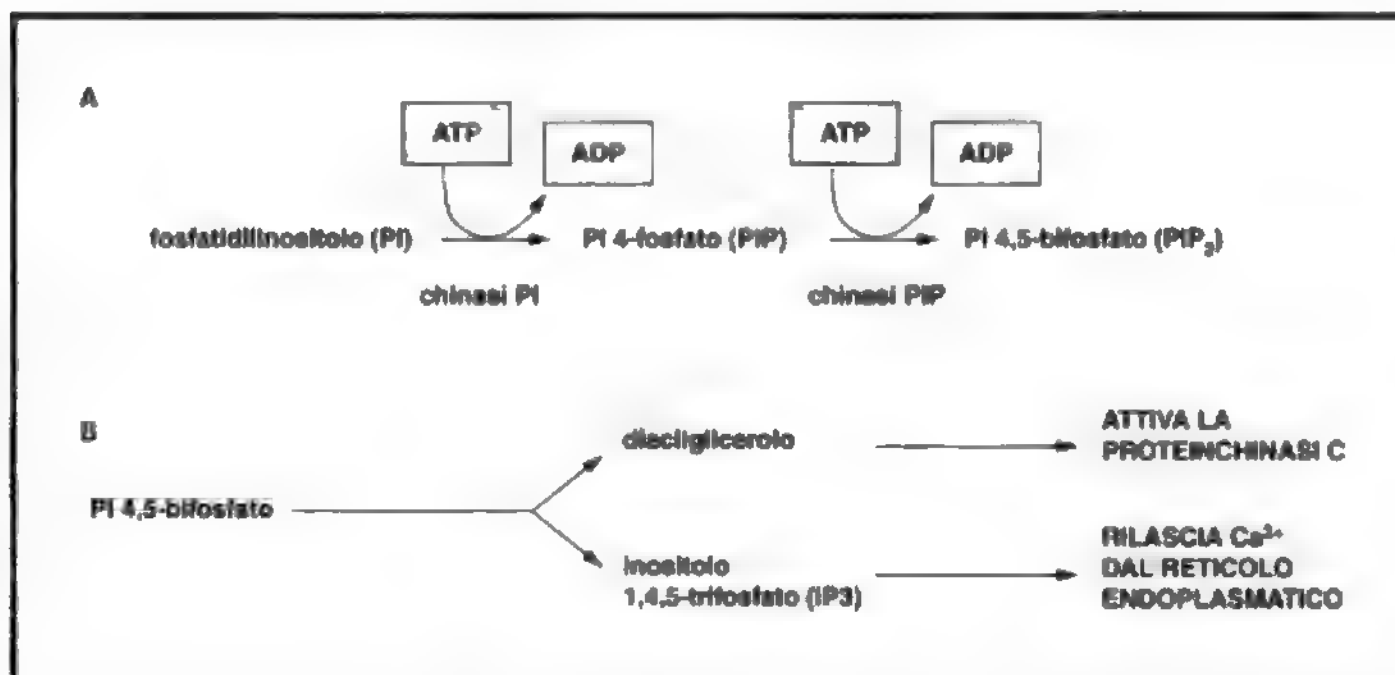


Fig. 7. Schematizzazione delle due vie tramite le quali il Ca^{2+} può agire da messaggero intracellulare in risposta a segnali extracellulari. A) Il Ca^{2+} entra attraverso canali del Ca^{2+} (regolati dal voltaggio) dal fluido extracellulare in una terminazione nervosa, quando la membrana della terminazione nervosa è depolarizzata da un potenziale d'azione. B) Il legame di una molecola segnale extracellulare ad un recettore di superficie genera *inositolo trifosfato*, che stimola il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico. (Da Alberts et al., 1994, per gentile concessione della Garland).

Fig. 8. Schematizzazione del ruolo degli inositilofosfolipidi nella trasduzione del segnale ormonale. Il fosfatidilinositolo fosfato (PIP) ed il fosfatidilinositolo bifosfato (PIP₂), localizzati nel contesto del doppio strato lipidico della membrana plasmatica (A), a seguito dell'interazione di una proteina G dimerica vanno incontro ad un processo idrolitico, che comporta la formazione di due mediatori intracellulari (B): inositolo trifosfato (IP₃), che diffonde nel citosol e fa rilasciare Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico, ed il diacilglicerolo, che rimane nella membrana ed interviene nel favorire l'attivazione dell'enzima proteinchinasi C.



altamente conservata, di circa 150 aminoacidi, caratterizzata dalla presenza di quattro siti di legame ad alta affinità per il Ca²⁺. L'attivazione allosterica della calmodulina da parte del Ca²⁺ è analoga all'attivazione allosterica della chinasi A da parte dell'AMP ciclico. Peraltro, il complesso Ca²⁺/calmodulina non svolge attività enzimatica di per sé, ma agisce legandosi ad altre proteine. La maggior parte degli effetti del complesso Ca²⁺/calmodulina è, infatti, mediata da proteinchinasi dipendenti da Ca²⁺/calmodulina (chinasi CaM). Queste chinasi fosforilano residui di serina o treonina di substrati proteici e, al pari dell'AMP ciclico, la risposta di una cellula bersaglio ad un aumento della concentrazione di Ca²⁺ libero nel citosol è in funzione della disponibilità di proteine regolate dalle chinasi CaM presenti nell'ambiente intracellulare. Nel muscolo liscio, ad es., il complesso Ca²⁺/calmodulina è in grado di attivare le chinasi specifiche della catena leggera della miosina e questa attivazione provoca la contrazione in seguito ad un processo fosforilativo della stessa catena leggera.

I complessi Ca²⁺/calmodulina sono, inoltre, in grado di interagire ed attivare una proteinchinasi Ca²⁺/calmodulina dipendente che svolge un ruolo significativo nella trasduzione del segnale nervoso. Questo tipo di chinasi Ca²⁺/calmodulina dipendente è particolarmente abbondante nel sistema nervoso, dove appare determinante per la sintesi ed il rilascio di neurotrasmettitori. L'attivazione di questa chinasi specifica induce *autofosforilazione* della stessa chinasi, la quale converte l'enzima in una forma indipendente dal complesso Ca²⁺/calmodulina e «cattura» la calmodulina.

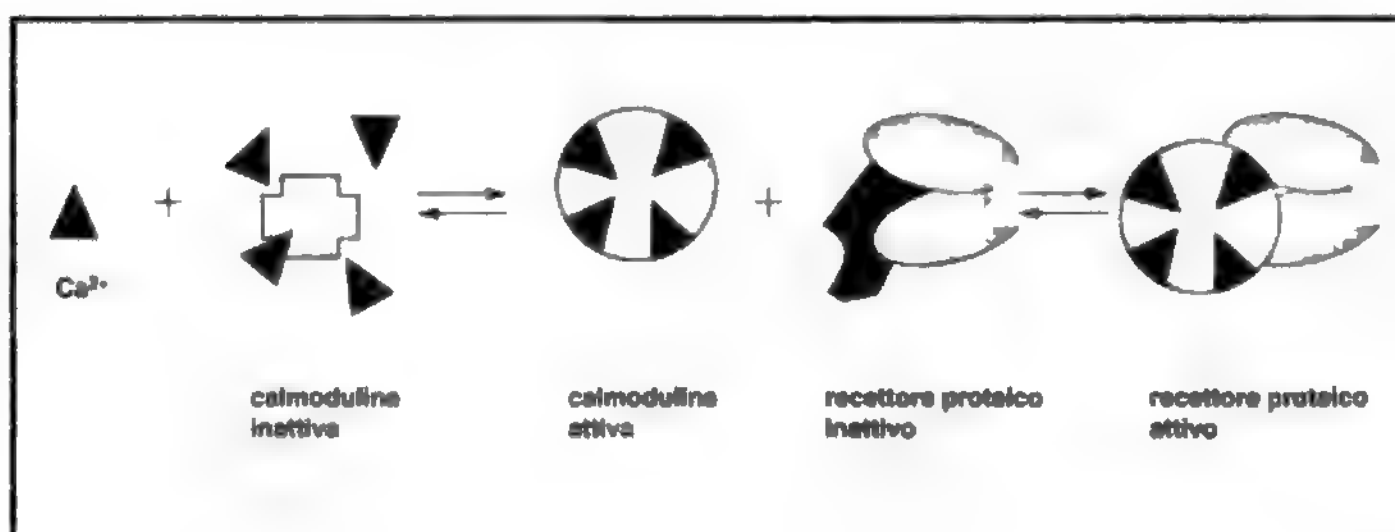
I complessi Ca²⁺/calmodulina sono anche coinvolti nella regolazione dei processi di proliferazione e mitosi cellulare, dell'attività della adenilatociclastasi e dell'AMP ciclico fosfodiesterasi e, quindi, in ultima analisi, nella modulazione della risposta a livello nucleare, con meccanismi ancora non del tutto chiariti.

Mediazione di segnali ormonali trasdotti da recettori collegati ad enzimi. - I recettori della superficie cellulare fun-

zionalmente collegati ad enzimi, coinvolti nella mediazione del segnale ormonale, sono proteine transmembrana con il dominio che lega la molecola ormonale situato sulla superficie esterna della membrana plasmatica. I domini citosolici di queste strutture recettoriali si caratterizzano per un'attività enzimatica intrinseca oppure dovuta ad un enzima associato. Contrariamente ai recettori collegati alle proteine G, caratterizzati dalla presenza di sette domini transmembrana, queste strutture attivatrici del segnale ormonale collegate ad enzimi si contraddistinguono per la presenza di un unico dominio transmembrana. L'interazione ormone-recettore, anche in questa evenienza, comporta delle modificazioni conformazionali che si esprimono in attivazione dell'attività *tirosino chinasi*. Nella maggior parte dei casi si verifica un processo di autofosforilazione del recettore e questo fenomeno amplifica l'attività tirosino chinasi stessa. Peraltro, una volta attivato, l'enzima può attivare altri substrati.

Nell'ambito della categoria delle strutture recettoriali con funzione enzimatica figurano il recettore per l'insulina e molti altri recettori per fattori di crescita e di differenziamento, tutti recettori tirosino chinasi. Questi comprendono i recettori per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), i fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita delle strutture nervose (NGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), il fattore di crescita similinsulinico (IGF-1), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita degli endoteli vasali (VEGF) ed il fattore che stimola la formazione di colonie da parte dei macrofagi (M-CSF) (v. FATTORI DI CRESCITA*, fig. 4, coll.

Fig. 9. La calmodulina quale mediatore polivalente dell'azione ormonale. La catena polipeptidica della calmodulina, dotata di quattro siti leganti ad alta affinità per il Ca²⁺, è attivata allostericamente dal legame con il Ca²⁺. Il complesso calmodulina/Ca²⁺, interagendo con proteine chinasi dipendenti, fosforila residui di serina, di treonina e di substrati proteici evocando così risposte specifiche delle cellule bersaglio, regolando i processi della proliferazione e mitosi cellulare.



TAB. VI. ESEMPI DI PROCESSI E PROTEINE SOTTO IL CONTROLLO DELLA PROTEINCHINASI A

— Desensibilizzazione adenilciclasica (adenilciclasti)
— Sintesi di glicogeno (fosforilasi, chinasi e glicogeno sintetasi)
— Lipolisi (lipasi ormono-sensibili)
— Steroidogenesi
— Trascrizione
— Canali del Ca^{2+} dipendenti dal voltaggio (es., ↑ forza di contrazione miocardica e grado di rilassamento)

**2165-2166). Questa famiglia di recettori tirosino chinasi può essere a sua volta suddivisa in alcune sottofamiglie strutturali; in tutti i casi i recettori coinvolti vanno incontro ad un processo di autofosforilazione per iniziare la cascata di eventi preposti alla trasmissione intracellulare di segnali. Alcuni esempi di processi biologici modulati dalla mediazione recettoriale proteino-chinasica, sono riportati nella tab. VI.

Interazione del segnale endocrino con recettori intracellulari

La catalogazione, in un unico raggruppamento, di strutture recettoriali mediatrici di funzioni ormonali assai diverse, appare legittimata dalle più recenti acquisizioni molecolari dimostranti che molecole ormonali strutturalmente diverse interagiscono con strutture recettoriali analoghe a prevalente localizzazione nucleare. Inoltre, tale omogeneizzazione classificativa è giustificata dai rilievi comprovanti che nel corso dell'evoluzione persistono invariati alcuni segmenti nucleotidici che svolgono funzioni recettoriali specifiche, quale ad es. il legame al DNA, riconducibili ad una struttura primordiale denominata recettore «ancestrale». Ed, infatti, gli o. steroidei e tiroidei, i retinoidi e la Vit. D sono molecole idrofobiche, di esigue dimensioni, a struttura chimica diversa, dotate di diversificate funzioni biologiche. Ma, nonostante le sostanziali differenze strutturali e funzionali, tali molecole ormonali sono caratterizzate da una comune proprietà, quella di attraversare rapidamente la plasmamembrana e di diffondere nel compartimento cellulare interagendo con specifiche strutture recettoriali intracellulari, strutturalmente correlate. Si costituisce, così, una superfamiglia di recettori nucleari, funzionalmente analoghi, che agiscono a tutti gli effetti come fattori trascrizionali. La superfamiglia dei recettori steroidei/tiroidei comprende un numero molto elevato di geni altamente conservati nella scala evolutiva e, pertanto, rappresenta negli eucarioti la più ampia famiglia di fattori trascrizionali (tab. VII).

La superfamiglia dei recettori steroidei/tiroidei: domini funzionali e strutturali

Le più recenti ricerche hanno consentito di ottenere, grazie all'impiego di sofisticate tecniche analitiche, una dissezione molecolare dei recettori nucleari. È stato, così, possibile identificare in essi diversi domini funzionali e strutturali (fig. 10). Nei vari membri della superfamiglia la porzione NH_2 -terminale (A/B) è assai variabile, sia nella sequenza che nella lunghezza. A questo dominio è attribuita una specifica funzione modulatoria dei processi trascrizionali, per cui è presente in ogni tipo di recettore. Il dominio funzionale C è responsabile dell'interazione con la regione regolatrice del gene bersaglio, pertanto è anche definito *DNA binding domain* (DBD). Esso condivide la regione a più elevata omologia tra i diversi recettori della superfamiglia ed è, infatti, la porzione della molecola evolutivamente più

TAB. VII. LA SUPERFAMIGLIA DI RECETTORI NUCLEARI

Recettori ormonali	Recettori orfani	Proteine di <i>Drosophila</i>
Glicocorticoidi	COUP	Recettore per l'Ecdisone*
Androgeni	ARP-1	E75
Estrogeni	EAR-1	Knirps
Progesterone	EAR-2	sottogruppo di Knirps
Mineralcorticoidi	PPAR-1	Gonade embrionale
Vit. D	HNF-4	Seven up
O. tiroidei	ERR-1	Ultraspiracle
Retinoidi	ERR-2	Tailless
RXR	NGF-1/Nurr77 ELP/SF-1	Fushi-tarazu** Gonade embrionale

* ormone steroideo dell'insetto

** gene *ftz* necessario per il normale sviluppo dell'insetto.

conservata. Il dominio C può svolgere un ruolo rilevante nella formazione di complessi costituiti da dimeri tra recettori, omologhi od eterologhi (omodimeri ed eterodimeri), ai quali conferisce la proprietà attivatrice della trascrizione gene-specifica. Il dominio D, anche definito «regione cerniera», spesso contiene una sequenza che controlla la localizzazione nucleare del recettore, nonché una seconda regione deputata all'attivazione di geni bersaglio. Il dominio E, anche detto *ligand binding domain* (LBD), localizzato nella regione carbossi-terminale, ha una lunghezza di circa 250 aminoacidi ed è funzionalmente molto complesso. Tale segmento è dotato di funzioni rilevanti, soprattutto per il legame alla specifica molecola ormonale (Evans, 1988), nonché per l'associazione alle proteine *heat-shock*, per la dimerizzazione recettoriale, per la localizzazione nucleare, per la transattivazione (AF2; *Activation Function 2*).

Interazione recettori-DNA

I membri della superfamiglia dei recettori nucleari steroidei/tiroidei possono essere genericamente classificati in due sottogruppi, A e B, in base alle loro diverse caratteristiche funzionali.

Il sottogruppo A è composto dai recettori dei glicocorticoidi, del progesterone, degli androgeni e dei mineralcorticoidi. Questo gruppo di recettori, in assenza dello specifico ligando ormonale, non legano il DNA e tendono a localizzarsi prevalentemente nel citoplasma; a seguito dell'interazione con il substrato ormonale essi vanno incontro a modificazioni conformazionali che comportano l'attivazione dello specifico gene bersaglio.

Al sottogruppo B appartengono i recettori dell'ac. retinoico (v. LEUCEMIE**), degli o. tiroidei, della vit. D, degli estrogeni, nonché la maggior parte dei recettori «orfani», privi apparentemente di funzione ligante. I membri di questo sottogruppo sono pressoché esclusivamente localizzati a livello nucleare, tendono a formare eterodimeri con *partners* recettoriali diversi, tra i quali il preferito sembra essere l'RXR (*Retinoic X Receptor*, un tempo sconosciuto), il recettore per l'ac. 9-*cis* retinoico, e possono interagire con il DNA, anche in assenza dello specifico ligando (fig. 10).

Interazione dei recettori steroidei/tiroidei con i fattori basali di trascrizione

Le specifiche sequenze nucleotidiche, presenti nella regione regolatrice dei geni bersaglio, che interagiscono con diversi

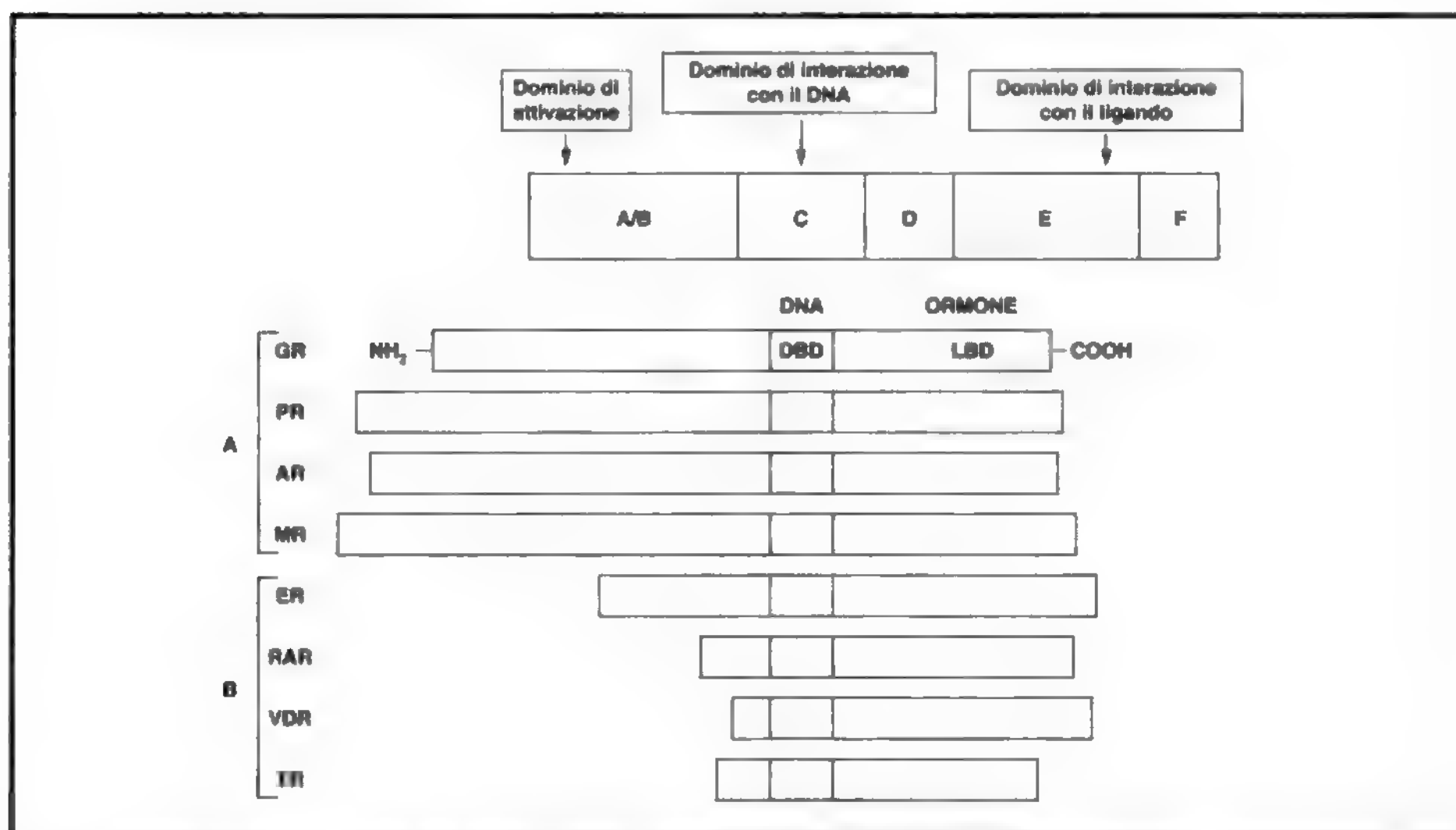


Fig. 10. La superfamiglia dei recettori steroidei/tiroidei: schematizzazione dei segmenti nucleotidici funzionali. Nella parte superiore del diagramma è rappresentata la sequenza delle strutture recettoriali catalogabili in segmenti funzionalmente diversificati. Nella porzione aminotermine (NH₂) sono identificabili domini assai variabili, sia nella sequenza che nella lunghezza (segmenti A/B), dotati di una specifica funzione modulatoria dei processi trascrizionali. Il segmento C è coinvolto nell'interazione con la regione regolatrice dei geni bersaglio (*DNA binding domain*, DBD), costituisce la regione a più elevata omologia tra i diversi recettori e rappresenta la porzione evolutivamente più conservata. Il dominio D è definito regione *cerniera*, controlla la localizzazione nucleare del recettore. Il dominio E, carbossiterminale (COOH), denominato *ligand binding domain* (LBD) è complesso ed è coinvolto in funzioni rilevanti nel processo di transattivazione, che è regolato anche dal dominio F. I recettori di questa superfamiglia possono essere classificati in due sottogruppi. Quelli appartenenti al gruppo A, che in assenza dell'ormone non legano il DNA e tendono a localizzarsi nel citoplasma. I recettori appartenenti al gruppo B, localizzati a livello nucleare, tendono ad interagire con *partners* recettoriali diversi e possono legarsi al DNA, anche in assenza dello specifico ligando. GR, recettore dei glucocorticoidi; PR, recettore del progesterone; AR, recettore degli androgeni; MR, recettore dei mineralcorticoidi; ER, recettore degli estrogeni; RAR, recettore dell'ac. retinoico; VDR, recettore della Vit. D; TR, recettore degli ormoni tiroidei.

recettori nucleari, sono state definite *Hormone Responsive Elements* (HRE) (fig. 11). Questi segmenti nucleotidici sono generalmente strutturati in due subunità leganti, la cui sequenza può essere identica oppure complementare, delineandosi una struttura speculare, denominata *palindrome*. Gli HRE possono essere suddivisi in due principali sotto-classi. La prima è caratterizzata dalle due subunità AGAA CAnnnTGTCT, distanziate da nucleotidi diversi che legano con elevata affinità i recettori per i glucocorticoidi (GR), progestinici (PR), mineralcorticoidi (MR) ed androgeni (AR). La seconda, che comprende anche l'*Estrogen Responsive Element* (ERE), è caratterizzata da due subunità (AGGTCAnnnTGACCT), distanziate da nucleotidi vari, che interagiscono con gli estrogeni, gli ormoni tiroidei, la Vit. D e l'ac. retinoico, mediandone l'attivazione funzionale. Mediante l'inserzione di mutazioni puntiformi dei singoli nucleotidi costitutivi degli HRE e l'analisi delle proprietà di legame al DNA è oggi possibile determinare il ruolo di ogni singola base nell'interazione con il recettore nucleare e la sua specifica attività funzionale.

Da queste succinte considerazioni si può desumere che nel determinismo degli specifici effetti ormonali intervengono fattori variabili riconducibili sia alla distribuzione qualitativa e quantitativa delle strutture recettoriali nei distretti tissutali, sia alla particolare struttura dell'HRE.

I co-attivatori ed i co-repressori nella regolazione degli effetti trascrizionali

Fino al 1988 si riteneva che tutti i recettori nucleari agissero esclusivamente sotto forma di complessi *omodimerici*, anche se questo tipo di interazione appariva instabile per alcuni membri della superfamiglia, come i recettori per l'ormone tiroideo (TR), per l'ac. retinoico (RAR) e per la Vit. D. Successivamente si è dimostrata la capacità di tali recettori di associarsi con un'elevata affinità a proteine eterologhe, anch'esse a localizzazione nucleare, nonché quella di formare dei complessi *eterodimerici* in grado di rendere più stabile il legame al DNA e di potenziare l'azione del complesso recettore-ormone.

I recettori ormonali a localizzazione nucleare, una volta legati agli specifici HRE, sotto forma monomeric o dimerica (omodimerica o eterodimerica), sono in grado di regolare l'espressione di diversi geni bersaglio.

La funzione primaria del processo di attivazione della trascrizione degli specifici RNA messaggeri, mediata dall'interazione del complesso ormone-recettore con la struttura del gene bersaglio, è quella di facilitare il legame e l'interazione della RNA polimerasi II (Pol II) con l'apparato basale di trascrizione, costituito dai cosiddetti *General Transcription Factors* (GTF). Ciò può avvenire grazie ad una maggiore stabilizzazione del complesso basale di tra-

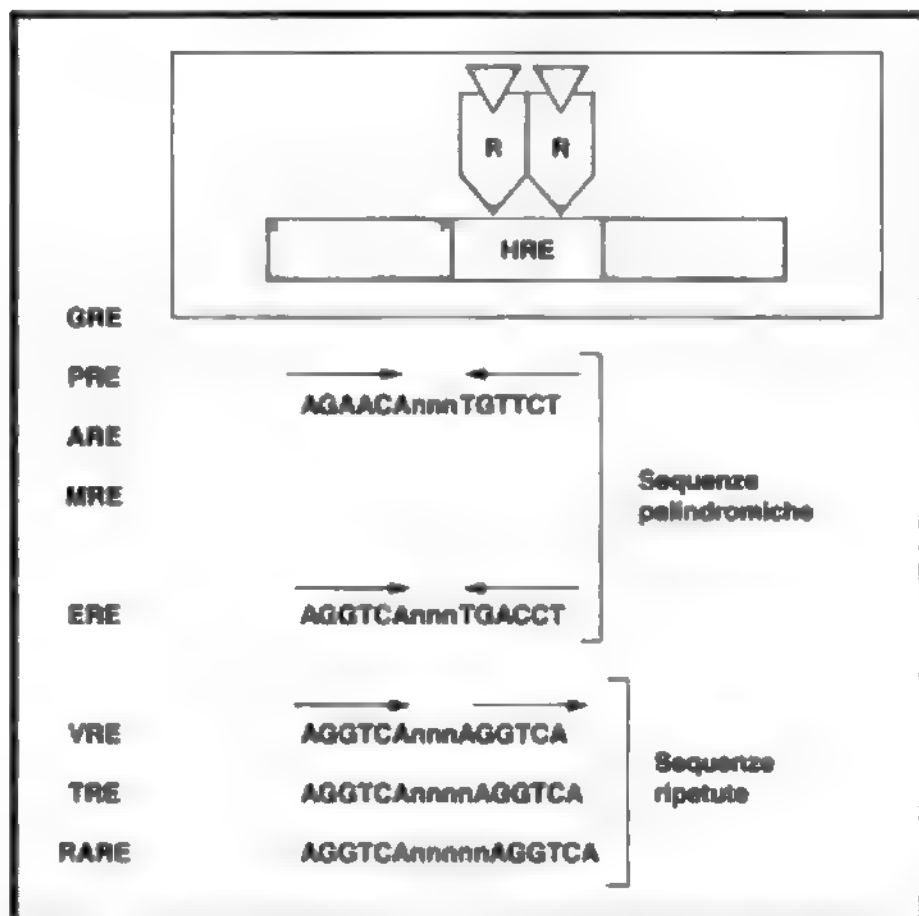


Fig. 11. Sequenze consenso identificate nei geni bersaglio deputate all'interazione con i recettori nucleari ormonali. Nel diagramma sono riportate le specifiche sequenze nucleotidiche identificate nella regione regolatrice dei geni bersaglio dell'azione ormonale, deputate all'interazione con i diversi recettori nucleari e denominate *Hormone Responsive Elements* (HRE). L'orientamento delle due subunità lungo il filamento del DNA, variamente distanziate da nucleotidi (n), può configurare una palindrome (*palindrome*) come nel caso dei recettori per i glucocorticoidi (GRE), per il progesterone (PRE), per gli androgeni (ARE), per i mineralocorticoidi (MRE) e per gli estrogeni (ERE), oppure le subunità degli HRE possono ripetersi identiche con il medesimo orientamento (*sequenze ripetute*), come nel caso dei recettori per la Vit. D (VRE), per gli o. tiroidei (TRE) o per i retinoidi (RARE).

scrizione ed, in via alternativa, tramite un'interazione diretta proteina-proteina, tra un componente dell'apparato basale di trascrizione ed il recettore ormonale. Inoltre, il

processo trascrizionale può essere attivato da un'interazione indiretta, tramite un mediatore detto *co-attivatore* o *proteina adattatore*. A queste molecole deve essere conferito il ruolo funzionale di *integratori* dei segnali tra il complesso ormone-recettore ed i fattori basali di trascrizione (fig. 12).

Fra i recettori nucleari appartenenti al gruppo B, i recettori tiroidei si caratterizzano per la proprietà in assenza di o. di legarsi al DNA e di svolgere una funzione di inibizione sull'attività trascrizionale basale del gene bersaglio. A tale azione repressiva (funzione *silencing*) del recettore tiroideo, in assenza di o., potrebbe essere conferito un ruolo significativo nel regolare importanti funzioni biologiche, quali ad es., durante l'embriogenesi, i processi differenziali della corteccia cerebrale. Peraltro si è documentato che tale attività inibitoria si esplica grazie all'intervento di specifici *co-repressori*, in grado di legare i recettori ormonali responsabili dell'effetto di repressione genica in assenza dello specifico ligando. A confermare la complessità di questa intricata rete di connessioni a livello nucleare, i più attuali studi hanno dimostrato che, con il legarsi della molecola ormonale allo specifico recettore, si verificano modificazioni conformazionali che determinano il distacco dei co-repressori e la conseguente interazione con i *co-attivatori* che stimolano la trascrizione dello specifico gene bersaglio (fig. 13).

INTERRELAZIONI TRA DIVERSE FAMIGLIE DI RECETTORI ORMONALI

Prospettive fisiopatologiche e cliniche

Da ultimo si deve sottolineare che recentissimi studi in tema di meccanismo d'azione ormonale hanno dimostrato che la funzione recettoriale può essere attivata, anche in assenza dello specifico ligando ormonale, da segnali provenienti da altri recettori, dislocati sia in sede nucleare che a livello della plasmamembrana, in grado di intervenire a diversi livelli nella via di trasduzione del segnale ormonale.

Queste interrelazioni tra diverse famiglie recettoriali, o nell'ambito di una stessa famiglia, possono avverarsi a diversi livelli della sequenza di eventi implicati nella trasdu-

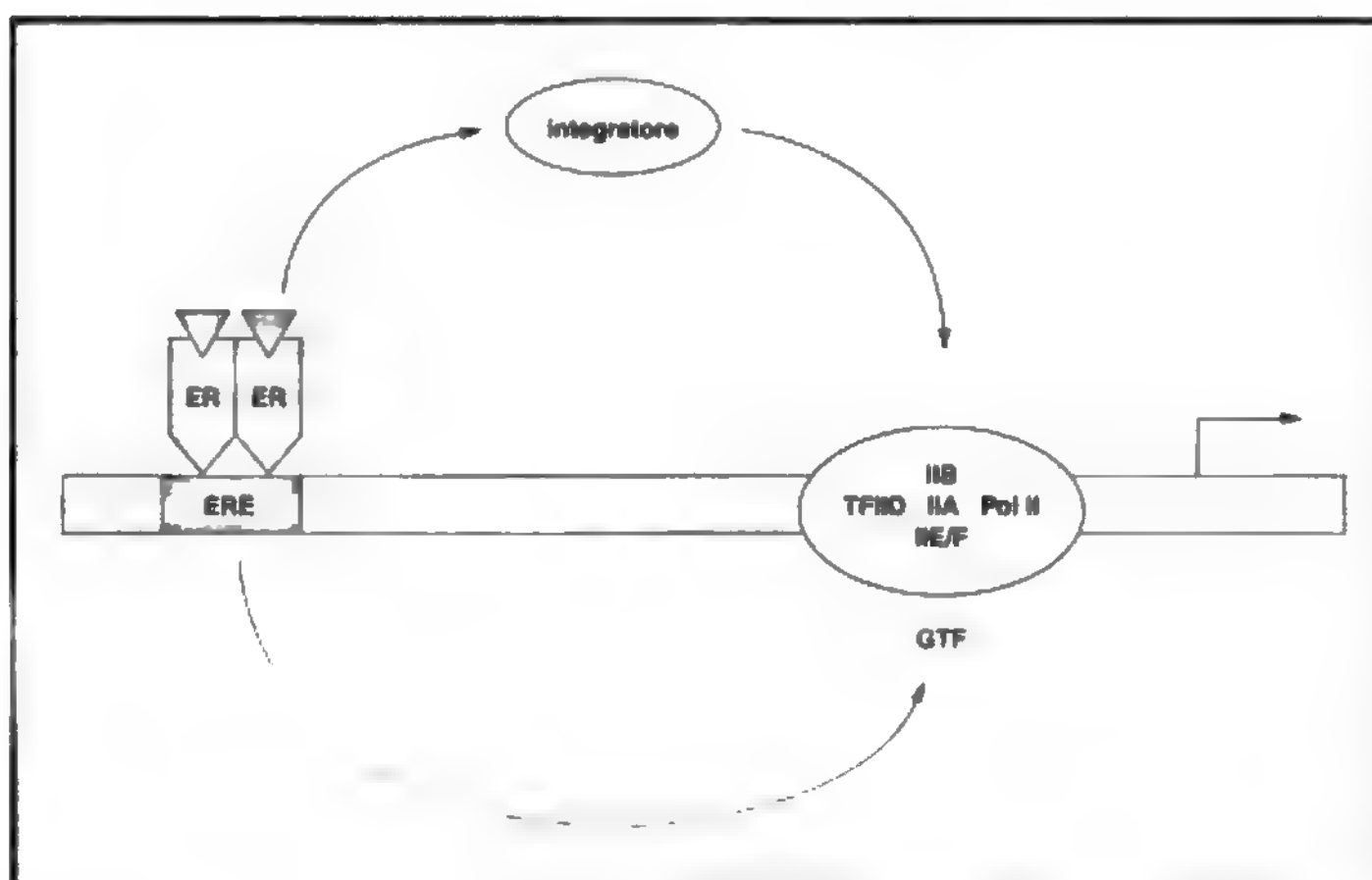
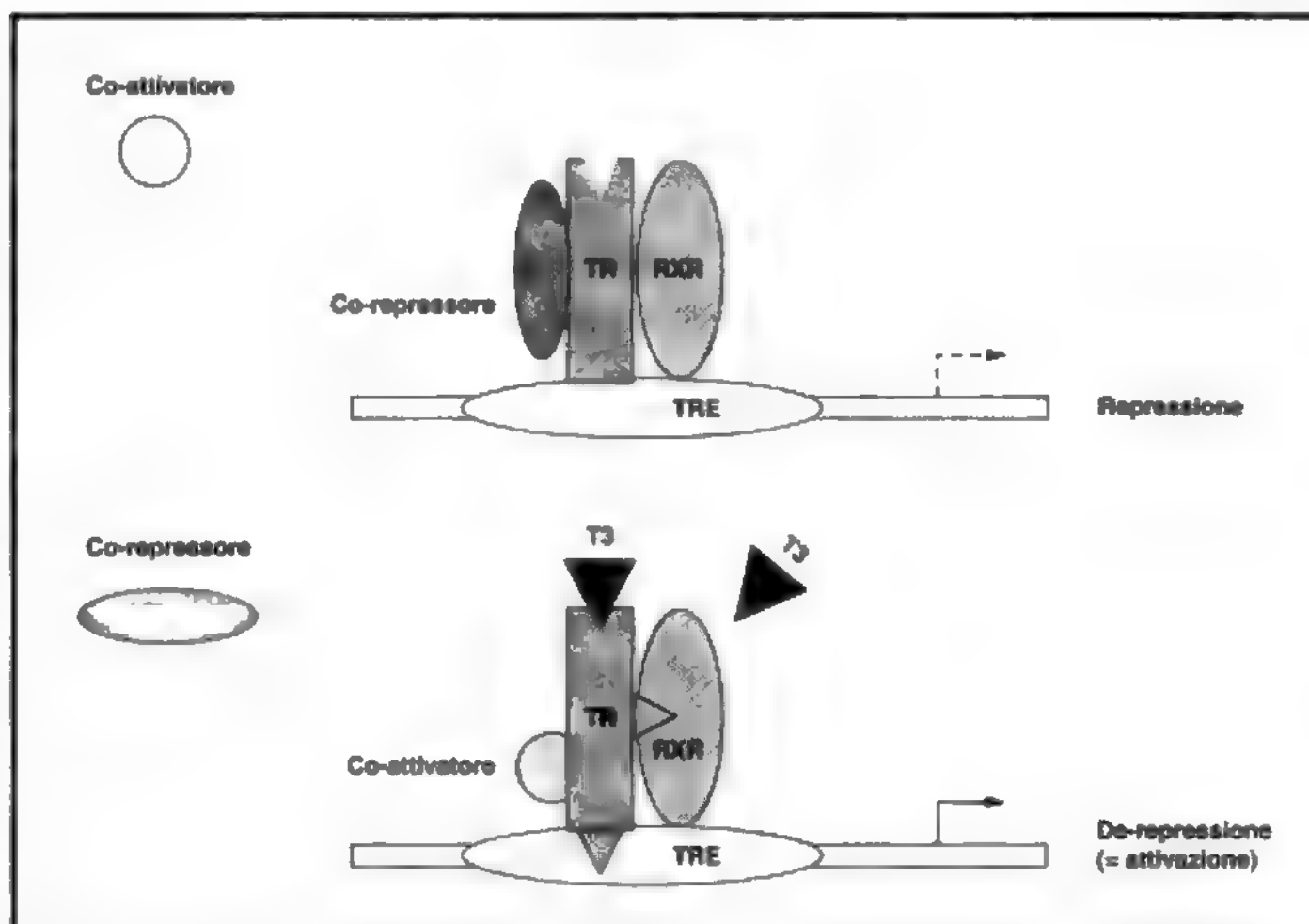


Fig. 12. Meccanismi di attivazione trascrizionale mediata da recettori nucleari ormonali. Il processo di attivazione della trascrizione, innescato a seguito della interazione del complesso ormone-recettore con la struttura del gene bersaglio, si trasmette all'apparato basale di trascrizione, costituito da un insieme di proteine denominate *General Transcription Factors* (GTF). Le modalità utilizzate nella trasduzione del segnale ormonale non sono ancora del tutto chiarite, anche se dati sperimentali suggeriscono o una interazione diretta proteina-proteina tra un componente dei GTF ed il complesso ormone-recettore, oppure l'intervento di una proteina che funga da mediatore, denominata «integratore». ER, recettore degli estrogeni; ERE, *Estrogen Responsive Element*; TF, *Transcription Factor* (II D, II B...); Pol II, RNA polimerasi II.

Fig. 13. Funzione *silencing* dei recettori tiroidei. I recettori per gli o. tiroidei (TR) regolano l'espressione dei geni bersaglio modulando un complesso equilibrio di eventi inibitori ed attivatori della trascrizione genica, alternativamente determinati dall'assenza o dalla presenza della molecola ormonale (T_3). L'azione repressiva (funzione *silencing*) del recettore tiroideo in assenza di T_3 , come illustrato nella parte superiore della figura, si esplica grazie all'intervento di specifici *co-repressori*, in grado di legare i recettori ormonali responsabili dell'effetto di repressione genica in assenza dello specifico ligando. L'intervento della molecola ormonale (parte inferiore della figura) comporta la dissociazione del *co-repressore* e la concomitante interazione con fattori di tipo stimolatorio denominati *co-attivatori*, in grado questa volta di promuovere la trascrizione dello specifico gene bersaglio.



zione del segnale (tab. VIII): *a livello del recettore stesso*, mediante alterazioni dello stato di fosforilazione; oppure *a livello del legame dell'o.*, come nel caso dei glicocorticoidi, che sono capaci di legare sia i GR che MR; *a livello del DNA*, in corrispondenza delle specifiche sequenze nucleotidiche per i recettori ormonali, gli HRE, come, ad es., nel caso dell'impegno prevalente di un'unica sequenza consenso, in comune per AR, GR, PR, MR; *a livello della dimerizzazione del recettore*, ad es. l'eterodimerizzazione di RXR con altri recettori; *a livello dell'interazione proteica tra recettori ed altre proteine intermediarie*, appartenenti al gruppo dei fattori basali della trascrizione oppure a quello dei coattivatori/corepressori/cointegratori.

Le ricerche concernenti le interrelazioni tra recettori nucleari sono di grande attualità e si profilano sviluppi assai innovativi con implicazioni non solo di ordine biologico ma anche di rilevante significato fisiopatologico e clinico. Per quanto riguarda il recettore degli estrogeni (ER), ad es., sussistono evidenze sperimentali che depongono per un'azione repressiva da parte di entrambe le isoforme del recettore del progesterone (A e B) indicando così che, in alcune circostanze, il recettore possa agire come un *attivatore* trascrizionale, mentre in altre condizioni possa svolgere funzioni repressive.

TAB. VIII. INTERRELAZIONI RECETTORIALI NELLA TRASMISSIONE DI MESSAGGI E NELLA ESPRESSIONE DEL SEGNALE ORMONALE

Siti di intercomunicazione

- In corrispondenza dei recettori
- A livello della fosforilazione
- Interferenza nel legame DNA-recettore
- Fattori che influenzano la intermediazione recettoriale
 - a livello dei co-attivatori
 - a livello dei co-repressori
- A livello dell'apparato basale di trascrizione

Un altro assai paradigmatico esempio è rappresentato dall'interazione di ER e TR nella modulazione dell'espressione di un gene sensibile agli estrogeni, come il gene *PPE*, che codifica per i peptidi dell'encefalina nell'ipotalamo; in questo caso è stata dimostrata l'inibizione, da parte dell'ormone tiroideo T_3 , dell'espressione del gene *PPE*, stimolata dagli estrogeni. È probabile che ciò avvenga tramite un meccanismo di sequestro, per cui la sovraespressione di un fattore trascrizionale, in questo caso il recettore dell'ormone tiroideo, potrebbe sequestrare un altro fattore trascrizionale od un coattivatore, presente in quantità limitata, necessario per l'espletarsi dell'attività del recettore degli estrogeni.

Infine, si devono segnalare gli studi dimostranti che, in cellule di mammifero, l'attività del RU-486, un composto ad azione antiglicocorticoidea, è ampiamente potenziata dall'attivazione della cascata dell'AMP ciclico intracellulare o da inibitori della fosfatasi. Il meccanismo di queste interrelazioni fra segnali di membrana e recettori nucleari non è ancora chiaramente definito. Purtroppo va sottolineato che di recente è stato dimostrato che in sistemi *in vitro* l'ER può agire da substrato per un gruppo di chinasi del tipo *Mitogen-Activated Protein* (MAP), così come si è rilevato che l'ER può determinare l'attivazione *in vivo* dell'oncogene *Ha-Ras*.

Il progredire delle conoscenze nel definire il substrato molecolare delle complesse interrelazioni tra le diverse vie di trasduzione del segnale ormonale ci autorizza a rilevare il determinante ruolo biologico di questa mirabile rete di comunicazioni. Si delinea un articolato sistema di trasferimento di messaggi, modulati per il tramite di diversificate strutture, reciprocamente integrantisi, mediatrici della regolazione e del coordinamento delle diverse reazioni cellulari coinvolte nell'adattamento dell'organismo al variare delle condizioni ambientali inter- ed intracellulari.

Ed è lecito prevedere che dalle attuali affascinanti acquisizioni molecolari di ordine sperimentale, considerando l'espandersi esponenziale delle informazioni offerteci, grazie anche alle sofisticate odierne metodologie in incessante

progredire, possano in un non remoto futuro scaturire innovative trasposizioni applicative. Ad esempio, non appare infondato ipotizzare nella interpretazione patogenetica della proliferazione carcinomatosa un definito ruolo del recettore estrogenico che risulta comunque attivato, nonostante la deprivazione estrogenica terapeutica indotta.

E sotto questo aspetto l'attuale disponibilità di idonei modelli sperimentali potrà facilitare sia l'analisi del substrato molecolare che sottende all'espletarsi delle specifiche funzioni trasduttrici delle diverse strutture recettoriali, così come la definizione dei meccanismi coinvolti nelle molteplici interrelazioni recettoriali. Infatti, la produzione, oggi routinaria, di animali selettivamente «privati» di uno specifico recettore (topi *knock out*), potrà essere di grande ausilio, non solo nel precisare le funzioni dei singoli recettori, ma anche nel chiarire potenziali funzioni vicarianti esercitate dai diversi recettori o dalle diverse isoforme di uno stesso sottogruppo recettoriale.

Bibliografia

- Cavallès V., Dauvois S., Danielian P. S., Parker M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 10009-10013.
 Glass C. K., *Endocrin. Rev.*, 1994, **15**, 391-407.
 Horwitz K. B., Jackson T. A., Bain D. L. et al., *Mol. End.*, 1996, **10**, 1167-1177.
 Hunter T., Karin M., *Cell*, 1992, **70**, 375-387.
 Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, **59**, 632-638.
 Kasuga M., Karlsson F. A., Kahn C. R., *Science*, 1982, **215**, 185-187.
 Kraus W. L., Weis K. E., Katzenellenbogen B. S., *Mol. Cell. Biol.*, 1995, **15**, 1847-1857.
 Kurokawa R., Soderstrom M., Horlein A. et al., *Nature*, 1995, **377**, 451-454.
 Mangelsdorf D. J., Evans R. M., *Cell*, 1995, **83**, 841-850.
 O'Malley B. W., McGuire W. L., Kohler P. O., Koreman S. G., *Recent Prog. Horm. Res.*, 1969, **25**, 105-160.
 Schulman H., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1993, **5**, 247-253.
 Snyder S. H., *Sci. Am.*, 1985, **253**, 132-140.
 Truss M., Beato M., *Endocrine Rev.*, 1993, **14**, 459-479.
 Tsai M. J., O'Malley B. W., *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, **63**, 451-486.
 Ullrich A., Schlessinger J., *Cell*, 1990, **61**, 203-212.
 Zhu Y. S., Yen P. M., Chin W. W., Pfaff D. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 12587-12592.

ANTONELLA FARSETTI,
DANIELE DANESI E MARIO ANDRIOLI

OSSIDO NITRICO: V. MONOSSIDO D'AZOTO**.

OSSIGENO-OZONO TERAPIA: V. OZONO-OSSIGENO TERAPIA**.

OSTEOGENESIS IMPERFECTA [v. vol. XI, coll. 230-234]

SOMMARIO

Introduzione (col. 4260). - **Patogenesi** (col. 4260). - **Ereditarietà** (col. 4263). - **Indagini genetiche e diagnosi prenatale** (col. 4263). - **Terapia** (col. 4263).

Introduzione

La definizione anglosassone dell'*osteogenesis imperfecta* [o.i.], *brittle bone disease*, coglie efficacemente il tratto fondamentale e unificante di questo gruppo di difetti genetici: la fragilità ossea. Si tratta tuttavia di un disturbo generalizzato del tessuto connettivo che può interessare, oltre che il sistema scheletrico, altri organi e tessuti come le sclere oculari, la dentina, il derma, l'apparato legamentoso, l'apparato uditivo e, più raramente, le valvole cardiache. La variabilità nell'espressione clinica della malattia è molto ampia: la classificazione in quattro tipi proposta da Silience nel 1979 (tab. I), sebbene a tutt'oggi largamente utilizzata, risulta spesso riduttiva e insoddisfacente poiché i vari fenotipi riscontrabili nei pazienti costituiscono uno spettro senza soluzione di continuità. A differenza di quanto riportato in passato, l'o.i. non è molto rara: la stima di 1 individuo affetto su 10.000 nascite è senza dubbio inferiore alla realtà e deriva dalla scarsa conoscenza della malattia e dal mancato riconoscimento delle sue forme più sfumate (fratture in bambini con o.i. non diagnosticata tempestivamente sono state talvolta imputate a maltrattamenti, con conseguenti vicende giudiziarie a carico dei genitori).

Patogenesi

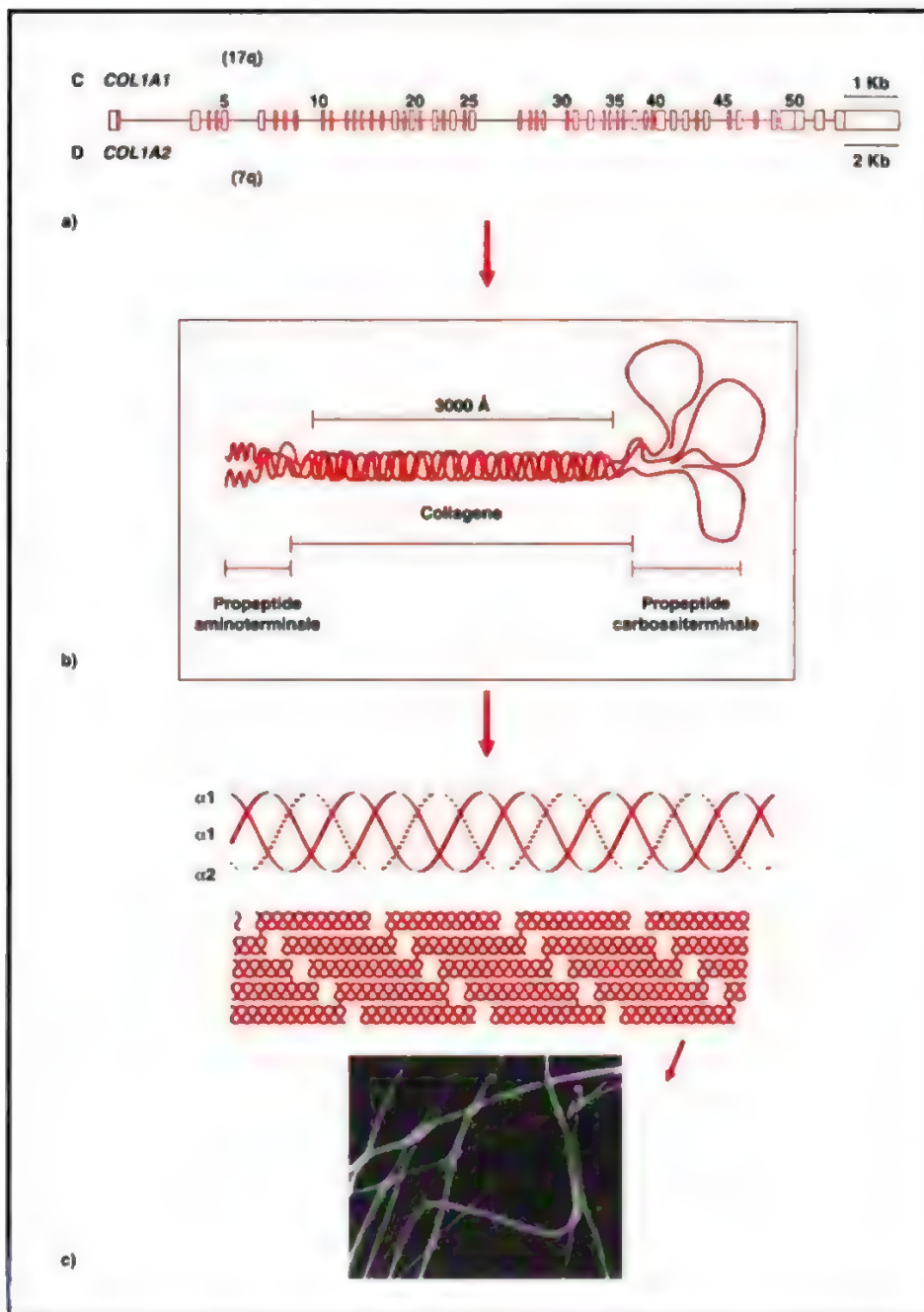
La malattia è dovuta, nella stragrande maggioranza dei casi, ad alterazioni quantitative e/o qualitative a carico del collagene I, causate da mutazioni nei due geni, *COL1A1* (localizzato sul cromosoma 17) e *COL1A2* (localizzato sul cromosoma 7) codificanti per le catene strutturali $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$, rispettivamente (fig. 1). Studi biochimici e di microscopia elettronica hanno chiarito perché la fragilità ossea è la manifestazione più appariscente della sindrome: il collagene I rappresenta l'80% del contenuto proteico dell'osso, le fibrille che esso forma ne costituiscono la struttura portante, essendo il substrato su cui i cristalli di idrossiapatite vengono depositi nel processo di mineralizzazione. Fibrille anomale, in quanto contenenti catene collageniche strutturalmente alterate, o rarefatte a causa di un deficit quanti-

TAB. I. GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELL'OSTEOGENESIS IMPERFECTA

Tipo	Clinica	Ereditarietà	Collagene	Gene
I	fratture, modesta deformità ossa lunghe, statura normale, sclere blu, sordità (o.i. tarda)	AD	deficit quantitativo	<i>COL1A1</i>
II	letale perinatale, gravissime deformità ossee (<i>lethalis</i> , Vrolik)	AD, sporadica o ricorrente (mosaicismo)	alterazione strutturale	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>
III	grave fragilità ossea, deformità progressiva ossa lunghe, nanismo, D. I., sordità (congenita, Vrolik)	AD, sporadica o ricorrente (mosaicismo), 1 caso AR alcuni casi AR (Sud Africa, Pakistan)	alterazione strutturale normale	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i> ?
IV	fratture, deformità moderata, ipostaturalità, D.I., sordità	AD (1 caso disomia uniparentale)	alterazione strutturale	<i>COL1A2</i> (<i>COL1A1</i>)

AD = autosomica dominante; AR = autosomica recessiva; D.I. = *deafness*; o.i. = *osteogenesis imperfecta*; *lethalis*, congenita, Vrolik = definizione secondo Vrolik, antecedente l'attuale classificazione di Silience; *COL1A1* = gene della catena $\alpha 1$ del collagene I; *COL1A2* = gene della catena $\alpha 2$ del collagene I.

Fig. 1. Patogenesi della *o.i.* Dai geni alle fibre di collagene. a) Struttura dei geni *COL1A1* e *COL1A2*: le sequenze esoniche, rappresentate da rettangolini, sono altamente conservate nei due geni, mentre le sequenze introniche, rappresentate dalla linea continua, divergono sia per composizione sia per dimensioni. b) Molecola di procollagene costituita da un dominio centrale a tripla elica e da due propeptidi amino- e carbossi-terminali; questi ultimi vengono rimossi da peptidasi specifiche nel processo di maturazione extracellulare. c) Tripla elica di collagene I maturo e aggregazione di unità collageniche in fibrille con la tipica sovrapposizione sfasata; infine, fibre di collagene fotografate al microscopio elettronico. (Da *Prospettive in Pediatria*, 1995, 97, 77 [gennaio-marzo], per gentile concessione di CIS Editore, Milano).



tativo, compromettono il normale processo di mineralizzazione dell'osso, la sua densità e la capacità di resistere a forze di trazione e compressione.

Poiché il collagene I è abbondante anche in numerosi altri distretti, altre manifestazioni patologiche a carico del tessuto connettivo possono essere presenti. I pazienti affetti da *o.i.* di tipo I, la forma più lieve, rappresentano una classe fenotipica piuttosto omogenea. Nella maggior parte dei casi il difetto molecolare comporta un deficit di produzione (circa la metà del normale) di catene pro- $\alpha 1$ (i precursori delle catene $\alpha 1$ mature) e, di conseguenza, una diminuita sintesi di collagene. I difetti strutturali invece (responsabili delle forme moderate, severe e letali di *o.i.*) sono per lo più do-

vuti a mutazioni che causano la sostituzione di uno dei 338 residui di glicina nel dominio a tripla elica. Qualsiasi altro aminoacido è più ingombrante della piccola glicina, che occupa la posizione assiale nell'elica; il conseguente ingombro sterico che ne deriva turba il corretto e tempestivo avvolgimento delle catene, e quindi i processi di modificazione post-traduzionale, la secrezione e la termostabilità del collagene. Una classe particolare di difetti strutturali causa di *o.i.* è rappresentata dagli *exon skipings* (salti di esoni), durante il processo di maturazione degli mRNA. Il difetto molecolare è dato da una mutazione puntiforme nel DNA genomico, che cambia i siti canonici di riconoscimento dei confini tra esoni e introni (*COL1A1* e *COL1A2* ne hanno

più di cento ciascuno), essenziali per un corretto processo di maturazione (*splicing*) del trascritto primario (pre-mRNA) in mRNA. Le conseguenze sono il mancato riconoscimento di un esone e la sua rimozione netta senza alterazione della cornice di lettura. Si produrrà quindi una catena collagenica più corta del normale, che comunque verrà utilizzata per la formazione di trimeri difettosi.

La gravità della forma clinica derivante dipenderà dalla posizione del difetto lungo le molecole, dal tipo di catena interessata ($\alpha 1$ o $\alpha 2$), nonché da altri fattori di più complessa interpretazione.

Ereditarietà

Le mutazioni nei geni *COL1A1* e *COL1A2* sopra descritte hanno effetto dominante; vengono quindi ereditate da un genitore affetto (rischio genetico = 50%) oppure compaiono *ex-novo* allo stato eterozigote nei casi sporadici. La ricorrenza di prole affetta nata da genitori entrambi sani, osservabile in un'esigua minoranza dei casi (2-3%), in passato attribuita a una modalità di trasmissione autosomica recessiva, è stata correttamente spiegata da ricerche genetico-molecolari recenti. Trattasi anche in questo caso di mutazioni dominanti presenti in una quota variabile delle cellule germinali di un genitore non affetto (*mosaicismo germinale*).

Non di rado nelle famiglie si osserva un'espressività variabile della sindrome: variano soprattutto il numero, la gravità delle fratture e le loro conseguenze sullo sviluppo scheletrico da individuo a individuo, anche in relazione al tipo di vita e al *background* genetico di ciascuno.

Indagini genetiche e diagnosi prenatale

Studi genetico-molecolari piuttosto complessi, che comportano la localizzazione del difetto ed il sequenziamento del DNA, permettono di identificare la causa prima della malattia. Fino ad oggi nel mondo sono state identificate più di duecento mutazioni diverse nei geni *COL1A1* e *COL1A2* causa di *o.i.*, raccolte in una banca dati soggetta a continuo aggiornamento (<http://www.le.ac.uk/genetic/collagen>).

Le modalità di diagnosi prenatale sono essenzialmente due: il monitoraggio mediante ultrasonografia e lo studio biochimico e/o genetico-molecolare di materiale ottenuto tramite biopsia dei villi coriali. L'ultrasonografia permette di identificare i feti affetti dalle forme più gravi di *o.i.* (tipi II e III) fra la 15ª e la 20ª settimana di gravidanza. Le forme meno gravi (tipi I e IV) in genere sfuggono all'identificazione in tempo utile, in quanto fratture e/o deformità compaiono solo tardivamente o dopo la nascita.

L'indagine biochimica e genetico-molecolare su biopsia dei villi coriali permette l'identificazione precoce (intorno alla 10ª settimana di gravidanza) dell'*o.i.*, ma può essere ragionevolmente intrapresa solo quando siano stati effettuati studi preliminari sull'individuo affetto nella famiglia (probando). In ogni famiglia infatti l'*o.i.* è causata da una mutazione diversa. Nelle forme familiari con più membri affetti nelle varie generazioni, l'analisi di segregazione con marcatori polimorfici ai loci *COL1A1* e *COL1A2* permette di identificare il locus malattia, purché la famiglia sia sufficientemente ampia da risultare informativa. In questo caso, la diagnosi prenatale può essere eseguita su DNA da villo coriale.

Terapia

Sono state finora sperimentate senza successo varie terapie con farmaci diretti ad influire sul processo di osteogenesi e di mineralizzazione: calcio, vitamina D, calcitonina, sodio fluoruro, ed altri. L'inefficacia di tali farmaci è dovuta al fatto che essi non correggono certamente il difetto struttu-

rale nel collagene, causa dell'osteopenia. Farmaci di recentissima sperimentazione sono l'hGH (ormone della crescita) e i bisfosfonati. L'hGH, che fra i vari effetti ha quello di stimolare la produzione di collagene, ha dato risultati incoraggianti in alcuni casi selezionati di *o.i.*, in cui era stata accertata la natura di tipo quantitativo del difetto molecolare. I bisfosfonati (v. DIFOSFONATI [v.*; v.**]), già utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi nell'anziano, sono degli inibitori del riassorbimento osseo ed un loro impiego terapeutico anche nell'*o.i.* sembra giustificato dai risultati (aumento della densitometria ossea associato ad apprezzabile miglioramento degli esiti clinici) ottenuti da alcuni studi con il pamidronato (ad es. Glorieux *et al.*, 1998).

L'approccio terapeutico fornito dalla chirurgia ortopedica, infine, permette di rafforzare le ossa lunghe degli arti inferiori e superiori e di correggerne in parte le deformità, grazie all'impiego di chiodi telescopici intramedullari.

V. anche: OSSEO TESSUTO; OSSO (v.; v.*).

Bibliografia

- Byers P. H., *Osteogenesis Imperfecta*, in Royce P. M., Steinmann B. eds., *Connective Tissue and its heritable disorders*, 1993, Wiley-Liss, New York.
Glorieux F. H. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339** (14), 947-952.
Mottes M., Sangalli A., Pignatti P. F., *Am. J. Med. Genet.*, 1993, **45**, 217.
Sillence D. O., Senn A., Danks D. M., *J. Med. Genet.*, 1979, **16**, 101.

MONICA MOTTES

OSTEOPOROSI [v. vol. XI, coll. 270-278; Agg. I, coll. *5618-5620]

SOMMARIO

Definizione (col. 4264). - **Epidemiologia** (col. 4265). - **Patogenesi della perdita di massa ossea** (col. 4265). - **Fattori determinanti e fattori di rischio dell'evento fratturativo** (col. 4268). - **Diagnosi** (col. 4269): *Linee guida generali*. - **Metodi di misura della densità minerale ossea**. - **Misura del turnover scheletrico mediante i marker**. - **Prevenzione e terapia** (col. 4273).

Definizione

L'osteoporosi è una malattia sistemica dello scheletro caratterizzata da una ridotta quantità di tessuto osseo per unità di volume e dal deterioramento della sua microarchitettura. L'insieme di tali alterazioni anatomiche si traduce sul piano funzionale in una maggiore fragilità ossea; a ciò consegue, sul piano clinico, un aumento del rischio di frattura per traumi di modesta entità od anche in mancanza di questi (fratture atraumatiche).

Tale definizione, estremamente importante da un punto di vista anatomico-funzionale, non è tuttavia di nessun aiuto al medico che debba decidere il momento in cui iniziare la terapia prima che abbia luogo la complicanza più temibile della malattia, cioè la frattura. A tal fine si è recentemente convenuto che la diagnosi di *o.* debba essere posta sulla base della misurazione della *densità minerale ossea* (BMD: *Bone Mineral Density*, [v. MINERALOMETRIA OSSEA*; OSSO*]) a qualsiasi sito scheletrico essa venga effettuata. Un soggetto con valori di BMD inferiori a -2,5 DS (deviazioni standard) dalla media dei soggetti normali di giovane età (*T score*) va considerato *osteoporotico*, mentre va classificato come *osteopenico* l'individuo con valori di massa ossea compresi fra -1,0 e -2,5 DS. La malattia si definisce *stabilizzata*, allorché i valori di BMD < -2,5 DS si associno al rilievo di fratture.

L'*o.* può essere primitiva o secondaria; quest'ultima riconosce sempre una causa specifica la cui correzione determina un miglioramento della compromissione scheletrica.

La forma più frequente è l'o. *involutiva*, postmenopausale e senile, cui faremo riferimento successivamente.

Epidemiologia

L'o. rappresenta un problema di rilevanza mondiale, le cui dimensioni andranno sempre più assumendo connotati epidemici qualora non vengano intraprese misure idonee a prevenire la malattia. I due più importanti fattori che sottendono l'aumentata incidenza dell'o. sono l'aumento di vita media nelle società industrializzate e l'incremento esponenziale, osservato durante la seconda metà di questo secolo, della popolazione nei paesi sottosviluppati. Inoltre, occorre sottolineare come, almeno in alcuni paesi, è stato possibile rilevare una tendenza ad un incremento secolare delle fratture di femore e si è ipotizzato che ciò sia da ricondurre ad una ridotta attività fisica legata ad una sempre più vasta utilizzazione di apparecchiature meccaniche in un gran numero di attività umane.

La maggior parte delle fratture osteoporotiche occorre nelle donne anziane e l'incidenza aumenta con l'età in modo esponenziale. Nella donna l'incidenza è circa il doppio di quella che si osserva nell'uomo. Si calcola che la probabilità di andare incontro ad una delle classiche fratture osteoporotiche (frattura di Colles, frattura vertebrale o femorale) nel corso del rimanente periodo di vita di una donna di 50 anni sia del 39,7%. Tale valore aumenta qualora vengano comprese anche le fratture vertebrali asintomatiche e altri tipi di frattura degli arti.

La frattura del collo del femore è la più grave di tutte le fratture osteoporotiche, essendo inoltre caratterizzata da un'alta mortalità. Da una recente casistica raccolta nel Regno Unito è emerso che la mortalità è di circa il 33% nel primo anno ed è più elevata nelle forme extracapsulari (38%) rispetto alle intracapsulari (29%).

In uno studio epidemiologico condotto di recente in Italia, l'incidenza della frattura del collo del femore nella popolazione al di sopra dei 50 anni è risultata di 171/100.000 soggetti, pari a 32.000 fratture l'anno. L'incidenza ha un andamento esponenziale rispetto all'età con un tempo di raddoppiamento di circa 5 anni. Si è, inoltre, potuto confermare che la mortalità aumenta sensibilmente con l'aumentare dell'età del paziente. Il costo annuale della frattura del femore, per la sola degenza ospedaliera calcolata in media di 21 giorni, ammonta a circa 400 miliardi di lire. Il costo diviene più elevato ove si aggiunga alla spesa per la degenza quella per la protesi d'anca, e si consideri che la frattura del collo del femore è solo 1/5 delle fratture totali che debbono essere addebitate alla fragilità ossea tipica dell'o., alcune delle quali non richiedono talvolta il ricovero ospedaliero.

Patogenesi della perdita di massa ossea

Attualmente si ritiene che l'o. possa essere la conseguenza di un ridotto picco di massa ossea raggiunto alla maturità scheletrica, di una esaltata decostruzione ossea o di una combinazione di ambedue questi fattori.

Nell'acquisizione del picco di massa ossea i *determinanti genetici* sembrano avere la parte più importante.

Negli ultimi anni l'interesse dei ricercatori si è rivolto allo studio del gene codificante per il recettore della vitamina D (gene *VDR*). Tramite metodiche di *southern blotting* (v. *blotting*) e di reazione di polimerizzazione a catena (PCR [v. *; v. **]), sono state identificate alcune varianti alleliche del gene *VDR* e si è cercato di esaminare la loro possibile correlazione con alcuni parametri del *turnover* osseo e con la densità ossea, sia in coppie di gemelli che in gruppi di pazienti. Il DNA genomico estratto dai leucociti del sangue periferico è stato sottoposto a digestione enzimatica con enzimi di restrizione, capaci di tagliare la doppia elica in punti spe-

cifici e di frammentare il genoma in maniera riproducibile, generando segmenti di lunghezza variabile a seconda del numero di siti di taglio. I vari frammenti ottenuti sono stati poi separati mediante gel elettroforesi, quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa ed analizzati con sonde marcate (v. *sonde molecolari*) specifiche e complementari alla sequenza codificante il recettore della vitamina D. Nell'ambito del genoma umano esiste una notevole variabilità genotipica individuale a causa di differenze a livello dei siti di restrizione; tali differenze fanno sì che le lunghezze dei frammenti di DNA genomico generati in seguito alla digestione enzimatica possano risultare diverse all'interno di un certo numero di individui analizzati dando luogo al cosiddetto «polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione» (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms* [v. *3340; *5720]). Gli enzimi di restrizione capaci di individuare sequenze polimorfiche del gene *VDR* sono risultati essere *Taq I*, *Apa I*, *Bsm I* ed *Eco R 5*; i rispettivi alleli sono stati nominati *Tt*, *Aa*, *Bb*, *Ee* dove la lettera maiuscola significa assenza e la minuscola presenza di un sito di restrizione aggiuntivo. La caratterizzazione di tali polimorfismi ha consentito di dimostrare che le possibili varianti alleliche del *locus VDR* sul cromosoma 12 potrebbero contribuire all'estrema variabilità dei livelli circolanti di osteocalcina (v. *) indipendentemente dall'età e dalla menopausa. Inoltre i ricercatori australiani (Morrison *et al.*, 1994) che hanno condotto tali ricerche hanno successivamente prospettato l'ipotesi che alcune varianti alleliche del gene *VDR* possano essere responsabili di una certa predisposizione nei confronti dell'o., intervenendo sia sul raggiungimento del picco di massa ossea che sul processo di rimodellamento. È stato infatti dimostrato che gli RFLP sono in grado di predire differenze nei valori di BMD, particolarmente a livello del rachide lombare, sia in coppie di gemelli dizigoti che nei gruppi di pazienti analizzati, e che tali differenze sono strettamente correlate a quelle riscontrate per i livelli circolanti di osteocalcina. Nell'ambito del gruppo di gemelli dizigoti esaminati, le maggiori divergenze nei valori di massa ossea sono state evidenziate nelle coppie discordanti per gli alleli del gene *VDR* ed il polimorfismo più significativo è risultato essere quello individuato dall'enzima di restrizione *Bsm I*. La presenza dell'allele *b* sembrerebbe infatti essere in correlazione con i valori densitometrici ossei più elevati e con un minore rischio di frattura osteoporotica, dal momento che i soggetti omozigoti *bb* analizzati nello studio australiano erano caratterizzati da valori di massa ossea significativamente più alti rispetto agli eterozigoti *Bb* ed agli omozigoti *BB*.

Occorre tuttavia sottolineare che l'importanza data ai polimorfismi del gene *VDR* nella patogenesi dell'o. non è stata da tutti confermata. La correlazione tra densità ossea e varietà alleliche del gene *VDR* non è stata, ad es., riscontrata in alcuni gruppi di popolazione americana, suggerendo pertanto che vi possano essere differenze etniche. Ne deriva quindi che il ruolo svolto dai polimorfismi del gene *VDR* nella patogenesi dell'o. non è ancora del tutto chiarito e necessita di una ulteriore conferma in gruppi di popolazione più ampi, meglio caratterizzati da un punto di vista metabolico e differenti sotto il profilo etnico.

Per ciò che concerne il ruolo svolto nei primi anni di vita dai *fattori ambientali*, quali ad es., una nutrizione bilanciata soprattutto nei riguardi dei sali di calcio ed una moderata attività fisica, si ritiene che questi consentano all'informazione genetica programmata di esprimersi in modo completo.

Non vi è attualmente consenso sull'epoca di vita in cui viene raggiunto il picco di massa ossea; la discordanza dei risultati pubblicati induce a ritenere che essa possa variare a seconda delle aree geografiche e del distretto scheletrico preso in esame. Si può tuttavia ragionevolmente affermare che la gran parte della massa ossea viene acquisita entro il secondo decennio di vita, anche se modesti aumenti della densità minerale possono osservarsi nel terzo decennio.

L'entità della perdita che, nella donna, ha luogo nel periodo compreso fra il raggiungimento del picco e l'epoca perimenopausale, sembra essere modesta, l'unica eccezione essendo rappresentata dal femore ove è possibile rilevare una riduzione di BMD di circa il 3% per decennio. Le cause che sottendono la perdita di massa ossea a tale livello sono

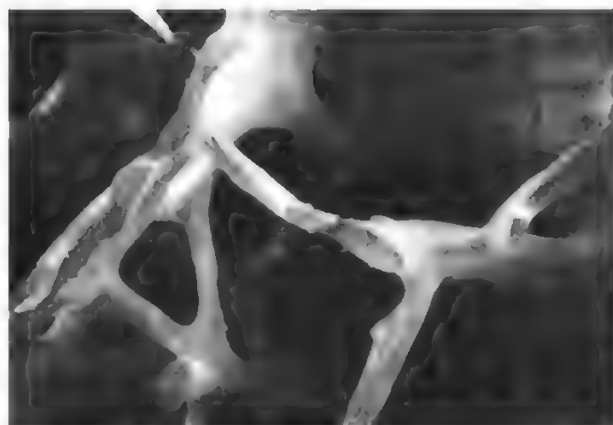
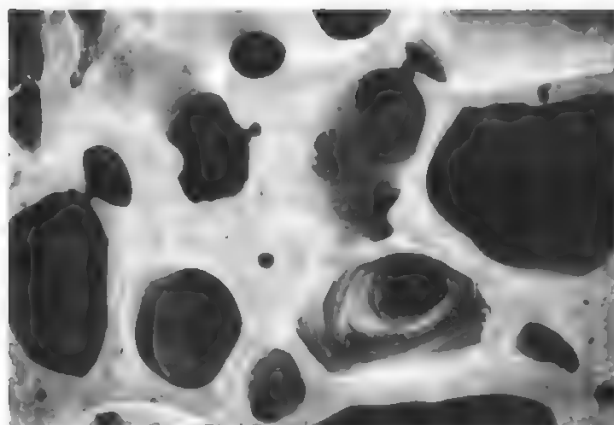


Fig. 1. Microfotografia a scansione elettronica della biopsia della cresta iliaca di un osso normale (a sinistra) e di uno osteoporotico (a destra). Notare come l'osso osteoporotico sia caratterizzato da trabecole assottigliate e ridotte di numero; alcune di queste appaiono anche interrotte. (Da Dempster D. W. e Lindsay R. J. *Bone Min. Res.*, 1993, 1, 15-21, per gentile concessione).

in larga parte sconosciute; tuttavia, essa è responsabile di una riduzione di BMD pari a circa 1 deviazione standard nell'arco di tutto il periodo fertile. Ne consegue che una prevenzione precoce della perdita di massa ossea a tale livello diminuirebbe di circa il 50% il rischio futuro di frattura.

Il ritmo di perdita del tessuto scheletrico aumenta immediatamente dopo la menopausa (v.; v.***) ed interessa sia la componente trabecolare sia quella corticale dell'osso, sebbene in misura diversa. Il fenomeno inizia non appena i livelli delle gonadotropine ipofisarie aumentano. L'andamento della perdita della massa ossea da carenza estrogenica descrive nel tempo una curva di tipo esponenziale, esaurendosi dopo circa 10 anni. La perdita è molto veloce nei primi 3-5 anni dopo la menopausa e può raggiungere in 5 anni, in alcune donne, valori del 15% a livello lombare. È stato calcolato che la perdita ossea causata dalla menopausa corrisponda al 15-20% per l'osso spugnoso ed al 10% per quello corticale. Il fatto che la perdita di tessuto osseo interessi maggiormente quello spugnoso e che quest'ultimo prevalga a livello della colonna vertebrale e della metafisi delle ossa lunghe rende ragione del rilievo di una maggiore frequenza delle fratture osteoporotiche in tali sedi nel periodo immediatamente successivo alla menopausa.

L'enorme sviluppo registrato negli ultimi anni nel campo della biologia cellulare dell'osso ha profondamente modificato le nostre conoscenze riguardo la patogenesi della perdita della massa ossea da carenza estrogenica, sottolineando il ruolo di fattori locali anziché sistemici.

Nella specie umana, la menopausa fisiologica e l'ovariectomia inducono un aumento della produzione di interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-1 (IL-1) e di altre citochine (v.**; v. INTERLEUCHINE [v.*; v.**]) da parte dei monociti periferici; tale produzione, almeno per ciò che concerne IL-1, viene riportata nell'ambito della norma dal trattamento sostitutivo con estrogeni. Occorre tuttavia sempre tenere presente la possibilità che il modello di studio utilizzato non rifletta fedelmente le alterazioni che hanno luogo nel microambiente osseo e midollare. Alcuni risultati ottenuti *in vivo* nell'animale da esperimento dimostrano che la perdita ossea indotta dalla ovariectomia è associata ad un significativo incremento della formazione di osteoclasti in colture di cellule di midollo osseo e che tale aumento dipende essenzialmente da IL-6, la cui produzione è regolata dagli estrogeni. Inoltre il rilievo che la somministrazione di antieopiranti-IL-6 è in grado di influenzare l'osteoclastogenesi sottintende che l'osso di topi ovariectomizzati ma non in quelli con normale ovario, e che in questi ultimi sembra suggerire il

ruolo fondamentale dell'IL-6 nell'esaltato rimodellamento osseo documentabile in condizioni di carenza estrogenica ma non in condizioni di normale funzionalità ovarica. Infine, è stato recentemente dimostrato che l'espressione di gp 130, una glicoproteina che media la trasmissione del segnale intracellulare e pertanto gli effetti biologici di IL-6 e di altre citochine, è inibita dagli estrogeni ed aumenta *in vivo* nel midollo osseo dopo l'ovariectomia; ciò induce a ritenere che gli estrogeni e la loro carenza siano in grado non solo di modificare la produzione di questi fattori locali ma possano anche modulare la responsabilità cellulare alle stesse citochine.

La perdita della massa ossea da carenza estrogenica si accompagna ad un aumento del turnover scheletrico, testimoniato dall'incremento sia degli indici della decostruzione ossea che di quelli della osteogenesi. A livello tissutale l'aumento del turnover scheletrico da deficit estrogenico è da ricondurre ad una maggiore attività metabolica di ciascuna unità multicellulare di base (BMU: Basic Multicellular Unit [v. RIMODELLAMENTO OSSEO**]), con prevalenza del riassorbimento sulla formazione, oltre che da un loro aumento. Le lacune di riassorbimento scavate dagli osteoclasti a livello di ciascuna BMU in assenza di estrogeni hanno una maggiore profondità e ciò rappresenta il meccanismo responsabile della perforazione e dell'assottigliamento dei setti trabecolari, cui consegue la disorganizzazione architettonica e la maggiore fragilità dell'osso tipica dell'o. postmenopausale (figg. 1 e 2).

La velocità di perdita della massa ossea diminuisce notevolmente a partire dalla fine del sesto decennio di vita, anche se persiste indefinita. I meccanismi responsabili sembrano doversi ricondurre all'iperparatiroidismo secondario che si instaura con l'avanzare degli anni in rapporto alla riduzione dei livelli sierici di calcio ionizzato; tale riduzione è la conseguenza della diminuita efficienza dell'assorbimento del calcio oltre che di un ridotto apporto dello ione. A sostegno di tale ipotesi sono i risultati di recenti trials clinici i quali dimostrano che, nei soggetti anziani, la somministrazione di calcio e vitamina D è in grado di ridurre in maniera significativa la perdita di tessuto scheletrico ed il rischio di frattura, interrompendo tale catena di eventi.

Fattori determinanti e fattori di rischio dell'evento fratturativo

Non solo i fattori scheletrici ma anche quelli extraossei sottendono la patogenesi delle fratture da o.

Il trauma, soprattutto quello associato ad una caduta, ha ovviamente una parte cruciale; è logico, infatti, attendersi che un evento violento dia luogo con maggiori probabilità a frattura se esercitato su un tessuto scheletrico caratterizzato da valori ridotti di BMD. Tuttavia, l'evento fratturativo non è riconducibile solo alla ridotta densità ossea; la quota di energia che investe l'osso in una caduta è estremamente elevata ed in molti casi può causare la frattura anche di un osso normale qualora essa non venga dissipata dai tessuti sovrastanti. In accordo con ciò è stato dimostrato che la protezione delle anche con cuscinetti è in grado di ridurre notevolmente l'incidenza di fratture di femore. Questa semplice misura non ha ovviamente alcun effetto sulla fragilità scheletrica, ma è in grado di disperdere l'energia traumatica, allontanandola dallo scheletro.

È stato osservato che anche le caratteristiche geometriche del femore possono essere importanti nel condizionare il rischio di frattura. A sostegno di questa ipotesi è il rilievo di una ridotta incidenza di frattura di femore nelle donne giapponesi rispetto alle americane, nonostante le ultime abbiano valori di BMD femorale significativamente più elevati. Questa minore incidenza sarebbe da addebitare ad una maggiore lunghezza media del collo femorale nelle donne statunitensi che ne renderebbe più facile, per mere ragioni biomeccaniche, la frattura. Un recente studio condotto negli Stati Uniti ha rilevato, a conferma di ciò, che la brevità dell'asse femorale è associata ad un ridotto rischio di frattura.

Per ciò che riguarda, infine, l'identificazione precoce dei cosiddetti fattori che in aggiunta alla ridotta densità minerale ossea aumentano il rischio di andare incontro a frattura di femore (ridotta attività fisica, multiparità, eccessivo consumo di sigarette o di alcolici, etc.), un recente studio condotto da Cummings *et al.* (1995) ne ha evidenziati ben 16. È importante, tuttavia, sottolineare che l'impatto di ciascuno di questi fattori di rischio, considerato singolarmente, è modesto. Ciò potrebbe giustificare, almeno in parte, i discordanti risultati riportati per ogni singolo fattore nella vasta letteratura presente sull'argomento. Qualora, invece, tali fattori di rischio vengano considerati nel loro insieme, l'impatto diviene sostanziale soprattutto se viene incluso nell'analisi il valore della densità minerale ossea.

Diagnosi

Linee guida generali

Come ormai convenuto, per porre diagnosi di o. è necessario, per definizione (v. sopra), ricorrere alla misurazione della densità minerale ossea. Questa deve essere l'atto

finale (dopo un'attenta anamnesi e un oculato esame obiettivo del malato) e non unico della visita medica. È indispensabile poi la richiesta di alcuni esami (VES, emocromo completo, protidemia con elettroforesi, calcemia, fosforemia, calciuria e fosfaturia delle 24 ore), che servono ad un migliore inquadramento del malato ed ad escludere altre malattie metaboliche dello scheletro (ad es., l'iperparatiroidismo primitivo o l'osteomalacia). È, infine, necessario richiedere almeno un *marker* del turnover scheletrico per giudicare circa l'entità del rimodellamento osseo (v.**), e nel caso di valori particolarmente elevati procedere alla ricerca delle cause (ad. es., morbo di Paget, metastasi scheletriche).

Metodi di misura della densità minerale ossea

Negli ultimi tre decenni sono stati compiuti numerosi progressi nel campo della misurazione non invasiva della densità minerale ossea (BMD). I metodi attualmente a nostra disposizione ci consentono di porre diagnosi di o., di determinare il rischio di frattura e di valutare la risposta dello scheletro a vari agenti terapeutici. Sono in commercio numerosi densitometri i quali sono in grado di valutare sia il contenuto minerale corporeo totale che quello appendicolare ed assiale; inoltre è possibile valutare selettivamente, con un alto grado di precisione ed accuratezza, sia la BMD trabecolare che quella corticale di alcuni distretti scheletrici.

Le principali tecniche per la misurazione non invasiva della densità minerale scheletrica sono le seguenti: assorbimetria radiografica, assorbimetria a singolo raggio fotonico (SPA) o singolo raggio X (SXA), assorbimetria a doppio raggio fotonico (DPA) o raggio X (DEXA), tomografia computerizzata quantitativa (QCT), ultrasuonografia quantitativa (v. anche: MINERALOMETRIA OSSEA*; OSSO*).

Assorbimetria radiografica. - Chiamata anche *fotodensitometria*, è stata una delle prime tecniche impiegate per stimare la massa ossea periferica. La metodica consiste nella esecuzione di una radiografia della mano, che viene analizzata impiegando un densitometro ottico. Recenti modificazioni apportate alla metodica hanno notevolmente ridotto il margine di errore dovuto all'operatore e ne hanno migliorato la precisione. Sono presenti in letteratura numerosi lavori che documentano la capacità di questa metodica di identificare la perdita di massa ossea che ha luogo con l'avanzare degli anni. Essa è, inoltre, in grado di identificare la riduzione di massa ossea in pazienti con o. postmenopausale analogamente alle tecniche di densitometria tradizionale.

Assorbimetria a singolo raggio fotonico (SPA: Single Photon Absorptiometry) o raggio X (SXA: Single Energy X-Ray Absorptiometry). - L'SPA è stata introdotta negli anni '60. Successivamente,

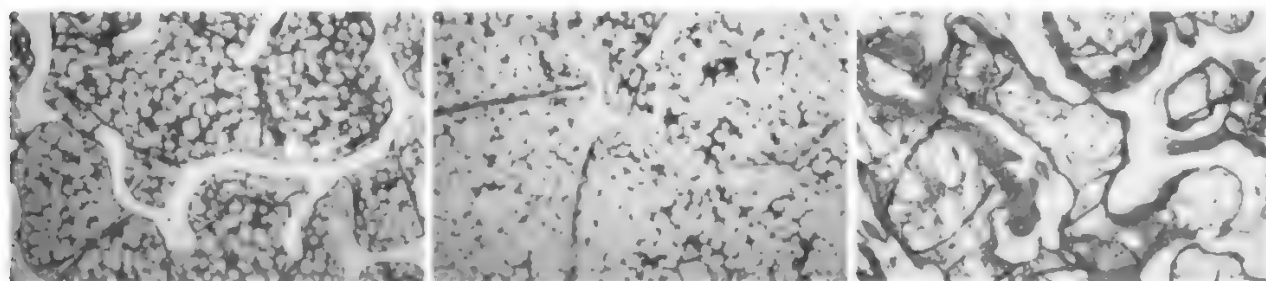


Fig. 2. Sezioni istologiche non decalcificate della biopsia della cresta iliaca di un osso normale (a sinistra) e di uno osteoporotico (al centro). Notare come in quest'ultimo risultino aumentate le cavità midollari mentre ridotti sono la cellularità, il numero e lo spessore delle trabecole ossee; queste ultime assumono il tipico aspetto pseudofratturato. Per confronto viene anche riportata (a destra) la sezione istologica di un osso osteomalacico, in cui si possono notare gli ampi ed estesi orli osteoidi (colorati in azzurro) caratteristici di questa malattia e patognomici di un difetto di calcificazione. (Per gentile concessione del Prof. E. Bonucci e della Dr.ssa P. Ballanti).

a seguito degli sviluppi tecnologici la sorgente di radionuclide è stata sostituita con quella a raggi X, risultandone un miglioramento della precisione ed accuratezza del sistema. Tali metodiche consentono di valutare il contenuto (mg/cm) e la densità minerale ossea (mg/cm²) a livello del polso e del calcagno. Esse sono risultate estremamente utili nella diagnosi di o, in quanto caratterizzate da accettabile accuratezza e precisione e minima esposizione radioattiva.

Assorbimetria a doppio raggio fotonico (DPA: Dual Photon Absorptiometry) o raggio X (DEXA: Dual Energy X-Ray Absorptiometry). – I densitometri a singola energia non possono misurare la BMD in siti scheletrici che hanno variabile composizione e spessore dei tessuti molli. Essi, pertanto, non sono idonei alla misurazione della BMD a livello della colonna, del femore o dello scheletro intero. Per tale motivo agli inizi degli anni '80 sono stati introdotti i densitometri a doppio fotone, che utilizzano due differenti tipi di radionuclidi, e successivamente, alla fine degli anni '80, sono stati commercializzati i densitometri a raggi X a doppia energia. Questi ultimi sono oggi largamente in uso sia in ambito di ricerca che nella pratica clinica; i siti preferenziali di scansione sono rappresentati dalla colonna lombare, dal femore prossimale e dall'intero scheletro, anche se è possibile valutare la BMD pure a livello del polso e del calcagno.

Nella misurazione in anteroposteriore della colonna lombare, la BMD può tuttavia risultare falsamente aumentata, soprattutto nei soggetti anziani, per la presenza di osteofiti, calcificazioni aortiche, ipertrofia degenerativa delle faccette articolari e restringimento degli spazi intervertebrali. Inoltre, l'area di misurazione comprende anche una certa quota di osso compatto che potrebbe ridurre il potere discriminativo tra soggetti normali e pazienti con o. Al fine di superare tali problematiche è stata introdotta la misura della densità minerale della colonna lombare in proiezione laterale; ciò rende possibile la valutazione pressoché esclusiva della componente trabecolare del corpo vertebrale riducendo in tal modo alcune delle potenziali cause di errore che si osservano con la misurazione in anteroposteriore. Occorre, tuttavia, rilevare che la riproducibilità della misurazione in laterale non è altrettanto buona rispetto a quella in anteroposteriore, in rapporto al maggior spessore ed alla maggiore variabilità dei tessuti molli. Tale inconveniente è stato in parte ridotto, dotando i densitometri di ultima generazione di un braccio mobile che permette di acquisire la scansione laterale con il paziente in posizione supina.

Tomografia computerizzata quantitativa (QCT: Quantitative Computed Tomography). – La QCT è in grado di valutare la densità volumetrica vera (mg/cm³) di osso trabecolare o corticale a livello del sito scheletrico esaminato. Poiché l'osso trabecolare della colonna è estremamente sensibile alle variazioni ormonali ed è molto importante per la resistenza vertebrale, la QCT è stata principalmente impiegata per la misurazione della BMD trabecolare a livello della colonna. La QCT spinale è eseguita utilizzando comuni strumenti TAC con tecniche che impiegano una dose ridotta di radiazioni (in genere, un centesimo di quella utilizzata per acquisire le immagini standard). Gli errori di precisione e accuratezza sono generalmente più elevati di quelli tipici della misurazione integrale della BMD mediante DEXA, anche se sono stati compiuti notevoli passi avanti per migliorare le caratteristiche tecniche e contemporaneamente per ridurre il tempo di acquisizione e analisi dell'immagine.

Esistono apparecchi di QCT che misurano la reale densità di tessuto osseo a livello del polso. Questa metodica sembra essere particolarmente promettente in virtù della sua facilità d'uso e della possibilità di stimare separatamente l'osso corticale e trabecolare; tuttavia ulteriori studi sono necessari per valutarne completamente le potenzialità.

Ultrasuonografia quantitativa. – Recentemente è stato notato un crescente interesse per l'uso dei cosiddetti «densitometri ad ultrasuoni» in rapporto al basso costo dell'apparecchiatura, alla facilità di trasporto e di uso ed al fatto che non impiegano radiazioni ionizzanti. Tali caratteristiche, unitamente ai risultati di studi clinici preliminari che ne hanno messo in evidenza una buona sensibilità, hanno notevolmente incoraggiato l'impiego di questi apparecchi, sia nella ricerca che nella pratica clinica.

I densitometri ad ultrasuoni misurano la velocità di trasmissione dell'ultrasuono (SOS: Speed of Sound) e/o l'attenuazione del segnale (BUA: Broadband Ultrasonic Attenuation) a livello del calcagno, della polso o della tibia e delle dita dei piedi e delle mani. Si

ritiene che queste due misurazioni siano influenzate non solo dalla massa ossea ma anche dalla struttura e composizione dello scheletro. In particolare, risultati di studi *in vitro* sembrano dimostrare che la misurazione di BUA è influenzata dalla BMD e dalla microarchitettura scheletrica, mentre il valore di SOS è influenzato sia dalla BMD che dalla elasticità.

Le informazioni tratte dalla misurazione con ultrasuoni sembrano complementari a quelle ottenute mediante densitometri tradizionali; tuttavia l'utilizzazione di ambedue le misurazioni potrebbe fornire un quadro sia qualitativo che quantitativo della massa ossea.

Impiego clinico della densitometria. – La diversità dell'approccio metodologico, del tipo di apparecchiatura, della calibrazione del contenuto minerale osseo e degli algoritmi utilizzati per l'analisi sono alla base delle differenze tra i più importanti densitometri impiegati, sia per quanto concerne l'area di tessuto osseo misurata che per ciò che riguarda il risultante valore di BMC (*Bone Mineral Content*) o di BMD. Per superare questi problemi sono stati effettuati numerosi studi sotto l'egida di un «Comitato internazionale per la standardizzazione della DEXA», allo scopo di trovare i fattori di cross-calibrazione necessari per uniformare i risultati ottenuti nel singolo paziente. Dai risultati di queste indagini sono state ricavate formule che permettono di uniformare i valori di BMD dei tre densitometri più utilizzati. Esistono oggi *software* in grado di fornire i risultati di BMD della colonna vertebrale in unità standardizzate. Questa ulteriore innovazione consentirà una diffusione sempre maggiore della densitometria nella pratica clinica.

Le indicazioni alla misurazione della densità minerale ossea sono state più volte definite; tuttavia, in accordo con le linee guida recentemente pubblicate, la misurazione della BMD dovrebbe essere richiesta in tutti i casi, indipendentemente dal sesso e dall'età, in cui il risultato dell'esame sia in grado di influenzare l'atteggiamento decisionale del medico.

I densitometri di ultima generazione sono in grado di valutare nella scansione laterale della colonna anche la *morfometria vertebrale*, fornendo pertanto utili indicazioni non solo sulla BMD ma anche sull'altezza dei corpi vertebrali. La misurazione di quest'ultima assumerà sempre maggiore importanza nei *trials* clinici, fornendo un ulteriore parametro sull'efficacia dei farmaci osteotropi.

Misura del turnover scheletrico mediante i marker

Impiego clinico dei marker del turnover scheletrico. – L'applicazione di tecniche di biologia molecolare sempre più sofisticate ha permesso di meglio definire, negli ultimi anni, i meccanismi che sottendono il complesso processo del turnover scheletrico. Ciò ha anche stimolato la ricerca e l'individuazione di *marker* del rimodellamento osseo (v.**) sempre più specifici e sensibili, unitamente alla messa a punto di metodi per la loro determinazione nei liquidi biologici. Ne è derivata l'immissione sul mercato di un numero esorbitante di indicatori del rimodellamento osseo, la cui validità clinica o superiorità nei confronti di quelli già esistenti è da valutare caso per caso.

La validità di un *marker* viene giudicata sulla base dei seguenti parametri: a) il *marker* deve essere dotato di specificità d'organo e di fase; b) una volta liberato in circolo, dovrebbe essere dotato di emivita abbastanza lunga e non dovrebbe subire ulteriori modificazioni, in modo da poter essere dosato immutato nel sangue o nell'urina; c) il prelievo del campione, il trasporto in laboratorio e la sua conservazione non devono alterare la struttura e l'integrità dell'analita; d) il metodo di dosaggio dovrebbe essere spe-

cifico, sensibile, riproducibile, relativamente semplice ed a prezzo contenuto.

Attualmente non vi è accordo tra i ricercatori su quale marker debba essere considerato «ideale». A volte, inoltre, riesce difficile trasferire le informazioni derivanti dalle ricerche cliniche nella pratica clinica. A tale riguardo, ad es., è sempre più evidente che la determinazione dell'escrezione totale delle piridinoline e dei peptidi ad esse correlati debba essere considerata un miglioramento tecnologico sia sotto il profilo della specificità che della sensibilità (v. RIMODELLAMENTO OSSEO**, *marker del turnover osseo*). Tuttavia non è proponibile un loro impiego qualora si vogliano esaminare per programmi di *screening* vaste popolazioni, in conseguenza del costo elevato non sostenibile dal nostro Servizio Sanitario Nazionale. A tale proposito occorre ricordare che, in assenza di alterazioni epatiche, il dosaggio dell'attività totale della fosfatasi alcalina, conserva ancora tutta la validità come *marker* di primo impiego, in ragione dell'ottima riproducibilità e del basso costo di analisi.

La valutazione dell'entità del *turnover* scheletrico assume un'importanza maggiore qualora l'uso dei farmaci si rivolga non alla terapia ma alla prevenzione dell'ò. È stato, infatti, dimostrato che, nel tempo, l'entità della perdita scheletrica è maggiore nei pazienti con più elevati indici di *turnover* osseo. Da un punto di vista pratico la misurazione di un *marker* molto specifico e sensibile del riassorbimento osseo andrebbe richiesta a quei pazienti con valori di densità minerale ossea compresi tra $> +2,0$ e $> +2,5$ DS rispetto alla popolazione fertile di controllo. Il rilievo di valori del *marker* $> 2,0$, in termini di *T score*, potrebbe infatti suggerire la necessità di una terapia preventiva dell'ò. Secondo i suggerimenti di alcuni AA., infine, una volta iniziata la terapia farmacologica occorrerebbe richiedere nuovamente la determinazione dei *marker* per valutare la *compliance* del malato e per giudicare l'effetto terapeutico. Sotto questo punto di vista il *marker* potrebbe dare indicazioni sull'effetto farmacologico entro un breve lasso di tempo, prima che possano essere manifesti gli effetti a lungo termine sulla densità minerale ossea.

Per quanto riguarda il significato, le caratteristiche e i fondamenti metodologici relativi ai principali *marker* del *turnover* osseo, v. RIMODELLAMENTO OSSEO**, *marker del turnover osseo*.

Prevenzione e terapia

Poiché è estremamente difficile incrementare la massa ossea, e pressoché impossibile ricostruire architettonicamente la struttura trabecolare, la prevenzione primaria della malattia e delle sue complicanze assume un ruolo cruciale. Tale esigenza è ancora più sentita, qualora si consideri che, ad es., a livello femorale la perdita di tessuto scheletrico continua anche negli ultimi decenni di vita, come recentemente confermato da studi di tipo prospettico. In letteratura sono presenti numerosi lavori che indicano un'azione preventiva della terapia ormonale sostitutiva (v. MENOPAUSA**) e non ormonale (sali di calcio, vitamina D, calcitonina e bisfosfonati [etidronato, pamidronato, alendronato; v. DIFOSFONATI*; **; per l'alendronato, cfr. Hosking *et al.*, 1998]).

Attualmente sono in commercio in Italia numerosi farmaci per il trattamento dell'ò, il cui impiego trova giustificazione nell'effetto positivo osservato sui valori di BMD. Essi possono essere suddivisi in base alla loro proprietà di stimolare la formazione di osso (sali di fluoro, steroidi anabolizzanti) o di inibirne il riassorbimento (estrogeni, calcitonina [v.; v.*], bisfosfonati, ipriflavone, sali di calcio, vitamina D [v. VITAMINE*, *calcitriolo e rimodellamento osseo*, col. *7588; RIMODELLAMENTO OSSEO**]) e suoi analoghi. Vi è tuttavia da rilevare che negli Stati Uniti, gli unici farmaci

approvati per il trattamento dell'ò, dalla *Food and Drug Administration* sono rappresentati dagli *estrogeni*, dalla *calcitonina di salmone*, cui del tutto recentemente si è aggiunto l'*alendronato* (*Medical Letter*, 1996; Hosking *et al.*, 1998). Quest'ultimo farmaco si è dimostrato estremamente efficace nella prevenzione secondaria delle fratture vertebrali ed extravertebrali (Black *et al.*, 1996). V. DIFOSFONATI**.

Appare, comunque, sempre più evidente che la semplice misurazione della densità minerale ossea non può essere considerata come l'unico parametro su cui valutare l'efficacia di un farmaco. Anche se altri indici (istomorfometrici, isotopici, del rimodellamento) possono essere presi in esame, nel futuro assumeranno sempre maggiore importanza la morfometria vertebrale e soprattutto la riduzione dell'incidenza di nuove fratture. Ciò perché lo scopo ultimo della terapia dell'ò è quello di mantenere e possibilmente incrementare la resistenza dello scheletro.

Attualmente sono in via di sperimentazione nuovi approcci terapeutici per il trattamento dell'ò; *trials* sono attualmente in corso per valutare l'efficacia terapeutica della somministrazione di *paratormone* (v.; v.***) a piccole dosi o di analoghi degli estrogeni. Recentemente infatti è stata rivolta particolare attenzione ai cosiddetti antagonisti estrogenici. Molte di queste sostanze, quali ad es. il *tamoxifene* (v.***) o il *raloxifene* (v.**; Delmas *et al.*, 1997; Gustafsson, 1998), possiedono alcune proprietà estrogeniche essendo in grado, per esempio, sia di inibire la perdita di tessuto scheletrico, conseguente alla carenza ormonale, sia di ridurre i livelli dei lipidi nel sangue; farmaci come il *raloxifene* (Evista*) sono inoltre caratterizzati da una scarsa capacità di stimolazione endometriale. In considerazione di tali duali proprietà, sia agoniste che antagonistiche, questi farmaci sono attualmente classificati con il termine di SERM (eponimo derivante dalla dizione inglese *Selective Estrogen Receptor Modulator*). Viste le caratteristiche positive sullo scheletro e sul profilo lipidico, congiuntamente all'assenza di stimolazione endometriale, è probabile che questi farmaci possano rappresentare l'alternativa futura alla terapia estrogenica. Inoltre è in fase preclinica la sperimentazione di inibitori degli osteoclasti, quali ad es. i *sali di stronzio*, i quali sarebbero in grado di inibire il numero degli osteoclasti attivi esplicando anche un effetto positivo sulla formazione ossea senza compromettere la mineralizzazione. Anche i *sali di silicio* sarebbero in grado di stimolare la formazione ossea. Da ultimo, i *fattori di crescita* (v.*; v.***) locali, quali ad es. l'IGF I e II o il TGF β , potranno rivelarsi agenti terapeutici importanti nel caso in cui si riescano a mettere a punto adeguate formulazioni farmaceutiche.

È, tuttavia, opportuno riaffermare il concetto che nel prossimo futuro, in considerazione delle vaste dimensioni epidemiche che va assumendo la malattia, dovrà essere rivolta sempre maggiore importanza alla *prevenzione primaria* dell'ò, cercando quindi di favorire nei primi decenni di vita tutte le misure alimentari e fisiche in grado di aumentare il picco di massa ossea.

Bibliografia

- Black D. M. *et al.*, *Lancet*, 1996, **348**, 1539-1541.
- Block J. E., Smith R., Gluer C. C. *et al.*, *J. Bone Miner. Res.*, 1989, **4**, 249-257.
- Chapuy M. C., Meunier P. J., *Aging Clin. Exp. Res.*, 1995, **7**, 164-173.
- Christiansen C., Riis B. J., Rødbro P., *Lancet*, 1987, **1**, 1105-1108.
- Compston J. E., Cooper C., Kanis J. A., *Br. Med. J.*, 1995, **310**, 1507-1510.
- Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, *Am. J. Med.*, 1993, **94**, 636-650.
- Cummings S. R., Nevitt M. C., Browner W. S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 767-773.
- Delmas P. D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337** (23), 1641-1647.

OSTEOPOROSI

- Dempster D. W., Lindsay R., *Lancet*, 1993, **341**, 797-801.
 Faulkner K. G., Cummings S. R., Black D. et al., *J. Bone Min. Res.*, 1993, **8**, 1211-1217.
 Genant H. K., Grampp S., Gluer C. C. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **9**, 1503-1514.
 Gennari L., Brandi M. L., *Osteoporosis News*, 1995, **5**, 1-5.
 Girasole G., Giuhani N., *Ann. Ital. Med. Int.*, 1995, **10**, 9S-17S.
 Guidelnes for the clinical utilization of bone mass measurement in the adult population, *Calcif. Tissue Int.*, 1995, **57**, 251-252.
 Gustafsson J.-A., *Nature Medicine*, 1998, **4** (2), 152-153.
 Heaney R. P., *Ann. Rev. Nutr.*, 1993, **13**, 287-316.
 Hosking D. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 485-492.
 Johnston C. C. jr., Slemenda C. W., *Bone*, 1995, **17**, 19S-22S.
 Kanis J. A., Melton L. J., Christiansen C. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **9**, 1137-1141.
 Kaufman J. J., Einhorn T. A., *J. Bone Miner. Res.*, 1993, **8**, 517-525.
 Keene G. S., Farrer M. J., Pryor G. A., *Br. Med. J.*, 1993, **307**, 1248-1250.
 Lauritzen J. B., Petersen M. M., Lund B., *Lancet*, 1993, **341**, 11-13.
 Manolagas S. C., Jilka R. L., *N. Eng. J. Med.*, 1995, **332**, 305-311.
 Mazzuoli G. F., *Osteoporosis News*, 1994, **4** (2), 1-11.
 Mazzuoli G. F., D'Erasmo E., Minisola S. et al., *Clin. Rheumatol.*, 1989, **9** (suppl. 2), 22-29.
 Mazzuoli G. F., Gennari C., Passeri M. et al., *Osteoporosis Int.*, 1993, **3**, S8-S9.
 Mazzuoli G. F., Minisola S., Valtorta C. et al., *Isr. J. Med. Sci.*, 1985, **21**, 875-877.
Medical Letter, 1996, **25** (n. 965 ed. USA), 15.
 Minisola S., Pacitti M. T., Scarda A. et al., *Bone and Mineral*, 1993, **23**, 183-193.
 Morrison N. A., Qi J. C., Tokita A. et al., *Nature*, 1994, **367**, 284-287.
 Mundy G. R., *Nature*, 1994, **367**, 216-217.
 Mundy G. R., *The Endocrinologist*, 1995, **5**, 176-179.
 Nakamura T., Turner C. H., Yoshikawa T. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **9**, 1071-1076.
 Riggs B. L., Melton L. J., *Bone*, 1995, **17**, 505S-511S.
 Seeman E., Tsalamandris C., Bass S., Pearce G., *Bone*, 1995, **17** (suppl. 2), 23S-29S.

SAVATORE MINISOLA

OTITI [v. vol. XI, coll. 327-350]

OTITE MEDIA IN ETÀ PEDIATRICA

SOMMARIO

Introduzione, definizione e classificazione (col. 4275). - **Etiologia e fisiopatologia dell'otite media acuta (OMA)** (col. 4276). - **Fattori di rischio per l'insorgenza e le recidive dell'otite media acuta (OMA)** (col. 4277). - **Problemi diagnostici** (col. 4278). - **La relazione tra OMA e otite media con effusione (OME) e loro sequele** (col. 4278). - **Terapia dell'OMA** (col. 4279): *Il razionale per l'utilizzo della terapia antibiotica. - La scelta dell'antibiotico. - Il fallimento della terapia. - La ricorrenza precoce. - Durata della terapia. - Farmaci inutili. - La prevenzione dell'otite media acuta ricorrente (OMAR) e il trattamento dell'otite media con effusione (OME)* (col. 4282). - **Conclusioni** (col. 4285).

Introduzione, definizione e classificazione

L'otite media rappresenta una delle patologie più comuni in età pediatrica e un rilevante problema di salute pubblica. È stato stimato che l'incidenza è pari a 10-20 episodi/100 bambini per anno (Klein, 1989) e che entro l'età di 7 anni il 65-93% dei bambini va incontro almeno ad un episodio di otite media acuta (OMA) (Rivard e Fernandez, 1993), con una frequente tendenza alle recidive (≥ 3 episodi) che riguarderebbe il 20% dei bambini entro un arco di tempo di 6 mesi (Teele et al., 1989). In Inghilterra il carico assistenziale è pari al 12,4% delle visite ambulatoriali pediatriche e all'1,7% di quelle di un ambulatorio di medicina generale per anno (Froom et al., 1990) e negli U.S.A. il costo sociale della malattia è compreso tra i 3 e i 4 miliardi di dollari (Stool e Field, 1989; Berman, 1995). Data la diffusione di questa malattia e la conoscenza delle sue cause, stupisce a prima vista constatare che non vi sia nella letteratura e nella pratica (Froom et al., 1990) una strategia comune diagnostica e terapeutica da mettere in atto. Inoltre, la dispo-

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELL'OTITE MEDIA

Acuta (OMA)	Infiammazione dell'orecchio medio con versamento endotimpanico, ad insorgenza improvvisa con segni e sintomi della flogosi quali otalgia, febbre, irritabilità. Breve durata. Rischio di complicanze acute e croniche
Ricorrente (OMAR)	3 episodi di OMA in 6 mesi o 4 in un anno
Con effusione (OME)	Presenza di versamento nell'orecchio medio in assenza di flogosi acuta, persistente per oltre 3 mesi

nibilità sul mercato di un numero sempre crescente di composti antimicrobici e le conseguenti spinte di «scuole» di pensiero molto vicine agli interessi di mercato, hanno creato nella pratica molti dubbi rispetto ad una patologia che, nel corso del tempo, ha conservato una sostanziale stabilità epidemiologica con una tendenza alla scomparsa di quei casi complicati che in passato destavano molte preoccupazioni.

Già per quanto riguarda la classificazione delle varie forme di patologia dell'orecchio medio, l'accordo non è generale e risente di quelle che sono le opinioni delle diverse figure professionali che si occupano del problema (pediatrici, medici di base, otologi). Basta a riguardo considerare che solo nel 1978 (Senturia et al., 1980) si è giunti ad un primo tentativo di accordo che ha distinto le forme acute (OMA) da quelle con effusione (OME), sgombrando il campo dalle vecchie definizioni basate sull'aspetto del materiale presente nell'orecchio medio (mucoso, sieroso, purulento). D'altra parte la definizione di otite media acuta ricorrente (OMAR) è ancora più recente, ed i criteri diagnostici differiscono tra diversi AA.

La classificazione dell'otite media (tab. I) riveste un ruolo importante in quanto ad ogni categoria corrispondono criteri diagnostici, terapeutici e di follow-up diversi.

Etiologia e fisiopatologia dell'otite media acuta (OMA)

La causa dei frequenti episodi di OMA in età pediatrica è da ricercare in alcuni fattori favorevoli che sono di natura anatomica ed infettiva. Il primo è legato alla particolare conformazione della tuba di Eustachio in età pediatrica: essa infatti è costituita da una struttura prevalentemente ossea (a differenza dell'adulto in cui i 2/3 sono cartilaginei) ed ha una scarsa inclinazione sul piano orizzontale (10°). Pertanto le funzioni della tuba (ventilazione, drenaggio e protezione dell'orecchio medio) risultano essere deficitarie. La condizione di «deficit fisiologico» può essere accentuata da eventuali ostacoli di natura estrinseca (come ad es. in corso di ipertrofia adenoidica) od intrinseca (in corso di infezioni delle prime vie aeree) con successivo accumulo di secrezione nell'orecchio medio, disfunzione tubarica e sovrainfezione da germi provenienti dal rinofaringe per aspirazione o insufflazione. Questo spiega la stagionalità degli episodi acuti, che si verificano più frequentemente in autunno ed inverno.

È ormai ampiamente riconosciuto che i batteri sono gli agenti etiologici più importanti nell'OMA. Infatti si possono isolare dall'essudato prelevato per timpanocentesi in circa il 70% dei casi (Giebink, 1989). Un'analisi della letteratura che ha tenuto conto di 13 studi pubblicati tra il 1970 ed il 1986 con una casistica complessiva di 4157 casi (Giebink, 1989), mostra come lo *Streptococcus pneumoniae* e l'*Haemophilus influenzae* siano i batteri più frequentemente responsabili (rispettivamente nel 30% e 20% dei casi), se-

guiti da *Moraxella catarrhalis* (6%), *Streptococcus pyogenes* (2%) e *Staphylococcus aureus* (2%). Nel corso del tempo il profilo etiopatogenetico dei diversi agenti batterici è rimasto sostanzialmente lo stesso, sebbene recentemente sia stato riportato un aumento dell'OMA da *Moraxella catarrhalis*, il cui ruolo sembra essere tuttavia variabile nel tempo e tra le diverse popolazioni.

Il ruolo dei virus è tuttora oggetto di valutazione e controversie. Il progressivo affinarsi delle tecniche diagnostiche (coltura virale e determinazione degli antigeni virali) ha evidenziato che i casi di OMA ad esclusiva etiologia virale sono rari (6%) e che nel 26-42% dei casi si isolano dal nasofaringe e/o dall'orecchio medio dei virus respiratori (infezioni miste) (Arola *et al.*, 1990). D'altra parte, anche semplici criteri di valutazione clinica confermano il ruolo delle infezioni delle prime vie aeree (URTI; *Upper Respiratory Tract Infections*) nella genesi dell'OMA: i sintomi delle URTI, quali raffreddore e tosse, sono presenti nel 70-90% dei pazienti con OMA e nel 30% dei bambini con infezione delle prime vie aeree si svilupperebbe come complicanza un'otite media acuta (Wald, 1991). Questi dati hanno notevoli implicazioni da un punto di vista pratico, in quanto la concomitante infezione virale può essere una delle cause dell'insuccesso terapeutico della terapia antibiotica che si verificherebbe in una piccola frazione di bambini (v. sotto) con OMA.

Fattori di rischio per l'insorgenza e le recidive dell'otite media acuta (OMA)

I fattori di rischio sono per molti aspetti gli stessi delle infezioni respiratorie ricorrenti a cui l'OMA, come detto, può essere per molti aspetti correlata (tab. II). La presenza di *fratelli nel nucleo familiare e la frequenza all'asilo nido* (Alho *et al.*, 1990; Hardy e Fowler, 1993) sono due condizioni di rischio che trovano una spiegazione nei più frequenti contatti tra bambini, con conseguente maggiore facilità e probabilità a contrarre infezioni delle prime vie aeree. Il *Sesso maschile* (Rivard e Fernandez, 1993) è più predisposto a contrarre qualsiasi tipo di infezione con carattere di ricorrenza che interessi le prime vie aeree. La correlazione positiva tra la *storia di infezioni gravi e recidivanti dell'orecchio nei fratelli o nei genitori* e di OMA recidivanti nel bambino identifica una probabile predisposizione genetica. A riguardo vi sono recenti evidenze che ipotizzano nelle *alterazioni delle difese dell'ospite* la causa delle OMA gravi o con carattere di ricorrenza; tali alterazioni riguarderebbero «un'immaturità immunologica» (deficit delle sottoclassi di IgG₂) che potrebbe riconoscere una base genetica (Shackelford *et al.*, 1986). Come pure, le *anomalie anatomiche del massiccio facciale* (nella sindrome di

Down e nella palatoschisi), comporterebbero un'alterata dinamica tubarica, che spiegherebbe l'elevata frequenza degli episodi. La *precocità d'insorgenza del primo episodio* di OMA sembra essere uno degli indici predittivi più forti di patologia recidivante (Berman, 1995). Disfunzioni anatomiche, fisiologiche e immunologiche potrebbero essere responsabili di questa maggiore suscettibilità, ma dati a supporto di questa ipotesi sono a tutt'oggi carenti. L'esposizione al *fumo passivo* aumenta non solo l'incidenza di nuovi episodi di OMA, ma anche la comparsa e la durata dell'OME (Barr e Coatesworth, 1991; Etzel *et al.*, 1992; Ey *et al.*, 1995), mentre un fattore «protettivo» sembra invece essere espletato dall'*allattamento al seno prolungato*. I rapporti fra la *condizione atopica* e la comparsa di otite media non sono del tutto chiari (Rivard e Fernandez, 1993), ed al momento sembra che l'allergia possa avere un ruolo patogenetico nell'ostruzione della tuba di Eustachio con conseguente possibile comparsa di effusione, mentre non comporterebbe una maggiore frequenza di episodi acuti e ricorrenti di otite.

Problemi diagnostici

La diagnosi di OMA è basata sull'aspetto e sulla mobilità della membrana timpanica (osservazione con otoscopio pneumatico) e sulla sintomatologia accusata dal bambino. I sintomi possono essere suddivisi in quelli di solito associati all'infezione da virus respiratorio (tosse e rinite) e in altri quali l'otalgia, la febbre, il vomito, la diarrea, l'irritabilità, l'inappetenza che in alcuni studi (per altro molto variabili per metodi utilizzati e risultati ottenuti) risultano essere presenti più spesso in corso di OMA rispetto ai pazienti con infezione respiratoria acuta senza OMA. Tuttavia, tali sintomi sono presenti da soli o contemporaneamente in una bassa percentuale di casi (ad es. l'otalgia e la febbre sono riportati soltanto nella metà dei casi) (Arola *et al.*, 1990; Uhari e Niemelä, 1995) e in 1/3 dei bambini questi possono essere assenti (Berman, 1995). Anche l'aspetto della membrana timpanica è altamente variabile e la diagnosi può risultare molto soggettiva. I problemi di diagnosi si verificano più frequentemente nei bambini al di sotto dell'anno di vita, in quanto a questa età i sintomi possono essere aspecifici e l'esame otoscopico risulta essere tecnicamente difficile. A conferma di quanto detto, in una sorveglianza sulla gestione dei casi di OMA condotta in 8 nazioni (Froom *et al.*, 1990), la sicurezza diagnostica espressa dai pediatri e medici di base è risultata essere complessivamente del 58% nei bambini al di sotto dell'anno di vita e del 73% al di sopra dei 30 mesi.

La relazione tra OMA e otite media con effusione (OME) e loro sequele

L'insorgenza e la storia naturale dell'OME sono attualmente poco conosciute, come pure la relazione tra OMA ed OME. La prevalenza dell'OME nella popolazione scolastica è circa del 15-20%, con una distribuzione bimodale presentando un picco di frequenza intorno al 2° ed al 5° anno di età (Zielhuis *et al.*, 1989). Per quanto concerne il ruolo degli agenti infettivi, nel 30-50% dei casi è possibile isolare gli stessi germi responsabili dell'OMA (Giebink *et al.*, 1989).

Dopo ogni episodio di OMA è presente un versamento endotimpanico nell'orecchio medio, che nel 60-90% dei casi si risolve spontaneamente entro tre mesi (Casselbrant, 1989), mentre nel 10-30% dei casi tenderebbe a persistere dopo tale periodo, configurando un quadro patologico di OME persistente (Berman, 1995), che tuttavia tende alla risoluzione spontanea entro 12 mesi nel 95% dei casi (De Melker, 1993). È importante sottolineare che la presenza di un versamento endotimpanico non è sempre conseguente

TAB. II. FATTORI DI RISCHIO PER L'INSORGENZA E LE RECIDIVE DI OMA

Sesso maschile
Frequenza all'asilo nido
Storia di infezioni gravi o recidivanti di OMA nei fratelli o nei genitori
Età precoce al momento dell'episodio iniziale di OMA
Mancato allattamento al seno
Alterazioni anatomiche, fisiologiche o immunologiche delle difese dell'ospite
Fumo passivo
Condizione atopica

ad un episodio di OMA, ma può essere anche una condizione «a se stante» che potrebbe a sua volta predisporre ad una maggiore frequenza di episodi di OMA. Esiste molto probabilmente una continuità ed un continuo sconfinamento tra le due forme con momenti patogenetici non del tutto chiari e con un *primum movens* legato verosimilmente ad una disfunzione tubarica.

Le complicanze acute dell'OMA sono attualmente molto rare e la loro riduzione nel corso del tempo è dovuta alla introduzione della terapia antibiotica e al miglioramento dello stato socioeconomico della popolazione. La persistenza del versamento endotimpanico può provocare una sordità di tipo trasmissivo che nella maggior parte dei casi è reversibile. Tuttavia la ricorrenza degli episodi acuti (otite media acuta ricorrente; OMAR) contribuisce alla persistenza del versamento, che se bilaterale potrebbe comportare (nel bambino piccolo) ipoacusia (cl clinicamente rilevante se pari o superiore ai 20 dB) con possibile difetto dell'espressione verbale (Teele *et al.*, 1984; Roberts *et al.*, 1989) e riduzione delle capacità di concentrazione e di autonomia (Roberts *et al.*, 1989). Recentemente, la ricorrenza degli episodi è stata associata anche ad iperattività e ad altri problemi di natura comportamentale (Adesman *et al.*, 1990). Tuttavia, queste relazioni necessitano di ulteriori studi prospettici che valutino anche l'interazione di alcune variabili potenzialmente confondenti e che stabiliscano la reale «rilevanza epidemiologica» di queste sequele. Pertanto è ragionevole affermare che allo stato attuale delle conoscenze gli effetti a lungo termine dell'OME sullo sviluppo comportamentale del bambino non sono noti (Rivard e Fernandez, 1993; De Melker, 1993).

Terapia dell'OMA

Gli interrogativi più concreti che si pongono nella pratica di fronte al cosa fare in presenza di un bambino con un'otite media suppurativa possono essere riassunti nei seguenti punti.

1. Quale scelta terapeutica va fatta (uso o non uso dell'antibiotico; tipo di antibiotico; quali altri farmaci utilizzare)?
2. In caso di insuccesso terapeutico o di ricorrenza dell'episodio entro 1 mese, che strategia bisogna seguire?
3. Quanto deve durare la terapia?

Il razionale per l'utilizzo della terapia antibiotica

Il primo interrogativo può sembrare apparentemente banale e con una risposta di fatto già acquisita se si tengono in considerazione le seguenti affermazioni:

- a) l'etiologia dell'OMA è prevalentemente batterica;
- b) l'impatto sulla morbidità della terapia antibiotica è stato drammatico, se si considera che le complicanze intracraniche dell'OMA sono passate dal 2% dell'era preantibiotica all'attuale irrisoria percentuale.

Tuttavia, a ben guardare la letteratura, ci si rende conto che le cose non sono così semplici o per lo meno sempre così vere. Nel corso degli ultimi 20 anni, molti AA. hanno valutato in studi osservazionali quale fosse la frazione di bambini che guariva spontaneamente senza l'uso dell'antibiotico, utilizzando unicamente una terapia sintomatica (paracetamolo o ac. acetilsalicilico, gocce nasali di soluzione fisiologica) (Van Buchem *et al.*, 1985; Bollag, 1991) e, in studi clinici controllati, quale fosse il beneficio atteso dall'utilizzo della chemioterapia rispetto ai pazienti trattati con placebo (Burke *et al.*, 1991; Appleman *et al.*, 1991) o con solatimossazolo (Hendallhard *et al.*, 1989; Kaleida *et al.*, 1991). I risultati di tali ricerche sono molto contrastanti e risentono fortemente dei diversi criteri adottati di inclusione e di valutazione dell'esito. Pur tenendo conto di que-

sti limiti, le evidenze che si ricavano sono di estremo interesse e possono essere così riassunte:

a) i risultati degli studi clinici controllati e randomizzati (RCT; *Random Controlled Trial*) mostrano che nei bambini trattati con placebo la percentuale di guarigione spontanea è molto alta (81%; intervallo di confidenza [IC]: 69%-94%) (Rosenfeld *et al.*, 1994);

b) la «modesta» frazione di bambini che ha un insuccesso terapeutico è minore nel gruppo trattato con antibiotico rispetto a quello trattato con placebo (miglioramento del 13,7%; IC: 8,2%-19,2%) (Rosenfeld *et al.*, 1994) e tale beneficio sembra essere più evidente nei bambini con età inferiore ai 2 anni (Appleman *et al.*, 1991);

c) la terapia antibiotica migliorerebbe il decorso clinico a breve termine della malattia (durata della febbre, uso degli analgesici/antipiretici, giorni di assenza dalla scuola), anche se in percentuale relativamente modesta. Nessun vantaggio si avrebbe sulla ricorrenza degli episodi.

Inoltre, nei bambini non in terapia con l'antibiotico, non è stata segnalata l'insorgenza di complicanze acute, anche se bisogna sottolineare che molti di questi studi non avevano una numerosità sufficiente del campione tale da poter evidenziare la possibile insorgenza di tali complicanze, quali la mastoidite.

La trasferibilità nella pratica di questi risultati è di un certo interesse. Infatti, in presenza di una diagnosi sicura di OMA la scelta della terapia antibiotica ha un suo razionale e un suo beneficio, anche se in una piccola percentuale di bambini, soprattutto con età inferiore ai 2 anni. Tuttavia, nei casi in cui la diagnosi è solo di presunzione (difficoltà di visione otoscopica, concomitanza di altri sintomi respiratori, etc.) l'attesa (con l'utilizzo di soli sintomatici) può avere un suo razionale scientifico, come dimostrato dagli orientamenti terapeutici adottati in alcune nazioni (Van Buchem *et al.*, 1985; Bollag, 1991).

La scelta dell'antibiotico

Recentemente, sono apparsi sul mercato molti nuovi antibiotici con indicazione specifica per il trattamento dell'OMA, e quasi tutti sono propagandati come farmaci di prima scelta (cefalosporine soprattutto) rispetto ai tradizionali presidi terapeutici (*amoxicillina* e *cotrimossazolo*). Tali farmaci, in una recente sorveglianza condotta in Italia nella pediatria di base, sono risultati essere largamente utilizzati per la terapia dell'OMA (2/3 delle prescrizioni di antibiotici) (Marchetti e Misticoni, 1994). Tuttavia, i risultati di un recente lavoro di metanalisi su 5400 bambini, che ha valutato in modo comparativo l'efficacia dei diversi antibiotici (Rosenfeld *et al.*, 1994), evidenziano che, pur tenendo conto dei limiti con cui sono stati condotti i RCT, tutti i «nuovi» antibiotici sperimentati (compresi quelli beta-lattamasi resistenti), sembrano avere la stessa efficacia dell'*amoxicillina* (40-50 mg/kg/die in 2-3 somministrazioni) e del *cotrimossazolo* (24-48 mg/kg/die in 2 somministrazioni) nella risoluzione dei segni e sintomi dell'OMA e nella risoluzione dell'OME.

L'efficacia nella eradicazione batterica dei diversi antibiotici sembra variare tra i farmaci utilizzati, anche se, a differenza di quanto viene propagandato, non sembra essere sempre favorevole per i nuovi composti beta-lattamasi resistenti (Scott-Giebink *et al.*, 1991). A fronte di queste valutazioni sulla efficacia batteriologica, è importante sottolineare come non ci sia sempre concordanza tra il risultato clinico e quello batteriologico: in una recente revisione del problema (Carlin *et al.*, 1991), è stato dimostrato che 25 dei 40 pazienti (62%) con fallimento nella eradicazione batterica erano guariti clinicamente, e 17 dei 32 pazienti (53%) con la persistenza dei sintomi dopo trattamento avevano un

essudato endotimpanico sterile. Questi risultati farebbero ipotizzare che altri meccanismi (infezione virale concomitante, persistenza del processo infiammatorio), non strettamente legati all'infezione batterica, potrebbero spiegare la persistenza dei sintomi clinici dopo 48-72 ore dall'inizio della terapia (Carlin *et al.*, 1991; Arola *et al.*, 1990).

Il fallimento della terapia

Tale condizione si verifica nel 10% dei casi di OMA. Sulla base delle osservazioni fatte in precedenza, per poter trattare solo alcune OMA e non tutte sarebbe auspicabile conoscere a priori quelle che sono destinate con maggior frequenza ad avere un decorso irregolare. Tuttavia, al momento i fattori di rischio associati al fallimento della terapia sono poco conosciuti e, dai pochi studi condotti sul problema, questa probabilità sembra maggiore nei bambini con età inferiore ai 15 mesi, con una storia personale (o familiare) di OMAR e che hanno avuto un episodio di OMA nel mese precedente (Berman, 1995; Hathaway *et al.*, 1994). Non sembra esserci una correlazione tra la severità dell'infezione (basata sull'esame otoscopico) ed il decorso irregolare della malattia (Appleman *et al.*, 1993). In questi casi, la strategia terapeutica da seguire è molto empirica anche se, come detto, si intuisce che in circa la metà dei casi l'insuccesso terapeutico può essere attribuito al perpetuarsi del processo infiammatorio, indipendente dalla persistenza dell'agente eziologico. Questo può avere notevoli implicazioni pratiche:

a) l'uso (razionale in circa il 50% dei casi) di un altro antibiotico (se è stata utilizzata in prima battuta l'amoxicillina può essere prescritto il cotrimossazolo o l'amoxicillina + acido clavulanico o una cefalosporina di II o III generazione e viceversa) deve essere sempre accompagnato dall'utilizzo di un analgesico/antipiretico (Scott-Giebink *et al.*, 1991);

b) ciascun medico dovrebbe porre molta cautela nell'arrivare a delle conclusioni sull'efficacia comparativa dei farmaci basate solo sulla propria esperienza.

La ricorrenza precoce

La scelta sulla strategia terapeutica da seguire in caso di ricorrenza (a distanza di 30 giorni dall'episodio) è molto problematica in quanto gli studi che sono stati condotti sono pochi e con risultati contrastanti. Il problema è quello di capire se il nuovo episodio infettivo è sostenuto dallo stesso batterio che ha determinato il primo episodio (ricadute) o da differenti specie batteriche (reinfezioni). Carlin *et al.* (1987), in uno studio condotto su 29 bambini, riportano che nel 75% dei casi, i ceppi batterici erano differenti nei due episodi infettivi (reinfezione), mentre Barenkamp *et al.* (1984), in una valutazione che ha tenuto conto solo dei ceppi batterici di *H. influenzae*, hanno rilevato che 9/13 bambini presentavano una ricaduta. In un altro studio (Harrison *et al.*, 1985), è stato evidenziato che il 62% dei germi isolati era suscettibile all'antibiotico utilizzato in precedenza. Alla luce di queste controverse evidenze, le considerazioni pratiche che si possono trarre sono simili a quelle relative al trattamento dei casi di fallimento terapeutico. La suscettibilità alla ricorrenza è da imputare alla persistenza del ceppo batterico (ricaduta) solo in una bassa percentuale di casi ed altri fattori individuali (non ben conosciuti) potrebbero favorire il ripetersi dell'infezione. Come detto, nei pazienti che vanno incontro a una o più ricorrenze, la probabilità che si abbia un decorso «irregolare» della malattia è maggiore rispetto a quelli che hanno avuto un solo episodio.

La scelta terapeutica (anche se empirica) deve cadere sullo stesso tipo di antibiotico utilizzato nel trattamento del

primo episodio (o, in alternativa, se è stata utilizzata l'amoxicillina sul cotrimossazolo o sull'amoxicillina + ac. clavulanico) con un'attenta osservazione clinica di tre giorni (Scott-Giebink *et al.*, 1991).

Durata della terapia

Anche su questo aspetto del problema non c'è un consenso unanime, come dimostrano i dati di prescrizione dei medici di base di diverse nazioni (Froom *et al.*, 1990). Negli U.S.A. per esempio, la durata convenzionale della terapia è di 10 giorni, in Italia di 7-8 giorni (Marchetti e Misticoni, 1994). D'altra parte, un periodo più breve di trattamento di 3 (Chaput De Saintonge *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1985; Sacher *et al.*, 1990) o di 5 giorni (Hendrickse *et al.*, 1988), largamente diffuso nella pratica medica Europea (in modo particolare in Gran Bretagna), sembra essere ugualmente efficace rispetto ad una terapia più prolungata di 7 o 10 giorni sulla guarigione clinica e sull'incidenza delle ricadute (valutata in un arco di tempo compreso tra 2 e 12 mesi), con l'unica eccezione dei pazienti con otorrea (Hendrickse *et al.*, 1988), di età inferiore ad un anno (Sacher *et al.*, 1990) e, anche se mancano valutazioni controllate a riguardo, con storia personale per OMAR e con un episodio di ricorrenza (Marchetti e Misticoni, 1994). La scelta, in casi selezionati, di questo regime terapeutico «breve» può avere notevoli vantaggi che sono facilmente intuibili: miglioramento della compliance, riduzione degli effetti collaterali e, non ultimo, la riduzione dei costi. È stato stimato che negli U.S.A. l'utilizzazione della terapia antibiotica per 5 giorni, rispetto ai convenzionali 10 giorni, porterebbe ad un risparmio in un anno di circa 50 milioni di dollari. Per queste considerazioni, sono da guardare con un certo sospetto gli studi (molto pochi) che propagandano regimi terapeutici brevi con l'utilizzo di una cefalosporina di III generazione (ceftriaxone) somministrata in singola dose per via intramuscolare e per un solo giorno (Green e Rothrock, 1995) o dei nuovi macrolidi (azitromicina; v. MACROLIDI**), con il solo risultato di aumentare notevolmente i costi rispetto alle correnti raccomandazioni di trattamento (Sagraves e Maish, 1994).

Farmaci inutili

Largamente prescritti nella pratica (Marchetti e Misticoni, 1994) per il trattamento dell'OMA sono i farmaci mucolitici (utilizzati per via sistemica e per aerosol), antistaminici e i vari prodotti topici (gocce nasali) che in studi controllati non si sono dimostrati efficaci nel ridurre la durata della malattia. Consigliabile invece, come già detto, l'utilizzo di analgesici-antipiretici e di gocce nasali di soluzione fisiologica per il controllo della sintomatologia (febbre, dolore, etc.), mentre controverso è il ruolo delle gocce otologiche (a base di antibiotici ed anestetici locali) per il controllo della sintomatologia dolorosa, in quanto il loro uso sistematico potrebbe impedire un'accurata valutazione otoscopica e, in caso di perforazione della membrana timpanica, si corre il rischio di sordità iatrogena da aminoglicosidici e polimixina.

La prevenzione dell'otite media acuta ricorrente (OMAR) e il trattamento dell'otite media con effusione (OME)

La ricorrenza ripetuta degli episodi di OMA rappresenta un serio problema per molti bambini ed è causa di un notevole «sovraccarico familiare» e di un alto costo sociale (in termini di esami strumentali e giornate lavorative perse). La letteratura fornisce numerose definizioni dell'OMAR che consiste in un certo numero di separati episodi durante un dato lasso di tempo. Alcuni AA. hanno stabilito il limite di 3 o più distinti episodi in 6 mesi o di 4 in un anno.

Attualmente due sono gli interventi proposti per la profilassi, uno di natura chirurgica (timpanostomia, poco praticata in Italia) e l'altro di natura medica (terapia antibiotica in unica somministrazione giornaliera, a basse dosi e per periodi prolungati).

L'impiego dei vaccini (contro l'influenza, il pneumococco e l'*H. influenzae*) è ancora in fase sperimentale, data la scarsa efficacia nel bambino piccolo (per il pneumococco) e la breve durata dell'immunizzazione (Berman, 1995). L'efficacia dell'inserzione di tubi timpanostomici è molto controversa (Casselbrant *et al.*, 1992) ed inoltre questa metodica presenta una serie di controindicazioni ed effetti collaterali (timpanosclerosi) che ne limitano l'uso.

La profilassi farmacologica continua è stata la prima ad affermarsi ed è quella che al momento attuale riceve i maggiori consensi. Per valutare il reale impatto di questa metodica profilattica in termini di riduzioni delle recidive e le eventuali differenze (di efficacia, compliance ed effetti col-

laterali) dei diversi farmaci utilizzati, recentemente sono stati pubblicati due lavori di meta-analisi dei RCT (*Random Controlled Trial*) apparsi in letteratura (Bonati *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993). I risultati indicano che la profilassi antibiotica è in grado di ridurre la ricorrenza di nuovi episodi di otite, con un profilo di beneficio/rischio della terapia che sembra essere favorevole, in quanto durante il periodo di osservazione non sono state riportate gravi reazioni collaterali dovute al trattamento, e la resa in termini di compliance è stata soddisfacente (ed essenziale) per tutti gli studi.

Rispetto al tipo di farmaco da utilizzare l'analisi non ha evidenziato elementi che facciano scegliere l'uno o l'altro in quanto risultano essere tutti parimenti efficaci. In base alla sicurezza del trattamento, l'amoxicillina (20 mg/kg/die in un'unica somministrazione giornaliera, preferibilmente alla sera) può rappresentare il farmaco di prima scelta, come confermato recentemente da due recenti RCT (Casselbrant *et al.*, 1992; Berman *et al.*, 1992). Nei casi di allergia nei

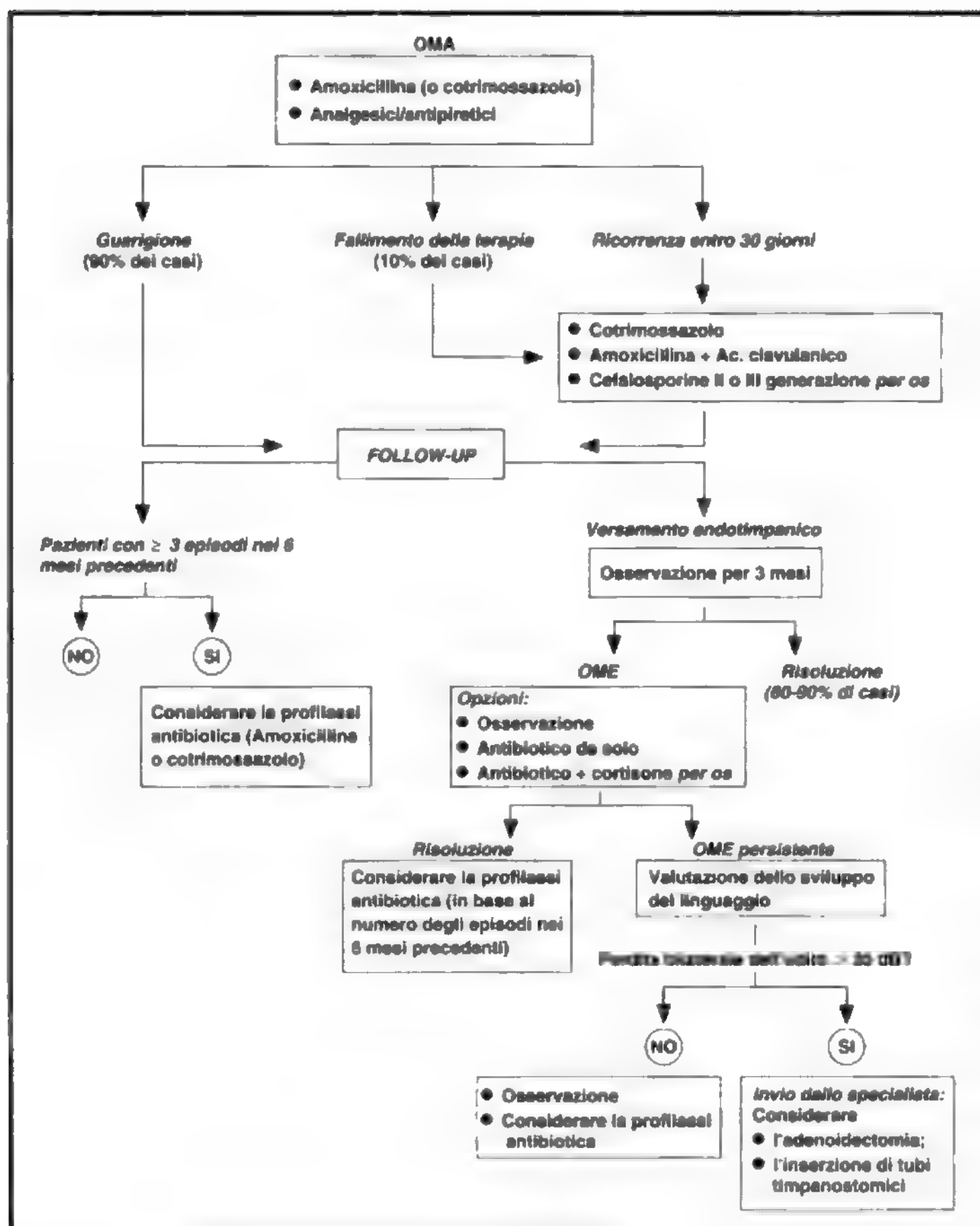


Fig. 1. Gestione ambulatoriale del bambino con otite media. Per le definizioni e lo schema terapeutico da seguire cfr. testo. I fattori di rischio per il fallimento della terapia sono:
1) l'età < 15 mesi;
2) storia personale o nei familiari per OMAR;
3) episodio di OMA nel mese precedente. Nel caso di OME occorre conferma della diagnosi con timpanogramma.

confronti delle penicilline, il *cotrimossazolo* (12 mg/kg/die) rappresenta una valida alternativa.

Relativamente a quando iniziare la profilassi ed alla sua durata, non c'è consenso unanime. Infatti, un numero di episodi di 3 in 6 mesi o 4 in un anno può essere ritenuto non così gravoso per la famiglia ed il bambino da giustificare la profilassi. La valutazione andrà fatta caso per caso e criteri di inclusione più rigidi (3 o più episodi in 2-3 mesi) possono essere ragionevoli. Anche la durata della profilassi va stabilita di volta in volta, tenendo conto del periodo dell'anno in cui questa viene iniziata (in estate l'incidenza delle infezioni delle vie aeree è bassa) e comunque non dovrebbe essere inferiore ai 3-4 mesi. Tuttavia, questi dubbi sull'inizio e sulla durata della profilassi, non potranno essere risolti fino a quando non si riuscirà a dimostrare con sicurezza che il trattamento è in grado di ridurre, sul lungo periodo, la persistenza del versamento nell'orecchio medio (Bonati *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993). Infatti l'OME, come già detto, nei rari casi che persistono e che non sembrano avere una risoluzione spontanea, può rappresentare, in un sottogruppo di bambini non facilmente identificabili, una patologia in grado di determinare sordità ed un ritardo nell'acquisizione del linguaggio.

Notevoli controversie esistono riguardo la strategia terapeutica da seguire nei casi persistenti (> 3 mesi) (Lancet, editorial 1992; Couriel, 1995) ed al momento sembra ragionevole proporre «l'attesa» per i pazienti in cui l'effusione determina un deficit uditivo di grado lieve (< 20 dB); nei casi con deficit uditivo clinicamente rilevante (> 20 dB e bilaterale) che tende a persistere nel tempo, prima dell'intervento chirurgico potrebbe essere proposto un trattamento medico che vede l'uso di un antibiotico a dosi piene (ad es. il *cotrimossazolo*) per 14-21 giorni, o in alternativa dell'associazione dell'antibiotico con il cortisone *per os*, per 7 giorni (ad es. il *prednisone*: 1 mg/kg/die) (Berman *et al.*, 1994; Berman, 1995). Tuttavia, tali schemi terapeutici sembrano avere un'efficacia limitata nel miglioramento dell'effusione (pari al 25% rispetto al placebo) e nei rari casi di persistenza dell'OME bilaterale a distanza di 12 mesi possono essere presi in considerazione l'inserzione di tubi di ventilazione e/o l'adenoidectomia (Maw e Bowden, 1993). Tali interventi migliorano la capacità uditiva, ma l'effetto sembra essere transitorio (con un benessere variabile dai 12 ai 24 mesi) ed inoltre al momento non è noto se gli interventi proposti siano in grado di ridurre la frequenza dei disturbi del linguaggio e di natura comportamentale la cui rilevanza epidemiologica è tuttora poco conosciuta (Couriel, 1995).

La revisione sistematica della letteratura sul problema ha inoltre contribuito a definire quello che «non andrebbe fatto» in caso di OMAR, cercando di dare delle risposte a comportamenti ancora molto diffusi nella pratica (Marchetti e Misticoni, 1994):

a) la profilassi «intermittente» (cioè in concomitanza delle infezioni delle prime vie aeree) non è efficace nel prevenire le ricorrenze (Berman *et al.*, 1994; Heikkinen *et al.*, 1995);

b) non è stato pubblicato nessun RCT che abbia valutato l'uso degli immunomodulanti, dei mucolitici e degli antistaminici.

Conclusioni

In presenza di un bambino con otite media, la condotta da seguire deve essere rivolta ad utilizzare presidi diagnostici e terapeutici, i cui presupposti essenziali e dimostratamente efficaci per la maggioranza dei pazienti sono riportati in fig. 1. In genere, sia l'OMA che l'OME presentano sintomi transitori che si risolvono spontaneamente, senza compli-

canze. La leggera diminuzione dell'udito di tipo conduttivo associata alla seconda condizione non comporta problemi sullo sviluppo del bambino, anche se sono necessari ulteriori studi a conferma di queste evidenze. Tuttavia, molti problemi rimangono ancora aperti, in particolare rispetto ad un sottogruppo di bambini con frequenti episodi di OMA e che va frequentemente incontro a mancata guarigione. In un prossimo futuro l'attenzione della ricerca clinica e sperimentale dovrà focalizzarsi su questi pazienti, con l'obiettivo di individuare quali possano essere le situazioni predittive di rischio ed il ruolo della terapia farmacologica nel miglioramento della storia naturale della patologia (Marchetti, 1994).

Bibliografia

- Adesman A. R., Altshuler L. A., Lipkin P. H. *et al.*, *Pediatrics*, 1990, **85**, 442.
 Alho O. P., Koivu M., Sorri M. *et al.*, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 1990, **19**, 151-156.
 Appleman C. L. M., Claessen J. O. P. J., Touw-Otton F. W. M. M. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1991, **303**, 1450-1452.
 Appleman C. L. M., Claessen J. O. P. J., Touw-Otton F. W. M. M. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1993, **306**, 895.
 Arola M., Ruuskanen A., Ziegler T. *et al.*, *Pediatrics*, 1990, **86**, 848-855.
 Arola M., Ziegler T., Ruuskanen O., *J. Pediatr.*, 1990, **116**, 697-701.
 Bain J., Murphy E., Ross F., *Br. Med. J.*, 1985, **291**, 1243.
 Barenkamp S. J., Shurin P. A., Marchant C. D. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1984, **105**, 533-537.
 Barr G. S., Coatesworth A. P., *Br. Med. J.*, 1991, **303**, 1023-1024.
 Berman S., Nuss R., Roark R. *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1992, **11**, 63-67.
 Berman S., Roark R., Luckey D., *Pediatrics*, 1994, **93**, 353-363.
 Berman S., *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 1560-1565.
 Bollag U., Bollag-Aalbrecht E., *Lancet*, 1991, **338**, 96-99.
 Bonati M., Marchetti F., Pistotti V. *et al.*, *Clinical Trials and Meta-Analysis*, 1992, **28**, 39-50.
 Burke P., Bain J., Robinson D., Dunleavy J., *Br. Med. J.*, 1991, **303**, 558-562.
 Carlin S. A., Marchant C. D., Shurin P. A. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1987, **110**, 20-25.
 Carlin S. A., Marchant C. D., Shurin P. A. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1991, **118**, 178-183.
 Casselbrant M. L., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1989, **8**, 10.
 Casselbrant M. L., Kaleida P. H., Rockette H. E. *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1992, **11**, 278-286.
 Chaput De Saintonge D. M., Levine D. F., Temple Savage I. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1982, **284**, 1078-1081.
 Couriel J. M., *Lancet*, 1995, **345**, 3-4.
 De Melker R. A., *Br. Med. J.*, 1993, **306**, 5-6.
 Editorial, *Lancet*, 1992, **340**, 1324-1325.
 Engelhard D., Strauss N., Jorczak-Srani L. *et al.*, *Lancet*, 1989, **ii**, 141-143.
 Etzel R. A., Pattishall E. N., Haley N. J. *et al.*, *Pediatrics*, 1992, **90**, 228-232.
 Ey J. L., Holberg C. J., Aldous M. B. *et al.*, *Pediatrics*, 1995, **95**, 670-677.
 From J., Culpepper L., Grob P. *et al.*, *Br. Med. J.*, 1990, **300**, 582-586.
 Giebink G. S., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1989, **8**, 189.
 Green S. M., Rothrock S. G., *Pediatrics*, 1993, **91**, 23-30.
 Hardy A. M., Fowler M. G., *Am. J. Public Health*, 1993, **83**, 1321-1325.
 Harrison C. J., Marks M. I., Welch D. F., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1985, **4**, 641-646.
 Hathaway T. J., Katz H. P., Dersherwitz R. A., Marx T. J., *Pediatrics*, 1994, **94**, 143-147.
 Heikkinen T., Ruuskanen O., Ziegler T. *et al.*, *J. Pediatr.*, 1995, **126**, 313-316.
 Hendrickse W. A., Kusmiesz H., Shelton S., Nelson J. D., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1988, **7**, 14-23.
 Kaleida P. H., Casselbrant M. L., Rockette H. E. *et al.*, *Pediatrics*, 1991, **87**, 466-474.
 Klein J. O., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1989, **8**, 95.
 Marchetti F., *The Kangaroo*, 1994, **3**, 29-33.
 Marchetti F., Misticoni G. (per il Gruppo dei pediatri di base delle regioni Abruzzo, Basilicata e Puglia), *Farmaci*, 1994, **18**, 45-55.
 Maw R., Bawden R., *Br. Med. J.*, 1993, **306**, 756-760.
 Rivard C. L., Fernandez A., *Epidemiologic Reviews*, 1993, **15** (2), 444-465.
 Roberts J. E., Burchinal M. R., Collier A. M. *et al.*, *Pediatrics*, 1989, **83**, 477.

- Rosenfeld R. M., Vertrees J. E., Carr J. et al., *J. Pediatr.*, 1994, **124**, 355-367.
 Sacher B., Cichetti B., Francano N. et al., *Medico e Bambino*, 1990, **7**, 20-22.
 Sagraves R., Marsh W., *Pharmacoeconomics*, 1994, **6**, 202-214.
 Scott-Gibbink G., Canafax D. M., Kempthorne J., *J. Pediatr.*, 1991, **119**, 495-500.
 Senturia B. H., Bluestone C. D., Klein J. O. et al., *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1980, **89** (suppl. 68), 5.
 Shackelford P. G., Polmar S. H., Mayus J. L. et al., *J. Pediatr.*, 1986, **108**, 647-653.
 Stool S. E., Field M. J., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1989, **8**, S11-S14.
 Teele D. W., Klein J. O., Rosner B. A. et al., *Pediatrics*, 1984, **74**, 282.
 Teele D. W., Klein J. O., Rosner B., the Greater Boston Otitis Media Study Group, *J. Infect. Dis.*, 1989, **160**, 83-94.
 Uhari M., Niemelä J., *Acta Paediatr.*, 1995, **84**, 90-92.
 Van Buchem F. L., Peeters M. F., Van't Hof M. A., *Br. Med. J.*, 1985, **290**, 1033-1037.
 Wald E. R., *Pediatrics*, 1991, **87**, 129-133.
 Williams R. L., Chalmers T. C., Stange K. C. et al., *JAMA*, 1993, **270**, 1344-1351.
 Zielhuis G. A., Rach G. H., Van Den Broek P., *Lancet*, 1989, **i**, 311.

FEDERICO MARCHETTI

OVAIO [v. vol. XI, coll. 439-559]

TUMORI OVARICI: CARCINOMA OVARICO (XI, coll. 546-556)

SOMMARIO

Epidemiologia ed etiopatogenesi (col. 4287): *Epidemiologia*. - *Etiopatogenesi*. - *Genetica*. - **Diagnosi** (col. 4289). - **Fattori di prognosi** (col. 4291). - **Istologia e stadiazione** (col. 4292): *Istotipo*. - *Stadio*. - *Grading*. - *Stato linfonodale*. - **Terapia** (col. 4294): *Terapia chirurgica*. - *Chemioterapia*.

Epidemiologia ed etiopatogenesi

Epidemiologia

Il carcinoma dell'ovaio [o.] è la neoplasia ginecologica con prognosi peggiore. Negli Stati Uniti, nel 1994, vi sono stati 24.000 nuovi casi e circa 14.000 donne sono morte a causa di questo tumore che risultava al quinto posto per frequenza tra le neoplasie che hanno colpito la popolazione femminile.

In Italia presenta un'incidenza di circa 4000 nuovi casi/anno, il 4% dei tumori femminili, con una mortalità di 2.700 decessi/anno, il 4,3% delle morti per tumore nelle donne (Vercelli et al., 1997).

Vi è un rischio stimato dell'1,4% che una donna ammalata, durante la vita, di questa neoplasia e l'incidenza varia dal 15,7% per 100.000 donne, d'età compresa tra i 40 ed i 44 anni, a 54 per 100.000 donne, d'età compresa tra i 75 ed i 79 anni. È rara prima dei 40 anni (Boente et al., 1994).

Le forme *borderline* colpiscono soprattutto il terzo e quarto decennio di vita, le forme invasive sono più frequenti nel quinto e sesto decennio. La sopravvivenza a 5 anni oscilla tra il 5 ed il 15% negli stadi III e IV ma oltre il 75% delle pazienti con malattia localizzata (I-II stadio) potrebbe essere trattata con successo.

Etiopatogenesi

L'etiologia di questa neoplasia è multifattoriale. Diverse ipotesi sono state avanzate, ma nessuna di queste è risultata essere soddisfacente. Sono stati chiamati in causa di volta in volta agenti ambientali, diete ricche di grassi, abuso di caffè, uso di talco ed esposizione all'asbesto. In molti casi i dati riportati dalla letteratura si sono dimostrati contrastanti (Hilab et al., 1986; Wehner, 1994; Whittemore, 1994).

L'incidenza del carcinoma ovarico risulta più elevata nei paesi temperati, a quella con latitudini più temperate. Per questo viene ipotizzato che la vitamina D prodotta nella pelle in risposta all'esposizione al sole possa svolgere

un'azione protettiva (Lefkowitz e Garland, 1994). Il consumo di grassi saturi è stato messo in relazione all'aumento del rischio, nessuna attinenza è stata osservata con l'assunzione di grassi insaturi, mentre un ruolo protettivo viene svolto dall'assunzione di fibre vegetali. Tuttavia il ruolo svolto dalla dieta nello sviluppo dei tumori ovarici non è stato ancora chiarito.

I più importanti fattori di rischio endogeno sono la parità, l'infertilità e la familiarità neoplastica. La multiparità è collegata ad una diminuzione del rischio di carcinoma ovarico rispetto alle pazienti nullipare ed anche l'allattamento sembra svolgere funzione protettiva. Il rischio diminuisce con l'aumento del numero delle gravidanze. L'isterectomia e la legatura delle tube si accompagnano ad una minore incidenza, probabilmente perché impediscono l'ascesa di carcinogeni ambientali che però non sono stati ancora bene identificati (Green et al., 1997).

Il rapporto tra la terapia dell'infertilità ed il rischio di carcinoma ovarico sono controversi. È stato ipotizzato che l'uso di gonadotropine per stimolare l'ovulazione in donne infertili possa essere messo in rapporto ad un aumento della incidenza di neoplasie ovariche (Westhoff, 1996).

È stata rilevata una diminuzione della mortalità per tumore ovarico tra le giovani donne e questo è stato associato all'assunzione dei contraccettivi orali. L'assunzione di estrogeni per via orale riduce il rischio di carcinoma ovarico del 30-60% (Whittemore et al., 1992). La diminuzione dell'incidenza è in rapporto alla durata dell'assunzione, mentre non è stata rilevata nessuna relazione con i diversi dosaggi. Da quanto finora rilevato sembrerebbe quindi che più elevato è il numero di cicli ovulatori durante la vita di una donna maggiore è la possibilità che questa ammalata di carcinoma ovarico. È stato pertanto ipotizzato che il trauma ripetuto dell'ovulazione, determinando un'aumentata produzione di fattori di crescita per l'epitelio ovarico, possa rappresentare il *primum movens* dello sviluppo della neoplasia.

Per quanto riguarda la familiarità neoplastica, donne con congiunti affetti da questa neoplasia o da altri adenocarcinomi hanno un rischio relativo per il carcinoma dell'o. rispettivamente del 3 e dell'1,5% rispettivamente (Whittemore, 1994; Mosgaard e Lidegaard, 1996). In particolare in donne con madre o sorella affette dalla neoplasia il rischio in questi soggetti di essere affette da tumore ovarico è di circa il 9%. In alcune famiglie vi sono molteplici casi di neoplasia ovarica (Whittemore, 1994; Foulkes e Narod, 1995).

Genetica

Circa il 5% delle neoplasie ovariche riconosce quale principale fattore di rischio la familiarità. Tre distinte sindromi ereditarie sono state identificate:

- sindrome del cancro della mammella e dell'o. (*Breast-Ovarian Cancer Syndrome*);
- cancro ereditario non polipoide del colon (*Lynch-2 syndrome*) (V. INTESTINO TENUE E CRASSO**, col. **2833);
- cancro ovarico sito-specifico (*site specific ovarian cancer syndrome*).

Il tipo di ereditarietà in queste famiglie è autosomico dominante e la trasmissione può avvenire sia attraverso il padre sia attraverso la madre. Numerosi sono stati fino ad oggi gli studi di citogenetica condotti sui tumori ovarici. Sono state evidenziate anomalie strutturali, anche se nessuna caratteristica, a carico dei cromosomi 1-3-6-11-17-19 delle pazienti affette da carcinoma ovarico (Perez et al., 1991).

Più recentemente il cancro della mammella e dell'o. e quello ovarico sito-specifico sono stati collegati ad un an-

tioncogene allocato sul cromosoma 17q12-21 (Friedman *et al.*, 1994; Albertsen *et al.*, 1994) chiamato *BRCA1*, precedentemente identificato da Hall *et al.* (1990) e da Miki *et al.* (1994). Le donne che presentano la mutazione *BRCA1* hanno (secondo Simard *et al.*, 1994) un rischio dell'85% di avere un cancro alla mammella e un rischio del 60% di avere un cancro dell'ovaio. Solamente una consulenza genetica, l'informazione ed un'accurata anamnesi familiare può attualmente evidenziare questi soggetti ad alto rischio. In alcuni di questi casi potrebbe essere opportuno eseguire un'ovariectomia profilattica che, tuttavia non sembra ridurre il rischio di sviluppare una carcinosi peritoneale (Gallion e Smith, 1994).

Per più ampi particolari, v. ANTIONCOGENI**, col. **470, e soprattutto v. MAMMELLA**, col. **3534, tab. I.

Diagnosi

Negli Stati Uniti, il 5-10% delle donne viene sottoposto durante la vita ad intervento chirurgico per un sospetto carcinoma ovarico che sarà confermato nel 13-21% dei casi. La diagnosi di neoplasia ovarica è, nella maggior parte dei casi, tardiva ossia quando la malattia è in fase avanzata (70% dei casi al III-IV stadio FIGO; v. sotto, tab. II). La sopravvivenza a 5 anni per il primo stadio è dell'85-90%, mentre negli stadi avanzati continua ad essere bassa (Young *et al.*, 1990).

Solo in alcuni casi è possibile effettuare una diagnosi occasionale ai primi stadi di malattia durante interventi sulla pelvi per patologia benigna. Poiché la maggior parte delle masse annessiali è benigna, è importante tentare di diagnosticare preoperatoriamente le pazienti ad alto rischio di neoplasia ovarica per assicurare loro un'opportuna condotta terapeutica.

Al momento della diagnosi di tumescenza annessiale è necessario valutare alcuni fattori che possono indirizzare verso la malignità:

- età;
- stato menopausale;
- caratteristiche cliniche;
- caratteristiche ecografiche;
- presenza o assenza di sintomi;
- livelli sierici del CA 125;
- eventuale bilateralità della lesione.

Il carcinoma ovarico è più frequente nelle donne anziane. Secondo Barber, l'ovaio palpabile in postmenopausa è sempre considerato possibile espressione di un tumore ovarico ed è necessario sottoporre la paziente ad un accertamento diagnostico laparoscopico (v. LAPAROSCOPIA) e/o laparotomico (Barber, 1983). Nelle pazienti asintomatiche, in età fertile, se il diametro della tumescenza pelvica non supera i 6 cm e le caratteristiche ecografiche non sollevano dubbi, è legittimo sottoporre la paziente ad un periodo di osservazione e ad un'eventuale terapia medica: fino al 70% di queste formazioni potrebbe infatti regredire. Non è dimostrata la reale efficacia di una terapia soppressiva con contraccettivi orali. La valutazione di queste donne deve basarsi, oltre che sul controllo clinico, sull'esecuzione di ecografie transvaginali (v. ECOGRAFIA**, coll. **1742). La persistenza dei reperti e/o l'aumento della massa deve indirizzare ad un approfondimento chirurgico. La presenza invece di caratteristiche cliniche quali la fissità della tumescenza pelvica, l'irregolarità della superficie, la bilateralità e la consistenza solida oltre che la presenza di liquido nella cavità peritoneale devono fare sospettare l'origine maligna. La distensione addominale, spesso in relazione alla presenza di ascite ed il dolore addominale cronico sono i sintomi più frequenti (Portenoy *et al.*, 1994).

La possibilità di effettuare una diagnosi precoce è attual-

mente affidata all'esame clinico della pelvi, all'ecografia addominale e transvaginale, al color-Doppler e al dosaggio del livello sierico del CA 125 (v. ONCOFETALI ANTIGENI*).

Le campagne di *screening* basate essenzialmente sull'indagine ecografica si sono rivelate di scarso significato e di costo elevato. Nelle donne di età superiore ai 30 anni, con familiarità per il carcinoma ovarico vi è un rischio molto elevato (390 casi per 100.000 donne) di sviluppare la malattia (Bourne *et al.*, 1991). Queste donne dovrebbero sottoporsi annualmente a visita ginecologica, ecografia transvaginale e dosaggio del CA 125 ed essere inserite in programmi di studio che includono anche la caratterizzazione genetica. Tuttavia non è stata osservata una riduzione della mortalità in queste pazienti (Pearson, 1994; Hartenbach e Schink, 1996).

Lo *screening* del carcinoma ovarico basato sull'indagine ecografica, il color-Doppler ed i marcatori tumorali sembra possedere allo stato attuale un potere diagnostico limitato e non sembra evidenziare nessuna efficacia nella riduzione della mortalità.

Il CA 125, antigene carcinoembrionario (v. ONCOFETALI ANTIGENI*) presente sulla superficie delle cellule dell'adenocarcinoma, viene identificato mediante l'uso di un anticorpo monoclonale. Il dosaggio di questo *marker* è il più frequentemente utilizzato nella diagnostica di questa neoplasia, ma la sua specificità non è sufficientemente elevata da consentirne un uso come marcatore specifico. Pur essendo aumentato in circa l'80% delle neoplasie ovariche (circa 50% delle pazienti al I stadio), lo è anche in diverse patologie quali le infezioni pelviche, l'endometriosi ed i tumori ovarici benigni e nell'1% dei controlli normali e questo riduce la sua validità nella diagnostica precoce. Inoltre livelli elevati sono stati osservati anche in pazienti affetti da tumori del polmone, della mammella, della cervice, del corpo dell'utero e bilio-pancreatici (Herbst, 1994).

Il CA 125, se utilizzato da solo, non può essere considerato un valido test di *screening* per il carcinoma ovarico (Hakama *et al.*, 1996). Alcuni ricercatori hanno osservato come aumenti la specificità se il dosaggio del CA 125 viene associato a quelli di altri *markers* quali il CA 15-3 e il TAG 72 (Bast *et al.*, 1991).

Diversi altri marcatori tumorali sono stati valutati per lo *screening* del carcinoma ovarico: M-CSF (*Macrophage-Colony-Stimulating Factor*) e OVX1. Questi marcatori, se utilizzati contemporaneamente, potrebbero identificare i carcinomi ovarici non identificati dal CA 125 (Woolas *et al.*, 1993).

I valori sierici del CA 125 hanno comunque un grande valore nel monitorare la risposta alla chemioterapia. La diminuzione del 50-75% dei livelli del CA 125 è significativa di una risposta alla chemioterapia di prima linea (Rustir *et al.*, 1996). Inoltre l'aumento del CA 125 è un indice accurato di recidiva del tumore prima che vengano identificati altri segni di progressione (Rustin *et al.*, 1996).

L'ecografia transaddominale quale metodica diagnostica del carcinoma ovarico fu suggerita sin dal 1989 (Campbell *et al.*, 1989). La specificità di questa indagine non si è dimostrata molto elevata.

L'esame ecografico transvaginale (v. ECOGRAFIA**) si è rivelato più accurato e consente di studiare la struttura ovarica anche in condizioni sfavorevoli, quali l'obesità e la presenza di gas nelle anse intestinali. Il criterio ecografico più significativo per distinguere la patologia benigna da quella maligna è la valutazione della percentuale di strutture ecogeniche presenti nella tumescenza. Solo il 5% delle formazioni totalmente anecoiche sono maligne, mentre la possibilità di carcinoma è direttamente proporzionale alla presenza di aree ecogeniche. La presenza di setti maggiori di 3

mm e vegetazioni all'interno della cisti diagnosticati ecograficamente sono correlati alla malignità (Pepe *et al.*, 1996; De Rosa *et al.*, 1997). È stato rilevato come un generico esame di *screening* per il tumore dell'ovaio, con sensibilità e specificità vicina al 100%, raggiunge un valore predittivo positivo del 10%. L'ecografia transvaginale nella diagnosi del carcinoma ovarico (sensibilità 100%, specificità 98,7%) presenta un valore predittivo positivo del 6,890 (Boente *et al.*, 1994).

La misurazione delle resistenze vascolari con l'ecotomografia morfologica in *color-Doppler* può essere un importante complemento dell'ecografia transvaginale. La metodica consente di rilevare il flusso sanguigno a bassa resistenza nei vasi neoformati nel tessuto neoplastico e consente di studiare l'eco-struttura e l'eco-vascolarizzazione di un organo. L'obiettivo è di segnalare aree con anomala vascolarizzazione. L'assenza di neo-vascolarizzazione intratumorale ed un normale/alto indice di pulsatilità dovrebbero consentire di escludere la degenerazione maligna. La vascolarizzazione tumorale infatti è caratterizzata da un alto flusso diastolico per la bassa resistenza offerta dai vasi tumorali e quindi un basso indice di pulsatilità ($PI < 1$).

L'esecuzione del *color-Doppler* aumenta l'accuratezza dell'ecografia transvaginale. Secondo uno studio condotto negli Stati Uniti l'esecuzione di questo *screening* su donne a rischio dell'1% per cancro ovarico potrebbe salvare cinque vite ogni 2000 pazienti indagate (Cohen e Jennings, 1994).

Sebbene possa sembrare logico sottoporre la popolazione femminile a questi accertamenti non vi sono dati di certezza che supportino questa teoria. Anzi l'uso indiscriminato di queste metodiche potrebbe essere responsabile di un numero considerevole d'inutili procedure chirurgiche. Pertanto al momento attuale l'esecuzione di *screening* per il tumore ovarico non viene raccomandato in nessuna fascia di età (CNR, 1996).

Fattori di prognosi

I fattori di prognosi sono quelle caratteristiche legate alla neoplasia in grado di influenzare la sopravvivenza delle pazienti.

Lo stadio FIGO, l'istotipo, il grado di differenziazione istologico, lo stato linfonodale, la presenza di ascite e l'età sono tutti fattori prognostici significativi. L'integrazione dei diversi fattori consente una prognosi più esatta (Kosary, 1994). Le condizioni delle pazienti — funzionalità renale e *performance status* — possono condizionare l'esecuzione della chemioterapia e influenzare la sopravvivenza e quindi vanno inclusi fra i fattori di prognosi.

Tuttavia la valutazione prognostica legata solo a questi parametri clinico-patologici si è dimostrata insoddisfacente. Attualmente vengono indagati nuovi parametri legati alla biologia della neoplasia. Tra questi, lo studio del contenuto in DNA delle cellule tumorali sembra essere un fattore significativo. In particolare, è stato osservato che se una neoplasia ha un contenuto diploide del DNA questa ha una prognosi migliore rispetto a tumori aneuploidi.

L'*Epidermal Growth Factor* ha una potente azione di stimolazione della proliferazione cellulare. Gli studi condotti sul recettore di questo fattore di crescita hanno indicato che la sua espressione ha un significato sfavorevole nel carcinoma ovarico anche se i risultati ottenuti non sono sempre di univoca interpretazione. Risultati contrastanti sono anche stati ottenuti negli studi che hanno indagato il significato clinico dell'oncogene *HER-Nu* appartenente alla stessa famiglia del recettore dell'*Epidermal Growth Factor* (Scanlon *et al.*, 1995). Ad oggi, comunque, il residuo tumorale, lo stadio FIGO ed il *performance status* sono i fattori predittivi di sopravvivenza più significativi.

Istologia e stadiazione

Istotipo

L'80% dei tumori ovarici è di tipo epiteliale, deriva cioè dall'epitelio celomatico; la parte restante è rappresentata dai tumori germinali e dai tumori di derivazione stromale.

La classificazione istologica tuttora adottata è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (1973) (Serov *et al.*, 1973) (v. ovaio, vol. XI, coll. 549-550, tab. XIII).

In base al comportamento cellulare si distinguono tumori epiteliali benigni, a basso potenziale di malignità e maligni (tab. I).

I tumori a basso grado di malignità (*borderline*) rappresentano il 7,5-15% delle neoplasie dell'ovaio con una incidenza pari a 2-4 casi ogni 100.000 donne per anno.

I tumori con istotipo sieroso sono il 40% del totale e nella metà dei casi sono bilaterali. Hanno particolare capacità ad invadere la capsula e spiccato linfotropismo. Pur essendo di un istotipo sia radio- che chemiosensibile hanno una prognosi particolarmente severa.

L'adenocarcinoma mucinoso non supera, nelle diverse casistiche, il 10% di tutti i tumori ovarici maligni. Raramente bilaterale, solitamente ben differenziato diffonde per contiguità e l'interessamento linfonodale si riscontra solo negli stadi più avanzati. Ha una prognosi più favorevole rispetto ai carcinomi sierosi.

L'adenocarcinoma endometrioidale, spesso associato ad aree di endometriosi ovarica, rappresenta il 20% dei tumori epiteliali maligni ed è bilaterale nel 30-40% dei casi (Sainz-de-la-Cuesta *et al.*, 1996).

L'adenocarcinoma indifferenziato ha un elevato grado di anaplasia e di aggressività ed una incidenza di circa il 17%. Il tumore a cellule chiare o mesonefroide, origina dai dotti mülleriani e rappresenta il 3% degli adenocarcinomi maligni, mentre il tumore di Brenner (3%) si sviluppa dalle cellule di transizione.

Il tipo istologico, indipendentemente dallo stadio, è un importante fattore predittivo prognostico (Randrianjafisa-mindrakotraka *et al.*, 1995).

Una più lunga sopravvivenza viene osservata nelle pazienti con istotipo mucinoso ed endometrioidale. La sopravvivenza peggiore è quella che si riscontra nei carcinomi indifferenziati. Intermedia tra questi due gruppi è quella che si rileva nell'istotipo sieroso e in quello a cellule chiare.

Stadio

Il carcinoma dell'o. diffonde principalmente per continuità nella cavità addominale. È frequente la diffusione al peritoneo, al diaframma, all'omento, alla sierosa del fegato, all'intestino.

Diversi studi hanno rilevato la necessità di un'accurata stadiazione chirurgica nelle pazienti affette da carcinoma

TAB. I. CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA DEI TUMORI EPITELIALI DELL'OVAIO

Tumori sierosi
Tumori mucinosi
Tumori endometrioidi
Tumori a cellule chiare
Tumori di Brenner
Tumori misti epiteliali
Carcinoma indifferenziato
Tumori epiteliali non classificati

TAB. II. STADIO FIGO (1986)

I	Tumore limitato alle ovaie
IA	Tumore limitato ad un ovaio; assenza di ascite, non vegetazioni sulla superficie esterna, capsula integra
IB	Il tumore è limitato ad entrambe le ovaie; assenza di ascite, non vegetazioni sulla superficie esterna, capsula integra
IC	Tumore dello stadio IA o IB con vegetazioni sulla superficie esterna di una o entrambe le ovaie o con capsula rotta o con ascite positiva per cellule neoplastiche o con lavaggio peritoneale positivo
II	Il tumore interessa una o entrambe le ovaie e si estende alla pelvi
IIA	Estensione o metastasi all'utero e/o alle tube
IIB	Estensione ad altri tessuti pelvici
IIC	Tumore dello stadio IIA o IIB con vegetazioni sulla superficie esterna di una o entrambe le ovaie o con capsula rotta o con ascite positiva per cellule neoplastiche o con lavaggio peritoneale positivo
III	Il tumore interessa una o entrambe le ovaie con diffusione peritoneale fuori della pelvi e/o linfonodi retroperitoneali o inguinali positivi; presenza di metastasi sulla superficie epatica; il tumore è limitato alla pelvi ma con diffusione neoplastica istologicamente documentata al piccolo intestino o all'omento
IIIA	Il tumore è limitato alla pelvi con linfonodi negativi ma positività istologica di lesioni microscopiche sulla superficie peritoneale addominale
IIIB	Tumore localizzato ad uno o entrambe le ovaie, con linfonodi negativi ma positività istologica di lesioni macroscopiche sulla superficie peritoneo-addominale con diametro < 2 cm
IIIC	Localizzazioni addominali > 2 cm e/o positività dei linfonodi retroperitoneali o inguinali
IV	Il tumore interessa una o entrambe le ovaie con metastasi a distanza; se presente versamento pleurico la citologia deve essere positiva; metastasi parenchimali epatiche. La stadiazione non chirurgica non è completa se non vengono registrate le dimensioni e le localizzazioni del residuo tumore

ovarico nel I e II stadio eseguita da ginecologi oncologi che conoscano i siti delle possibili localizzazioni metastatiche. La corretta stadiazione consente di esprimere un giudizio prognostico più esatto ed un migliore approccio terapeutico. La classificazione più usata per la stadiazione dei tumori ovarici è quella della FIGO (tab. II).

Solo il 25% delle pazienti a cui viene diagnosticato un tumore maligno epiteliale dell'o. è al I stadio di malattia.

La sopravvivenza a 5 anni delle pazienti al primo stadio è dell'85-90% (Young *et al.*, 1990), in stadio avanzato oscilla tra il 10 ed il 25%, mentre la sopravvivenza globale per tutti gli stadi è del 37%.

Grading

Il valore prognostico del *grading*, ossia la valutazione della percentuale di cellule indifferenziate, è molto significativo. Maggiore è il grado di indifferenziazione minore la sopravvivenza, indipendentemente dall'istotipo, dallo stadio, dall'età della paziente e dallo stadio di malattia.

Stato linfonodale

La diffusione della malattia ai linfonodi retroperitoneali è in rapporto allo stadio di malattia: passa dal 10-20% dei

casi nelle pazienti con malattia localizzata solo alle ovaie al 50-70% dei casi negli stadi avanzati.

Recenti osservazioni hanno evidenziato che nelle pazienti con stadio iniziale di malattia è normalmente interessata una sola stazione linfonodale pelvica o lomboaortica e che i linfonodi metastatici sono omolaterali all'ovaio neoplastico. Negli stadi avanzati le stazioni linfonodali normalmente coinvolte sono più di una. In base a queste rilevazioni si potrebbe ritenere che nelle pazienti con tumore limitato all'o. sia adeguata una linfadenectomia pelvica e lomboaortica omolaterale.

In presenza di malattia avanzata, con un residuo tumore < 1 cm, considerato il numero di linfonodi coinvolti e l'interessamento di più stazioni linfonodali, è consigliabile eseguire una linfadenectomia sistematica pelvica e lomboaortica (Benedetti-Panici *et al.*, 1996).

Terapia

Nel trattamento dei tumori epiteliali dell'o. svolgono un ruolo determinante sia la chirurgia che la chemioterapia. Altri trattamenti quali la radioterapia pelvica/addominale e la somministrazione intraperitoneale di colloidi radioattivi sembrano a tutt'oggi avere un ruolo marginale.

Le nuove strategie di consolidamento nel carcinoma ovarico sono attuate solo in pochi centri ed in forma sperimentale:

- terapie intraperitoneali con radioimmunoconiugati;
- utilizzo di interferoni gamma o alfa quali modificatori della risposta biologica;
- terapie ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali midollari o periferiche.

Terapia chirurgica

La chirurgia è la terapia primaria per il carcinoma ovarico: consente una stadiazione completa, una diagnosi corretta ed una citoriduzione ottimale.

La procedura chirurgica di stadiazione dei tumori ovarici richiede:

- un'ampia incisione longitudinale che permetta un accurato esame della cavità addominale;
- la valutazione del volume del liquido peritoneale, se presente, ed il suo prelievo per la citologia;
- in assenza di liquido libero, esecuzione del lavaggio peritoneale;
- l'esplorazione e palpazione dei visceri addominali;
- nei casi di un tumore al primo stadio, esecuzione di biopsie *random* sul peritoneo pelvico, sul Douglas e sulle docce paracoliche;
- valutazione della superficie diaframmatica citologicamente o istologicamente;
- valutazione della sierosa intestinale e dei mesenterici;
- l'esecuzione di una omentectomia infracolica;
- l'esecuzione dell'isterectomia totale extrafasciale e dell'annessectomia bilaterale;
- l'esecuzione di una linfadenectomia selettiva o sistematica dei linfonodi pelvici e/o paraortici.

Quanto descritto rappresenta la terapia chirurgica ottimale nelle pazienti con malattia agli stadi iniziali. Negli stadi avanzati, situazione in cui si presenta il 70% delle pazienti, lo scopo della chirurgia è quello di ottenere la maggiore citoriduzione possibile. Il minimo residuo tumore è associato ad un aumento della sopravvivenza. La possibilità di eseguire una chirurgia citoriduttrice ottimale varia dal 35% al 92% dei casi. A seconda delle casistiche considerate non è ancora stato chiarito il ruolo della linfadenectomia nei casi in cui si è ottenuta una citoriduzione ottimale.

La *citoriduzione chirurgica* (*debulking surgery*; van der Burg *et al.*, 1995) primaria è di fondamentale importanza

per il successo della chemioterapia nelle pazienti con malattia avanzata e questo perché la rimozione delle masse tumorali scarsamente vascolarizzate consente di eliminare i cosiddetti «santuari farmacologici». Inoltre minore è il tumore residuo maggiore è la possibilità che non si instauri una farmaco resistenza.

Il *restaging* chirurgico consente una stadiazione chirurgica intensiva in pazienti in cui questa non è stata eseguita correttamente e va realizzata entro 30-60 giorni dal primo intervento. Anche se si ottengono importanti informazioni con una minima morbidità, non è di alcun beneficio in quelle pazienti che già richiedono una chemioterapia sulla base del primo intervento (Stier *et al.*, 1996).

Non sempre è possibile attuare una citoriduzione ottimale al primo intervento. In questi casi è possibile prendere in considerazione una citoriduzione chirurgica di intervallo a metà di una serie di cicli di chemioterapia, in caso di risposta alla terapia. Nei casi in cui si osservi una recidiva dopo uno o più cicli chemioterapici, quando è possibile, si può tentare una chirurgia di salvataggio. L'efficacia di questa citoriduzione in seconda istanza è comunque discutibile.

Il *second-look* laparoscopico o laparotomico va eseguito in pazienti in risposta clinica completa dopo chirurgia primaria e chemioterapia di prima linea. Lo scopo di questa procedura chirurgica comunque, non è terapeutico e pertanto tale procedura va eseguita solo come parte integrante di studi clinici controllati. Questi studi hanno consentito di accertare come solamente il 50% delle risposte cliniche complete sia in realtà patologica.

Il *second-look* dovrebbe consentire di identificare pazienti in risposta patologica completa, ma con fattori prognostici negativi quali il *grading* elevato o il residuo tumore > 2 cm al momento del primo intervento, che necessitano di terapie di consolidamento. In questo gruppo dovrebbero rientrare anche le pazienti con persistenza microscopica di malattia.

Chemioterapia

La neoplasia epiteliale dell'o. è considerata a medio-alta chemiosensibilità. I primi farmaci antitumorali impiegati sono stati gli antimetaboliti, gli alchilanti e le antracicline. I risultati terapeutici sono sensibilmente migliorati con l'introduzione, alla fine degli anni '70, del cisplatino (v.*; v.***) e dei taxani (v.***) negli anni '90.

Gli agenti alchilanti, in particolare la *ciclofosfamide*, vengono utilizzati nella chemioterapia di I linea, generalmente in combinazione con altri farmaci. La somministrazione può avvenire *per os* (100 mg/m²/die per 14 giorni) o più frequentemente *e.v.* ogni 21 giorni (750 mg/m²). La mielosoppressione di questo farmaco può rendere necessario ridurre la posologia.

Per quanto riguarda il *cisplatino* il dosaggio normalmente utilizzato oscilla tra i 50 e 100 mg/m² *e.v.* È necessario sottoporre la paziente ad una scrupolosa pre- e post-idratazione. I principali effetti collaterali di questo farmaco sono la nefrotossicità, l'ototossicità, la neurotossicità, la nausea, il vomito e una modesta mielosoppressione.

Il *carboplatino*, analogo del cisplatino, ha la stessa efficacia, ridotta nefrotossicità, ma notevole mielosoppressione soprattutto di tipo trombocitopenico.

I taxani sono farmaci entrati recentemente nella pratica clinica. Il paclitaxel è un estratto della corteccia del *Taxus brevifolia*. Gli effetti limitanti il suo impiego sono neutropenia, mucositi, vomito, neuropatia periferica, alopecia. È stata riscontrata una percentuale di risposta pari al 22% in uno studio condotto su 1000 pazienti a cui è stato amministrato questo preparato come terapia di seconda linea (Trimble *et al.*, 1992). V. TAXANI*

Il docetaxel è ottenuto dagli aghi del *Taxus baccata*. Ha un'elevata tossicità cutanea. Causa alopecia e marcata neutropenia. Impiegando questo farmaco, come terapia di II linea, si sono ottenute risposte che oscillano dal 17 al 37% (Piccart *et al.*, 1995).

In alcuni casi di carcinoma dell'o. platino-resistenti ha dimostrato efficacia (risposta 21%) l'etoposide agente fase specifico del ciclo cellulare (Hoskins e Swenerton, 1994).

Tra le nuove possibilità terapeutiche vi sono gli inibitori delle topoisomerasi-I, enzimi nucleari, che svolgono un ruolo importante nella replicazione cellulare. A questa classe appartiene, il Topotecan, farmaco con una discreta attività mielotossica che si è rivelato comunque attivo (percentuali di risposta di circa il 13%) in pazienti non responsive ad altri chemioterapici quali platino o paclitaxel (Gordon *et al.*, 1996). Per le topoisomerasi, si rinvia alle voci NUCLEICI ACIDI* (col. *5470), RESISTENZA AI CHEMIOTERAPICI ANTIBLASTICI* (coll. *6347-6350) e LEUCEMIE** (col. **3150).

La chemioterapia di prima linea dopo prima chirurgia rappresenta una tappa obbligata nel trattamento della maggior parte dei casi di carcinoma ovarico, ad eccezione delle pazienti allo stadio IA e IB di malattia in cui la stadiazione chirurgica sia stata eseguita in modo corretto e con un *grading* G1, G2 che possono essere trattate con sola chirurgia (Young *et al.*, 1990). Fa eccezione l'istotipo a cellule chiare e quello indifferenziato.

Nelle pazienti con tumori iniziali a prognosi sfavorevole (citologia peritoneale positiva, G3) va presa in considerazione una terapia adiuvante a base di platino.

Il carcinoma ovarico in stadio avanzato dopo terapia chirurgica deve essere sottoposto a chemioterapia. Le associazioni polichimioterapiche comprendenti il platino si sono dimostrate più efficaci del platino da solo o di associazioni terapeutiche senza platino.

La chemioterapia si dimostra più efficace nelle pazienti che sono state sottoposte ad una citoriduzione ottimale o con piccolo volume tumore residuo. Sei cicli di chemioterapia sono ormai lo schema consolidato con una percentuale di risposte che oscilla tra il 60 ed il 70% (NIH, 1994).

Fino a qualche anno fa è stato acceso il dibattito se adottare, nelle forme avanzate un regime terapeutico con cisplatino e ciclofosfamide o se invece fosse più efficace l'associazione con le antracicline ed in particolare l'adriamicina. Secondo uno studio dell'Ovarian Cancer Meta-analysis Project (1991) vi è un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale utilizzando l'associazione con l'adriamicina.

Nella terapia di prima linea si sono ottenute risposte significative con la somministrazione dell'associazione del paclitaxel e cisplatino in pazienti con residuo tumore subottimale (McGuire *et al.*, 1996). Questa terapia è diventata attualmente lo standard terapeutico per pazienti con tumore ovarico avanzato.

Le pazienti che vanno incontro a ripresa di malattia dopo chemioterapia di prima linea con platino entro sei mesi, da imputare all'instaurarsi di fenomeni di resistenza, avranno una scarsa risposta ad ulteriori regimi terapeutici con platino. In questi casi vanno somministrate terapie alternative, terapie di seconda linea, ma senza intento curativo. Il paclitaxel è attualmente l'agente terapeutico più usato nelle recidive di carcinoma ovarico resistenti al platino. Le risposte ottenute oscillano tra il 20 ed il 30%. Non vi è comunque nessuna evidenza che vi sia un miglioramento della sopravvivenza in questi soggetti.

In questo tipo di pazienti si sono ottenute risposte in circa il 15% dei casi con differenti regimi chemioterapici basati sulla somministrazione di ifosfamide, esametilmelamina, 5-FU, topotecan (NIH, 1994).

Il ruolo della chemioterapia intraperitoneale non è stato tuttora ben definito, anche se è ipotizzabile che questa via potrebbe causare elevate concentrazioni del farmaco a livello locale oltre che garantire un buon assorbimento sistemico.

È stato infine osservato che l'intensificazione della dose può permettere un incremento della risposta. Gli effetti collaterali ed in particolare la mielotossicità sono però potenziati. In questi casi l'impiego di fattori di crescita ematopoietici e il trapianto di cellule staminali midollari o periferiche potrebbero bilanciare gli effetti negativi. Allo stato attuale tali procedure devono considerarsi sperimentali.

In seguito all'osservazione che alcune linee cellulari di carcinoma ovarico rispondono all'effetto antiproliferativo dei progestinici e del tamoxifene, è stata suggerita una terapia di salvataggio endocrino nelle pazienti non rispondenti alla chemioterapia.

Lo studio più significativo è quello condotto dal Gynecologic Oncology Group che ha riscontrato una risposta pari al 13% in un gruppo di 105 pazienti a cui è stato somministrato tamoxifene al dosaggio di 20 mg per due volte al dì per un mese (Hatch *et al.*, 1991; Markman, 1996).

È stata prospettata anche una terapia con gli analoghi dell'LH-RH. I risultati attuali sembrano evidenziare che circa il 15-20% dei tumori ovarici chemioresistenti possano beneficiare di un'azione terapeutica delle manipolazioni endocrine senza particolari effetti collaterali.

Bibliografia

- Advanced ovarian cancer trialists group, *BMJ*, 1991, **303**, 884.
 Albertsen H.M. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **7**, 472.
 Barber H. R. K., in Grundman E. ed., *Carcinoma of the ovary*, 1983, Gustav Fisher, New York, p. 7.
 Bast R. C. Jr., Knauf S., Epenetos A. *et al.*, *Cancer*, 1991, **68**, 1758.
 Benedetti-Panici P., Maneschi F., Scambia G. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1996, **87**, 532.
 Boente M. P., Godwin A. K., Hogan M., *Clin. Obstet. Gynecol.*, 1994, **37**, 377.
 Bourne T. H., Whitehead M. L., Campbell S. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 1991, **43**, 92.
 Campbell S., Bhan V., Royston P. *et al.*, *BMJ*, 1989, **299**, 1363.
 Castilla L. H. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8** (4), 387.
 CNR, Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori del colonretto, i tumori della mammella, i tumori del polmone, i tumori della prostata, i tumori dell'utero e dell'ovaio, Milano, 1996.
 CNR, Consenso sugli Screening in oncologia: indirizzo per la ricerca e raccomandazioni al Servizio Sanitario Nazionale, Roma, giugno 1996.
 Cohen C. J., Jennings T. S., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, **170**, 1088.
 De Rosa G., Catalano D., Dell'Isola A. *et al.*, *Minerva Ginecol.*, 1997, **49**, 243.
 FIGO, *FIGO Cancer Gynecol. Oncol.*, 1986, **25**, 383.
 Foulkes W. D., Narod S. A., *Clin. Invest. Med.*, 1995, **18**, 473.
 Friedman L. S. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8**, 399.
 Gallion H. H., Smith S. A., *Semin. Surg. Oncol.*, 1994, **10**, 249.
 Gordon A., Bookman M., Malmstrom H. *et al.*, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 1996, **15**, 282 (Abst. 763).
 Green A., Purdie D., Bain C. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1997, **71**, 948.
 Hakama M., Stenman U. H., Knekt P. *et al.*, *J. Med. Screen*, 1996, **3**, 40.
 Hall J. M., Lee M. K., Newman B. *et al.*, *Science*, 1990, **250**, 1684.
 Hartenbach E. M., Schink J. C., *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 1996, **8**, 339.
 Hatch K. D. *et al.*, *Cancer*, 1991, **68**, 269.
 Heller D. S., Gordon R. E., Westhoff C., Gerber S., *Am. J. Ind. Med.*, 1996, **29**, 435.
 Herbst A. L., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, **170**, 1099.
 Hoskins P. J., Swenerton K. D., *J. Clin. Oncology*, 1994, **12**, 60.
 Karlan B. Y., *Cancer Invest.*, 1997, **15**, 265.
 Kosary C. L., *Semin. Surg. Oncol.*, 1994, **10**, 31.
 Lelkowitz E. S., Garland C. F., *Int. J. Epidemiol.*, 1994, **23**, 1133.
 Marinaaccio M., Traversa A., Carroggia F. *et al.*, *Minerva Ginecol.*, 1995, **47**, 69.
 Markman M. *et al.*, *Gyn. Oncol.*, 1996, **62**, 4.
 McGuire W. P., Hoskins W. J., Brandy M. F. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 1.
 Miki *et al.*, *Science*, 1994, **266**, 66-71.
 Mosgaard B. J., Lidsgaard O., *Ugeskr. Laeger*, 1996, **158**, 5150.

- NIH Consensus Development Conference Statement, *Gynecol. Oncol.*, 1994, **55**, S4-S14.
 Ovarian cancer meta-analysis project, *J. Clin. Oncol.*, 1991, **9**.
 Pearson V. A., *Public Health*, 1994, **108**, 367.
 Pepe F., Pepe P., Grillo S. *et al.*, *Minerva Ginecol.*, 1996, **48**, 303.
 Perez R. P., Godwin A. K., Hamilton T. C., Ozols R. F., *Semin. Oncol.*, 1991, **18**, 186.
 Piccart M., Gore M., Ten Bokkel Huinink W. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, **87**, 676.
 Piver M. S., *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Physics*, 1981, **8**, 247.
 Portenoy R. K., Kornblith A. B., Wong G. *et al.*, *Cancer*, 1994, **74**, 907.
 Randrianjafisamindrakotraka N. S., Hedelin G., Philippe E., Schaffer P. J., *Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, 1995, **24**, 711.
 Risch H. A., Jain M., Marrett L. D., Howe G. R., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994, **86**, 1409.
 Rustin G. J. S., Nelstrop A. E., Mc Clean P. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1996, **14**, 1545.
 Rustin G. J. S., Nelstrop A. E., Tuxen M. K., Lambert H. E., *Ann. Oncol.*, 1996, **7**, 361.
 Sainz-de-la-Cuesta R., Eichhorn J. H., Rice L. W. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 1996, **60**, 238.
 Scambia G., Benedetti-Panici P., Ferrandina G., Distefano M., Salerno G., Romanini M. E., Fagotti A., Mancuso S., *Br. J. Cancer*, 1995, **72**, 361.
 Scambia G., Benedetti-Panici P., Greggi S., Baiocchi G., Perrone L., Mancuso S., *Eur. J. Gynecol. Oncol.*, 1990, **21**, 6.
 Serov S. V., Schully R. E., Sobin L. A., *Organization*, 1973, **17**, 18.
 Simard J. *et al.*, *Nature Genetics*, 1994, **8** (4), 392.
 Società Italiana di Oncologia Ginecologica, *Manuale di Ginecologia Oncologica*, 1998, UTET, Torino.
 Sier E. A., Barakat R. R., Curtin J. P. *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 1996, **737**.
 Trimble E. L., Adams J. D., Vena D. J., *Clin. Oncol.*, 1993, **11**, 2405.
 van der Burg M. E. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332** (10), 629-634.
 Vercelli M., Quaglia A., Casella C., Mangone L., *Tumori*, 1997, **83**, 490.
 Wehner A. P., *Food. Chem. Toxicol.*, 1994, **32**, 1173.
 Westhoff C., *Annu. Rev. Public Health*, 1996, **17**, 85.
 Whittemore A. S., *Gynecol. Oncol.*, 1994, **55**, S15-S19.
 Whittemore A. S. *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 1992, **136**, 1184.
 Woolas R. P., Xu F. J., Jacobs I. J., Yu Y., Daley L., Berchuck A. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 1748.
 Young R. C., Walton L. A., Ellenberg S. S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1990, **322**, 1021-1027.

PASQUALE ALESSANDRO MARGARITIL,
GIOVANNI SCAMBIA E SALVATORE MANCUSO

OVARICA IPERSTIMOLAZIONE, SINDROME DA

1. ovarian hyperstimulation syndrome.

SOMMARIO

Introduzione (col. 4298). - **Etiopatogenesi** (col. 4299). - **Aspetti clinici** (col. 4300). - **Terapia** (col. 4301): *Premessa*. - *Mantenimento del volume intravascolare*. - *Trattamento farmacologico etiopatogenetico*. - *Terapia delle eventuali complicazioni*. - *Terapia invasiva*. - **Prevenzione** (col. 4303): *Identificazione delle pazienti a rischio prima della stimolazione*. - *Identificazione delle risposte a rischio durante la stimolazione*. - *Prevenzione al momento dell'induzione dell'ovulazione*. - *Prevenzione dopo l'induzione dell'ovulazione*. - *Prevenzione, dopo l'induzione dell'ovulazione, con farmaci che contrastano i fattori etiopatogenetici della sindrome*.

Introduzione

La sindrome da iperstimolazione ovarica (*Ovarian Hyper-Stimulation Syndrome* [OHSS] degli autori di lingua inglese) è usualmente conseguente all'induzione dell'ovulazione semplice (Moneta *et al.*, 1974; Moneta *et al.*, 1977; Navot *et al.*, 1988) o dell'ovulazione multipla per le tecniche di procreazione assistita (Delvigne *et al.*, 1993a; Delvigne *et al.*, 1993b; FIVNAT, 1993; SART, 1994); v. FECONDAZIONE ASSISTITA**. Raramente si manifesta in gravidanze spontanee (Rosen e Lew, 1991; Regi *et al.*, 1996), spesso associate a patologie del trofoblasto, idrope fetale, gravidanze multiple o condizioni associate a una placenta grande come il diabete gravidico o l'immunizzazione materno-fetale da fattore Rh (Haning *et al.*, 1985). Nella forma grave la sindrome è piuttosto rara e la sua incidenza varia dallo 0,6 al

14% (Editorial, *Lancet*, 1991; Rizk, 1995). Negli U.S.A. su 25.000 induzioni dell'ovulazione multipla eseguite in un anno, solo lo 0,5% sviluppa una grave forma di iperstimolazione ovarica (SART, 1992). Tuttavia forme più lievi sono presenti nel 25-30% dei cicli di induzione dell'ovulazione multipla (Morris *et al.*, 1995). È stato riscontrato che l'86-92% delle OHSS si verificano nei cicli in cui è insorta una gravidanza (Forman *et al.*, 1990; Golan *et al.*, 1989; Padilla *et al.*, 1990) e usualmente sono le forme più gravi (McClure *et al.*, 1992); mentre sono rare nelle donne sottoposte a induzione dell'ovulazione multipla per ovodonazione, anche se si sono raggiunti valori elevati dell'estradiolo o del numero dei follicoli (Morris *et al.*, 1995).

Etiopatogenesi

Due fenomeni sono alla base di questa sindrome: l'ingrandimento eccessivo delle ovaie dovuto a cisti multiple e una aumentata permeabilità vascolare che determina la fuoriuscita dei liquidi, delle proteine e dei sali dall'interno dei vasi agli spazi extracellulari. Si determina così la formazione di ascite ed eventualmente di idrotorace, e quindi ipovolemia, oliguria, emoconcentrazione, alterazioni elettrolitiche, principalmente acidosi ipercaliemica, ed eventualmente una pericolosissima coagulazione intravascolare diffusa (Nylun *et al.*, 1994). Elevati valori di estradiolo preovulatori o un elevato numero di follicoli maturi sono il presupposto e correlano con la gravità della sindrome (Morris *et al.*, 1995; Schenker e Polishuk, 1976a; Navot *et al.*, 1992). Tuttavia altri fattori sono stati chiamati in causa per la patogenesi della iperstimolazione (Levy *et al.*, 1996). Per esempio le prostaglandine e le prostaciline (Schenker e Polishuk, 1976b; Bettendorff e Lindner, 1987) sono aumentate, come la renina plasmatica, l'attività reninica plasmatica e ascitica (Delbaere *et al.*, 1994) e l'aldosterone. Il loro incremento sembra correlato con la gravità della sindrome da iperstimolazione (Ong *et al.*, 1991; Navot *et al.*, 1987). Essi avrebbero il compito di compensare la marcata vasodilatazione arteriolare periferica, la deplezione del compartimento arteriolare-vascolare e l'ipotensione arteriolare (Balasch *et al.*, 1991) oppure potrebbero essere causa della genesi della sindrome da iperstimolazione tramite l'elaborazione del-

l'angiotensina II (ANG II), un potente agente che promuove l'angiogenesi, l'incremento della permeabilità vascolare e la liberazione di prostaglandine. Anche le citochine (interleuchina 1 e 6) sono state riportate come possibili mediatori o fattori patogenetici (Cannon e Dinarello, 1985; Friedlander *et al.*, 1993; Loret de Mola *et al.*, 1996). Dati recenti hanno attribuito la patogenesi dell'ascite all'incremento del fattore di accrescimento dell'endotelio vascolare (McClure *et al.*, 1994; Neulen *et al.*, 1995), mentre ancora incerto rimane il ruolo svolto dall'istamina e dalla serotonina (Erlik *et al.*, 1979; Zaidise *et al.*, 1983).

Tuttavia il ruolo etiologico più importante nell'insorgenza della sindrome spetta sicuramente all'HCG esogeno o endogeno. Infatti se durante i cicli di stimolazione ovarica si omette la somministrazione dell'HCG, qualunque sia il livello dell'E₂ raggiunto o il numero dei follicoli ovarici sviluppati, si ottiene un arresto della stimolazione ovarica e una loro involuzione progressiva, specie se si è adoperato l'analogo del GnRH che impedisce l'insorgenza di picchi endogeni di LH. Al contrario, invece, quando insorge in seguito alla stimolazione ovarica una gravidanza, la sindrome da iperstimolazione ha un decorso più grave e più lungo (Morris *et al.*, 1995; Golan *et al.*, 1989; Padilla *et al.*, 1990) e lo stesso succede quando si utilizza l'HCG, invece del progesterone, come supporto luteale (Soliman *et al.*, 1994). L'OHSS è più frequente e più severa in caso di gravidanze multiple (Mathur *et al.*, 1996), dove i livelli di HCG sono più elevati fin dall'insorgenza della gravidanza (Schmidt *et al.*, 1994).

Aspetti clinici

Una classificazione della OHSS basata sugli aspetti clinici, di laboratorio e ultrasonografici divide la sindrome in forma lieve, moderata e severa (Schenker, 1993) (tab. I).

In effetti la forma lieve da iperstimolazione facilita l'insorgenza delle gravidanze (Gelety e Buyalos, 1995) ed è sotto certi aspetti voluta dai medici. Anche il numero degli aborti è in questi casi aumentato, ma il bilancio globale è positivo e alla fine si ottengono più bambini in braccio. Tuttavia è difficile poter graduare la gravità della sindrome di OHSS, per cui non è consigliato tentare lievi gradi di iperstimolazione.

TAB. I. CLASSIFICAZIONE DELLA SINDROME DA IPERSTIMOLAZIONE

Iperstimolazione di grado	Sintomi clinici	Esami di laboratorio	Aspetti ultrasonografici
I. <i>Lieve</i> (Attenzione [Risoluzione della sintomatologia con la mestruazione])	Peso o tensione addominale		Cisti o corpi lutei bilaterali ≤ 6 cm Versamento (liquido ascitico o sangue per rottura di cisti) nel Douglas di scarsa entità
II. <i>Moderata</i> (Osservazione stretta ed eventuale ospedalizzazione [Persistenza delle cisti per 2-4 settimane dopo il flusso])	Dolori addominali Diarrea o vomito Aumento del volume addominale Aumento di peso	Esame urine Emocromo ed ematocrito Protidemia e albuminemia Creatinina e acido urico Controllo peso e circonferenza addominale	Volume ovarico fino a 12 cm Liquido ascitico di discreta entità
III. <i>Severa</i> (Ospedalizzazione)	Tensione addominale Diarrea o vomito Ascite conclamata Ipovolemia, Oliguria Versamento pleurico e/o pericardico Emoconcentrazione Fenomeni trombo-embolici Possibile morte	Emocromo ed ematocrito Coagulazione, esame urine, bilancio idrico, funz. epatica Elettroliti plasmatici Creatininemia Creatinina clearance Acido urico Protidemia e albuminemia Controllo peso e circonferenza addominale Eventuale RX torace	Volume ovarico ≥ 12 cm Liquido ascitico di alcuni litri

La gravità della sindrome di OHSS è correlata alla quantità di liquido fuoriuscito dai capillari dilatati, per cui si determina ascite, eventuale idrotorace e/o idropericardio, perfino edema vulvare (Coccia *et al.*, 1995), oliguria, ipovolemia, emocoagulazione, fenomeni tromboembolici (Kodama *et al.*, 1996; Horstkamp *et al.*, 1996; Germond *et al.*, 1996; Balasch *et al.*, 1996) e in rari casi la morte della paziente per CID (Mozes *et al.*, 1965; Schenker, 1990). L'ascite pertanto è il primo sintomo che si evidenzia e la sua comparsa rende la sindrome da iperstimolazione di grado moderato, da sottoporre ad attenta osservazione medica. Il volume ovarico è importante ma in pazienti sottoposte a tecniche di fecondazione assistita (ART) si è constatato che severe forme di iperstimolazione possano coesistere con volumi ovarici relativamente contenuti, anche inferiori a 10 cm (Navot *et al.*, 1992). I parametri più utili per giudicare la gravità della sindrome sono il valore dell'ematocrito, il numero dei globuli bianchi, il grado di funzionalità renale oltre alla gravità dell'ascite. Navot *et al.* (1992) suggeriscono che l'OHSS può essere considerata severa se l'ematocrito supera il 45%, i globuli bianchi sono superiori a 15.000/ml, vi è oliguria, l'ascite è massiva, la creatinina è compresa tra 1,0 e 1,5, la creatinina clearance è pari o superiore a 50 ml/min ed è presente lieve disfunzione epatica e renale.

La OHSS diventa critica quando l'ascite tende l'addome al massimo, vi può essere idrotorace o addirittura anasarca, l'ematocrito è superiore al 55%, i globuli bianchi superano i 25.000, l'oliguria è marcata, la creatinina è pari o superiore a 1,6, la creatinina clearance è inferiore a 50 ml/min, la funzione renale è francamente insufficiente; possono esserci alterazioni dei parametri dei fattori della coagulazione con insorgenza di fenomeni tromboembolici e può comparire una sindrome respiratoria con dispnea, etc.

In queste condizioni vi è un grave pericolo di vita per la paziente che dovrebbe essere trasferita in un reparto di terapia intensiva. In questi ultimi due gradi della OHSS, cioè la severa e la critica, la terapia medica si impone.

Terapia

Premessa

I principi della terapia si basano sul mantenimento e sul ripristino del volume intravascolare, sul trattamento farmacologico etiopatogenetico, sull'approccio terapeutico alle eventuali complicanze e sulla terapia invasiva, evacuativa dell'ascite o riduttiva del volume ovarico (tab. II).

L'etiopatogenesi della OHSS non è ancora chiara e questo spiega la natura largamente empirica della attuale terapia che tende a sostenere le condizioni generali delle pazienti in attesa che la sindrome si risolva spontaneamente (Jenkins *et al.*, 1995). Inoltre è importante cercare di conoscere se è insorta la gravidanza perché questa da una parte esacerba la durata e la gravità della sindrome, dall'altra può essere danneggiata da alcune delle terapie proposte.

Bisogna dare sollievo ai dolori e fastidi presentati dalla paziente mentre si fa una analisi critica dello stato di idratazione, della situazione emodinamica, della gravità dell'ascite o eventualmente della effusione pleurica o pericardica o del pericolo di tromboembolismo.

Mantenimento del volume intravascolare

L'esigenza di correggere la riduzione del volume intravascolare rappresenta la terapia prioritaria. Lo studio dell'ematocrito e degli elettroliti plasmatici può aiutare per determinare la terapia adeguata. Bisogna aumentare la pressione oncotica endovasale per impedire ulteriore fuoriuscita di liquidi dal circolo o per recuperarne di quelli già usciti. I colloidi sono più validi in tal senso e se l'ematocrito

TAB. II. PRINCIPI DELLA TERAPIA DELL'OHSS

- | | |
|------|--|
| I. | Mantenimento e ripristino del volume intravascolare |
| a) | soluzioni cristalloidi |
| b) | soluzioni colloidali |
| 1) | plasma fresco o congelato |
| 2) | albumina |
| 3) | destrano |
| 4) | amido idrossietilico |
| II. | Trattamento farmacologico etiopatogenetico |
| a) | indometacina |
| b) | ACE-inibitori |
| c) | antistaminici |
| d) | antiprostaglandine |
| III. | Terapia delle eventuali complicazioni |
| a) | diuretici |
| b) | terapia anticoagulante |
| c) | dopamina |
| d) | epatoprotettori |
| e) | ossigenoterapia |
| IV. | Terapia invasiva |
| a) | paracentesi |
| b) | intervento chirurgico sulle ovaie |

è superiore a 44% conviene iniziare subito con albumina. Questa è in soluzione isotonica al 5% o ipertonica al 25% e 1 g di albumina trattiene 18 g di acqua nello spazio vascolare. In una donna giovane è possibile iniettarne 30-40 g/die, inizialmente, se non di più. Può dare reazioni allergiche, ma non trasmette malattie virali, come potrebbe succedere con il plasma fresco o congelato.

Può essere utilizzato anche destrano (v.; v. *) con peso molecolare di 40.000 o 70.000. Un grammo riesce a trattenere in circolo 25 g di acqua e quindi la sua infusione produce una rapida espansione del volume plasmatico, aumenta il ritorno venoso al cuore, aumenta la pressione arteriosa, la gittata cardiaca, la pressione sistolica e la pressione venosa centrale e così ripristina una normale dinamica circolatoria. Il destrano inoltre aumenta la perfusione renale e quindi la diuresi mentre diminuisce la viscosità ematica e previene così la formazione di trombi. Gli svantaggi dell'uso del destrano sono rappresentati dalla riduzione dell'adesività piastrinica, per cui è controindicato in caso di perdite ematiche, da possibili reazioni allergiche di vario grado nel 5% delle pazienti o anche dalle reazioni anafilattiche che possono causare la morte della paziente (Schenker, 1993), dalla elevazione della bilirubina plasmatica e delle proteine plasmatiche.

La terapia con amido idrossietilico è meno adoperata perché può provocare un allungamento del PTT e una riduzione del numero delle piastrine e reazioni allergiche nell'1% dei casi.

Insieme alle sostanze colloidali è utile infondere soluzioni elettrolitiche regolandosi sui valori degli elettroliti plasmatici. La quantità totale dei liquidi infusi deve essere in funzione della diuresi giornaliera. Un flusso delle urine inferiore a 30 ml/h è indicativo di ipovolemia. Una bassa pressione arteriosa è indicativa di un ritorno venoso al cuore inadeguato, specie se in presenza di ascite con tensione addominale, e questo può essere a sua volta causa di una ridotta gittata cardiaca e quindi di una ridotta perfusione renale e quindi di una ridotta diuresi.

Trattamento farmacologico etiopatogenetico

1. *Indometacina.* - È stata usata come farmaco antiprostaglandinico nella ipotesi che le prostaglandine siano responsabili della spiccata vasodilatazione. Non sembra avere

OVARICA IPERSTIMOLAZIONE

effetti teratogeni (Katz *et al.*, 1984). Può aggravare patologie psichiatriche, l'epilessia e il parkinsonismo. È controindicata in pazienti allergici all'aspirina e può peggiorare una insufficienza renale.

2. **ACE-inibitori.** – Sono stati somministrati, con efficacia, nell'ipotesi che il sistema renina-angiotensina sia la causa della massiva vasodilatazione. Tuttavia non si hanno ancora risultati sicuri della loro innocuità teratogenetica.

3. **Antistaminici.** – In casi gravi sono stati utilizzati in quanto consentono una stabilizzazione della permeabilità di membrana come bloccanti i ricettori H-1 (Kirshon *et al.*, 1988).

Terapia delle eventuali complicazioni

Diuretici. – Il loro uso viene sconsigliato. Solo dopo aver ripristinato la pressione oncotica del sangue possono risultare di qualche utilità (Navot *et al.*, 1992; Schenker, 1993).

Terapia anticoagulante. – Le complicanze trombo-emboliche, probabilmente favorite dalla emoconcentrazione, sono per fortuna rare nella OHSS (Delvigne *et al.*, 1993a; Schenker, 1993; Coccia *et al.*, 1995; Kodama *et al.*, 1996; Horstkamp *et al.*, 1996). Eventualmente può essere adoperata eparina sottocute a basse dosi (Jenkins *et al.*, 1995).

Dopamina. – Può essere adoperata per incrementare il flusso renale plasmatico quando è stato ristabilito il normale volume plasmatico (Jenkins *et al.*, 1995).

Ossigenoterapia attiva. – Può essere necessaria se si instaura una difficoltà respiratoria. Di solito è resa inutile dalla paracentesi che elimina quella che ne è la causa principale.

Terapia invasiva

Paracentesi. – Una oliguria che persiste dopo la correzione della emoconcentrazione può essere dovuta ad una ascite in tensione che riduce il ritorno venoso al cuore, causando congestione renale e diminuita gettata cardiaca. Una paracentesi in questo caso può indurre un drastico miglioramento della funzione renale (Forman *et al.*, 1990; Padilla *et al.*, 1990; Borenstein *et al.*, 1989). Essa permette anche l'eliminazione di sostanze con attività reninica che possono essere presenti nel liquido ascitico (Delbaere *et al.*, 1994). La paracentesi dovrebbe essere condotta per via transaddominale, sotto controllo ultrasonografico per evitare involontarie rotture delle cisti con l'ago. È opportuno infondere contemporaneamente dell'albumina per la stabilità emodinamica delle pazienti (Mashiach *et al.*, 1990). In caso di effusione pleurica, che si verifica nel 21% delle pazienti con OHSS, può essere utile una toracentesi quando la effusione pleurica è sintomatica; mentre la effusione pericardica di solito va trattata in modo conservativo. Essa è presente nel 3% dei casi di OHSS (Delvigne *et al.*, 1993a).

Intervento chirurgico. – L'asportazione delle cisti o la loro detorsione è necessaria solo in casi di complicanze, quali torsioni o rotture, ed eventualmente può essere effettuata per via laparoscopica (Mashiach *et al.*, 1990). Un'altra alternativa è la aspirazione transvaginale o transaddominale della cisti e quindi dell'ascite sotto controllo ecografico (Fakih e Bello, 1992).

Prevenzione

Identificazione delle pazienti a rischio prima della stimolazione

Idealmente, bisognerebbe identificare le pazienti che possono avere una OHSS prima di iniziare la terapia in modo da eseguirla con molta cautela (tab. III). Alcuni studi hanno evidenziato alcune caratteristiche fisiche o endocrinologiche delle pazienti tendenti alla iperstimolazione e an-

TAB. III. PREVENZIONE DELLE OHSS

I.	Prima della stimolazione - Identificazione della popolazione a rischio
a)	donne longilinee
b)	donne di età inferiore ai 35 anni
c)	donne con PCOS
d)	donne con aspetto ovarico simil-PCOS
II.	Durante la stimolazione - Identificazione delle risposte a rischio per
a)	improvvisi incrementi dell'estradiolo plasmatico
b)	elevati picchi dell'estradiolo plasmatico
c)	elevato numero di follicoli maturi e non
III.	All'induzione dell'ovulazione
a)	somministrare basse dosi di HCG
b)	sostituzione dell'HCG con picchi endogeni di LH, variamente provocati
c)	utilizzare FSH purificato ed LH-ricombinante
d)	utilizzare GnRH-analogo prima e durante l'induzione dell'ovulazione o GnRH-antagonista
e)	non somministrare HCG
f)	dilazionare la somministrazione dell'HCG
g)	trasformare una induzione dell'ovulazione in ART
h)	aspirare gli ovociti e utilizzare gli embrioni in cicli successivi spontanei
IV.	Dopo l'induzione dell'ovulazione
a)	somministrare progesterone invece di HCG per supportare il corpo luteo
V.	Dopo l'induzione dell'ovulazione con farmaci che contrastano i fattori etiopatogenetici della sindrome
a)	farmaci ACE-inibitori
b)	aspirina o antiprostaglandine
c)	antistaminici
d)	corticosteroidi
e)	albumina

che il tipo della loro risposta ovarica allo stimolo (Delvigne *et al.*, 1993a). Le donne con policistosi ovarica (PCOS) (Sallat-Baroux *et al.*, 1990; MacDougall *et al.*, 1992) o anche con atteggiamento policistico delle ovaie, per cui durante la fase luteale si evidenziano aspetti ultrasonografici simili all'ovaio policistico con piccoli follicoli periferici e stroma denso centrale, hanno una vivace risposta (Delvigne *et al.*, 1993a; Navot *et al.*, 1992) caratterizzata da una lunga fase di latenza e poi dalla maturazione contemporanea di più follicoli con innalzamenti rapidi dell'estradiolo plasmatico che giunge a valori spesso elevatissimi (Delvigne *et al.*, 1993b; Asch *et al.*, 1991).

Identificazione delle risposte a rischio durante la stimolazione

Tuttavia non sempre è possibile prevedere una OHSS dall'aspetto delle pazienti o da quello delle ovaie: bisogna allora cercare di identificare i fattori di rischio che si manifestano durante il trattamento. È certo che usualmente l'OHSS si verifica in donne che dimostrano una maggiore sensibilità alle Gn con una risposta più immediata e improvvisa (Delvigne *et al.*, 1993b; Asch *et al.*, 1991). Pertanto può essere utile iniziare con una bassa dose di Gn, aspettare per alcuni giorni la risposta ovarica e, se questa ritarda, incrementarla del 50% e non di più. Bisogna prestare molta attenzione agli incrementi improvvisi o eccessivi dell'estradiolo plasmatico e diffidare di essi perché dimostrano una eccessiva sensibilità delle ovaie alla stimolazione (Delvigne *et al.*, 1993b; Asch *et al.*, 1991).

Poiché i picchi ovulatori dell'estradiolo sono usualmente più elevati nei cicli con OHSS, rispetto ai controlli (Na-

vot *et al.*, 1988; Delvigne *et al.*, 1993a; Asch *et al.*, 1991), sarebbe possibile stabilire un tetto oltre il quale interrompere la stimolazione per evitare l'OHSS. Tuttavia questo tetto varia da 1500 pg/ml a 6000 a seconda degli autori (Navot *et al.*, 1992; Schenker, 1993; Salat-Baroux *et al.*, 1990; Asch *et al.*, 1991) e dimostra che esistono altri fattori che determinano le iperstimolazioni. Per esempio Asch *et al.* (1991) dimostrano una buona correlazione tra il numero dei follicoli e il numero degli ovociti trovati: se questi sono superiori a 30 essi riscontrano il 23% di severa OHSS; se insieme al numero dei follicoli anche l'estradiolo è molto elevato, superiore a 6000 pg/ml, il rischio di severa OHSS arriva all'80% (Asch *et al.*, 1991). Tuttavia percentuali affatto differenti sono state riscontrate da altri ricercatori seguendo gli stessi parametri (Morris *et al.*, 1995). Altre formule predittive sono state da altri riportate (Delvigne *et al.*, 1993b) quali per esempio la resistenza vascolare intraovarica alla fine della stimolazione (Moohan *et al.*, 1997); tuttavia spesso le osservazioni effettuate a posteriori non dimostrano la stessa importanza quando usate prospetticamente (Morris *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1990) e questo conferma che ancora siamo lontani dall'aver individuato un parametro efficace di prevenzione delle OHSS da applicare durante il trattamento delle stimolazioni ovariche.

Prevenzione al momento dell'induzione dell'ovulazione

Qualche possibilità di controllare meglio la stimolazione esiste nella scelta del farmaco giusto per ottenere l'induzione dell'ovulazione a seconda della patologia presentata dalle donne. In caso di PCOS resistente al clomifene può essere opportuno ricorrere alla terapia chirurgica delle ovaie (Campo *et al.*, 1993), oppure all'uso di FSH (Garcea *et al.*, 1985) o di FSH a basse dosi (Shoham *et al.*, 1991; Dale *et al.*, 1992). L'uso di GnRH-analogo (GnRH-A) prima della terapia con GnRH (Filicori *et al.*, 1988) o durante la terapia con Gn (Dale *et al.*, 1992) può risultare utile, anche se secondo alcuni gli analoghi aumenterebbero talora il rischio di iperstimolazione (Forman *et al.*, 1990) per meccanismi di «flare-up» e di stimolazione dello stroma ovarico (Mordel e Schenker, 1993). Inoltre l'uso di GnRH-A per la «down-regulation» richiede che l'ovulazione sia indotta poi da HCG escludendo l'uso del GnRH o GnRH-A per indurre un picco endogeno di LH, molto meno rischioso per la OHSS (Shoham *et al.*, 1995).

Dato che la OHSS è dovuta alla presenza di HCG o LH, nei cicli ad elevato rischio si potrebbe non somministrare l'HCG annullando il ciclo di trattamento. Questa evenienza è poco accettata dai medici e dalle pazienti specie perché non si conoscono sicuri indizi di rischio elevato di OHSS.

Si potrebbero però applicare degli accorgimenti che permettono di non perdere il ciclo di stimolazione e di evitare elevati rischi di iperstimolazione.

Si può interrompere la stimolazione con Gn fino a che i valori dell'estradiolo non ritornino a livelli più accettabili (Padilla *et al.*, 1990; Urman *et al.*, 1992; Benadiva *et al.*, 1997). Si può utilizzare una dose di HCG inferiore. Usualmente la posologia di HCG varia da 5000 a 20.000 I.U.; quando la stimolazione sembra vicina alla iperstimolazione, si possono adoperare solo 5000 I.U. di HCG o meno, anche se queste ultime posologie consentono minor numero di gravidanze (Schenker, 1993). L'LH endogeno ha minor tempo di dimezzamento e un legame più labile con i recettori ovarici (Shoham *et al.*, 1995; Empeiraire e Ruffie, 1991). Esso presenta quindi un minor rischio di iperstimolazione (Forman *et al.*, 1990). Può essere indotto un picco di LH endogeno con la somministrazione di GnRH o di GnRH-A sottocute o per spray nasale (Empeiraire e Ruffie, 1991;

Shalev *et al.*, 1994) se non si è adoperato il GnRH-A per la down-regulation ipofisaria o se si è usato il GnRH antagonista per la desensibilizzazione ipofisaria. È probabile che in futuro si possa usare l'LH-ricombinante per indurre l'ovulazione poiché esso, che è simile all'LH umano (Shoham *et al.*, 1995), non dovrebbe indurre iperstimolazione o provocarne di meno.

È stato ipotizzato che l'aspirazione dei follicoli, che si effettua nelle tecniche di fecondazione assistita, produce una piccola emorragia endofollicolare e quindi la ridotta produzione di sostanze che possono provocare l'OHSS (Fakih e Bello, 1992; Gonen *et al.*, 1991). Non tutti condividono questa opinione (Aboulghar *et al.*, 1992), tuttavia alcuni consigliano di effettuare una ART, anche se non prevista, quando si tende alla iperstimolazione (Nisker *et al.*, 1994).

L'insorgenza della gravidanza peggiora una OHSS (Jenkins *et al.*, 1995). Infatti le donatrici di ovociti, anche se giungono a livelli elevati di estradiolo e di ovociti aspirati, hanno minori rischi di iperstimolazione (Morris *et al.*, 1995). È stato consigliato in donne che tendono alla OHSS di conservare tutti gli embrioni per trasferirli in utero in cicli successivi. Sembra che questo migliori molto l'intensità dell'iperstimolazione, senza che se ne riduca l'incidenza (Wada *et al.*, 1993; Tiitinen *et al.*, 1995).

Prevenzione dopo l'induzione dell'ovulazione

L'uso di HCG al posto del progesterone per supportare il corpo luteo può provocare un maggior numero di OHSS (Araujo *et al.*, 1994; Soliman *et al.*, 1994). Poiché sembra non esserci differenza nel numero di gravidanze ottenute con i due farmaci (Soliman *et al.*, 1994), è consigliabile utilizzare il progesterone quando si teme la possibilità di una iperstimolazione.

Prevenzione, dopo l'induzione dell'ovulazione, con farmaci che contrastano i fattori etiopatogenetici della sindrome

Secondo i meccanismi etiopatogenetici della sindrome, il sistema renina-angiotensina ovarico con incremento di produzione di angiotensina II sembra rivestire un ruolo importante nella OHSS. Inoltre sembra che la produzione di renina ovarica sia influenzata dai livelli dell'HCG (Sealey *et al.*, 1985). Pertanto alcuni AA. consigliano di somministrare preventivamente farmaci inibitori degli enzimi che convertono l'angiotensina I (farmaci ACE-inibitori) (Navot *et al.*, 1987; Bergh e Navot, 1992) sia che l'attivazione del sistema sia primitivo o secondario alla vasodilatazione diffusa (Balasch *et al.*, 1991). Tuttavia non si è ancora sicuri su eventuali effetti teratogeni di tali farmaci (Mehta e Modi, 1989).

Per ridurre la vasodilatazione iniziale, che potrebbe essere il *primum movens* della sindrome e che potrebbe essere provocata da sostanze di origine piastrinica o istamino-simili o da prostaglandine, è stata consigliata la somministrazione a scopo profilattico di aspirina o di antiprostaglandine (Bodis *et al.*, 1992) o di antistaminici (Pride *et al.*, 1984) o di corticosteroidi (Rizk, 1992) o di indometacina (Schenker, 1993), ma con risultati non sempre ottimali (Tan *et al.*, 1992).

Asch *et al.* (1991) hanno per primi suggerito l'uso dell'albumina endovena come profilassi dell'iperstimolazione (Asch *et al.*, 1993; Shalev *et al.*, 1995; Goldsman *et al.*, 1995); tuttavia non tutti i ricercatori concordano con questa procedura (Ng *et al.*, 1995).

In sintesi si può dire che esistono delle possibilità certe di prevenzione della OHSS e sono: a) la mancata o la ridotta somministrazione dell'HCG nei cicli di stimolazione a rischio; b) l'attesa di qualche giorno in più prima della somministrazione dell'HCG; c) la trasformazione di cicli di in-

duzione dell'ovulazione in cicli ART; d) la crioconservazione degli embrioni per il loro successivo utilizzo in cicli fisiologici; e) il supporto luteale con progesterone invece che con HCG.

Altri tentativi di terapia preventiva come l'uso di ACE-inibitori, di antistaminici, di aspirina o di corticosteroidi necessitano di ulteriori verifiche, mentre la somministrazione di albumina sembra molto promettente nel prevenire l'OHSS (Rosen e Lew, 1991).

In conclusione la sindrome di iperstimolazione ovarica è dovuta all'eccessivo stimolo ovulatorio somministrato o alla eccessiva risposta individuale. Può essere prevenuta, solo entro certi limiti, adoperando cautela nella posologia ed adeguati controlli dei parametri di risposta ovarica, controllando cioè l'estradiolo plasmatico e l'incremento di volume follicolare con ultrasonografia perché in effetti il terapeuta si deve sostituire ai fisiologici meccanismi di feedback, specie se si è adoperato il GnRH-A. In questo modo si sono ridotte molto le severe iperstimolazioni, che necessitano di ricovero in ospedale e di adeguata terapia medica e che possono mettere a rischio la vita della donna.

Bibliografia

- Aboulghar M. A., Mansour R. T., Serour G. I. et al., *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1992, 9, 238-243.
- Araujo E. Jr., Bernardini L., Frederick J. L. et al., *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1994, 11, 74-78.
- Asch R. H., Every G., Goldsman M. et al., *Hum. Reprod.*, 1993, 7, 1015-1020.
- Asch R. H., Li H., Balmaceda J. P. et al., *Hum. Reprod.*, 1991, 6, 1395-1399.
- Balasch J., Arroyo V., Carmona F. et al., *Fertil. Steril.*, 1991, 56, 1077-1083.
- Balasch J., Reverter J. C., Fábregues F. et al., *Fertil. Steril.*, 1996, 66, 608-613.
- Benadiva G. A., Davis O., Kligman I. et al., *Fertil. Steril.*, 1997, 67, 724-727.
- Bergh P. A., Navot D., *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1992, 9, 429-438.
- Bettendorf G., Lindner Ch., *Horm. Metab. Res.*, 1987, 19, 519-522.
- Bodis J., Tinneberg H.-R., Hanf V. et al., *Hum. Reprod.*, 1992, 7, 1181.
- Borenstein R., Elhalah U., Lunenfeld B., Schwartz Z. S., *Fertil. Steril.*, 1989, 51, 791-795.
- Campo S., Felli A., Lamanna M. A. et al., *Hum. Reprod.*, 1993, 8, 359-363.
- Cannon J. G., Dinarello C. A., *Science*, 1985, 227, 1247-1249.
- Coccia M. E., Bracco G. L., Cattaneo A., Scarselli G., *J. Reprod. Med.*, 1995, 40, 659-660.
- Dale P. O., Tanbo T., Haug E., Abyholm T., *Hum. Reprod.*, 1992, 7, 1085-1089.
- Delbaere A., Bergmann P. J. M., Gervy-Decoster C. et al., *Fertil. Steril.*, 1994, 62, 731-737.
- Delvigne A., Demoulin A., Smits J. et al., *Hum. Reprod.*, 1993a, 8, 1353-1360.
- Delvigne A., Dubois M., Battheu B. et al., *Hum. Reprod.*, 1993b, 8, 1361-1366.
- Editorial: Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Lancet*, 1991, 2, 1111-1112.
- Emperaire J. C., Ruffie A., *Hum. Reprod.*, 1991, 6, 506-510.
- Erlig Y., Naot Y., Friedman M. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1979, 53, 580-582.
- Fakih H., Bello S., *Fertil. Steril.*, 1992, 58, 829-832.
- Filicori M., Campaniello E., Michelacci L. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1988, 66, 327-333.
- FINAT (French In Vitro National Registry), *Fertil. Steril.*, 1993, 59, 587-595.
- Forman R. G., Frydman R., Egan D. et al., *Fertil. Steril.*, 1990, 53, 502-509.
- Friedlander M. A., Mola J. R., Goldfarb J. M., *Fertil. Steril.*, 1993, 60, 826-833.
- Garcia N., Campo S., Panetta V. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1985, 151, 635-640.
- Gelety T. J., Buvalos R., *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1995, 12, 406-412.
- Germond M., Wirthner D., Thorin D. et al., *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 1173-1176.
- Golan A., Ron-Eli R., Herman H. et al., *Obstet. Gynecol. Surv.*, 1989, 44, 430-440.
- Goldsman M. P., Balmaceda J. P., Stone S. C., Frederick J. L., Kettel M., Asch R. H., 43rd Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society, 1995.

- Gonen Y., Powell W. A., Casper R. F., *Hum. Reprod.*, 1991, 61, 356-358.
- Haring R. W., Strawn E. Y., Nolten W. E., *Obstet. Gynecol.*, 1985, 66, 220-224.
- Horstkamp B., Lübke M., Kentenich H. et al., *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 280-282.
- Jenkins J. M., Mathur R. S., Cooke I. D., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1995, 102, 2-5.
- Katz Z., Lancet M., Borenstein R., Chemke J., *Int. J. Fertil.*, 1984, 29, 186-188.
- Kirshon B., Doody M., Cotton D., Gibbons W., *Obstet. Gynecol.*, 1988, 71, 485-487.
- Kodama H., Fukuda J., Karube H. et al., *Fertil. Steril.*, 1996, 66, 417-424.
- Levy T., Orvieto R., Homburg R. et al., *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 1177-1179.
- Loret de Mola J. R., Flores J. P., Baumgardner G. P. et al., *Obstet. Gynecol.*, 1996, 87, 581-587.
- MacDougall M. J., Tan S. L., Jacobs H. S., *Hum. Reprod.*, 1992, 7, 597-600.
- Mashiach S., Bider D., Moran O. et al., *Fertil. Steril.*, 1990, 53, 76-80.
- Mathur R. S., Joels L. A., Jenkins J. M., *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 1996, 44, 145-147.
- McClure N., Healy D. L., Rogers P. A. W. et al., *Lancet*, 1994, 344, 235-236.
- McClure N., Leya J., Radwanska E. et al., *Hum. Reprod.*, 1992, 7, 758-764.
- Mehta N., Modi N., *Lancet*, 1989, 2, 96.
- Moneta E., Garcea N., Scirpa P., Mango D., *Folia Endocrinologica*, 1974, 27, 470-479.
- Moneta E., Marana R., Garcea N., Caruso A., *Acta Europaea Fertility*, 1977, 8, 155-166.
- Moohan J. M., Curcio K., Leoni M. et al., *Fertil. Steril.*, 1997, 67, 728-732.
- Mordel S., Schenker J. G., *Hum. Reprod.*, 1993, 8, 2009-2014.
- Morris R. S., Paulson R. J., Sauer M. V., Lobo R. A., *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 811-814.
- Mozes M., Bogowsky H., Anteby E. et al., *Lancet*, 1965, ii, 1213-1215.
- Navot D., Bergh P. A., Laufer N., *Fertil. Steril.*, 1992, 58, 249-261.
- Navot D., Margalioth E. J., Laufer N. et al., *Fertil. Steril.*, 1987, 48, 57-61.
- Neulen J., Yan Z., Raczek S. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80, 1967-1971.
- Ng E., Leader A., Claman P. et al., *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 807-810.
- Nisker J., Tummon I., Daniel S. et al., *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 406-408.
- Nylon D. L., Carlstrom K., Gustafson O., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1994, 73, 605-606.
- Ong A. C. M., Eisen U., Rennie D. P. et al., *Clin. Endocrinol.*, 1991, 34, 43-49.
- Padilla S. L., Zamaria S., Baramki T. A., Garcia J. E., *Fertil. Steril.*, 1990, 53, 365-367.
- Pride S. M., Yuen B. H., Moon Y. S., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1984, 148, 670-674.
- Regi A., Mathai M., Jasper P. et al., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1996, 75, 599-600.
- Rizk B., *Ovarian hyperstimulation syndrome*, in Brinsden P. R., Rainshury P. A. eds., *A Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*, 1992, Parthenon Publishing Group, Carnforth, pp. 369-384.
- Rizk B., *Ovarian hyperstimulation syndrome*, in Studd J. W. W. ed., *Progress in Obstetrics and Gynaecology*, 1995, Vol. 11, Churchill Livingstone, London, pp. 311-349.
- Rosen G. F., Lew M. W., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, 165, 1312.
- Salat-Baroux J., Alvarez S., Antoine J. M. et al., *Hum. Reprod.*, 1990, 5, 36-39.
- SART (Society for Assisted Reproductive Technology), The American Fertility Society, *Fertil. Steril.*, 1992, 57, 15-24.
- Schenker J. G., Polishuk W. Z., *Ovarian hyperstimulation syndrome: clinical and experimental data*, Excerpta Medica Int. Cong. Ser. no 396, 1976a.
- Schenker J. G., Polishuk W. Z., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1976b, 6, 47-50.
- Schenker J. G., *Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome*, in Genazzani A. R., Petraglia R., Volpe P. eds., *Progress in Gynecology and Obstetrics*, 1990, Parthenon Publishing Group, Carnforth, p. 661.
- Schenker J. G., *Hum. Reprod.*, 1993, 8, 653-659.
- Schmidt L., Asch R. J., Frederick J. L. et al., *Fertil. Steril.*, 1994, 62, 333-338.
- Sealey J. E., McCord D., Taufield P. A. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1985, 153, 514-519.
- Shalev E., Geslevich Y., Ben-Ami M., *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 417-419.
- Shalev E., Giladi Y., Matilsky M., Ben-Ami M., *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 1373-1376.
- Shoham Z., Patel A., Jacobs S. H., *Fertil. Steril.*, 1991, 55, 1051-1056.

- Shoham Z., Schachter M., Loumaye E. et al., *Fertil. Steril.*, 1995, **64**, 237-251.
 Soliman S., Daya S., Collins J., Hughes E. G., *Fertil. Steril.*, 1994, **61**, 1068-1076.
 Tan S. L., Balen A., Hussein E. et al., *Fertil. Steril.*, 1992, **58**, 387.
 The American Fertility Society, Society for Assisted Reproductive Technology, *Fertil. Steril.*, 1994, **62**, 1121-1128.
 Tiitinen A., Husa L. M., Tuppala M. et al., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1995, **102**, 326-329.
 Urman B., Pride S. M., Yuen B. H., *Hum. Reprod.*, 1992, **7**, 213-217.
 Wada I., Matson P. L., Troup S. A. et al., *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1993, **100**, 265-269.
 Zaidise I., Friedman M., Lindenbaum E. S. et al., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1983, **15**, 55-60.

NICOLA GARCIA

OSONO-OSSIGENO TERAPIA

Sin.: ossigeno-ozonoterapia. - F. *ozone-oxygénothérapie*. - I. *ozone-oxygen therapy*. - T. *Ozon-Sauerstofftherapie*. - S. *ozone-oxygenoterapia*.

SOMMARIO

Definizione e brevi notizie storiche (col. 4309). - **Basi biomolecolari dell'uso medico dell'ozono** (col. 4309). - **Preparazione e requisiti delle miscele ozono-ossigeno e regolamentazione del loro impiego** (col. 4310). - **Vie e modalità di somministrazione** (col. 4310). - **Indicazioni dell'ozono-ossigeno terapia** (col. 4310): *Patologie da carente apporto di ossigeno*. - *Patologie batteriche e virali*. - *Patologie osteoarticolari*. - *Altre condizioni sperimentali e cliniche*.

Definizione e brevi notizie storiche

L'*ozono-ossigeno terapia* [o.-o.t.] è l'uso a fini terapeutici dell'ozono in miscela con l'ossigeno in opportuna concentrazione.

Nella Grande Guerra (1914-1918) furono sottoposti a trattamento con ozono molti soldati con ferite settiche al fine di scongiurare la gangrena gassosa. Successivamente, Wolff e Wehrli (anni '50) introdussero l'*autoemoterapia ozonizzata* (v. sotto) e vennero proposte varie vie di somministrazione dell'ozono. L'uso terapeutico di questo gas è stato poi oggetto di numerosi studi scientifici e clinici condotti in Germania, Svizzera, U.S.A., Europa Orientale e Italia. A Brescia, dal 1983 ha sede la *Società Scientifica Italiana di Ossigeno-Ozono Terapia* (SSIOI), con funzioni di sviluppo, coordinamento e controllo delle ricerche in questo campo.

Basi biomolecolari dell'uso medico dell'ozono

Gli effetti dell'ozono sui sistemi biologici sono fondamentalmente dovuti alla sua energica azione ossidativa (v. *OSONO* [v.; v.*]). Questo elemento per la sua instabilità si converte rapidamente in *ossigeno singoletto* ($^1O_2$), che a sua volta induce una cascata reattiva con produzione di ROS (*Reactive Oxygen Species*): anione superossido O_2^- , radicale idrossile ($\cdot OH$) e perossido di idrogeno (H_2O_2). Queste specie reattive hanno tutte un forte potere ossidante e sono in grado di alterare reversibilmente o irreversibilmente i substrati cellulari per interazione di vari meccanismi, quali la perossidazione dei lipidi di membrana, l'ossidazione e deplezione del glutathione, di tioli proteici, etc. con più o meno profonde ripercussioni sulle proprietà funzionali della cellula (v. *RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA* [v.; v.*]). A meccanismi di questo tipo è più o meno direttamente riferibile la possibilità di utilizzazione terapeutica dell'ozono, ad es. come battericida e fungicida, come agente capace di modificare lo stato delle membrane cellulari (v. sotto), etc. Va tenuto presente, però, che l'azione delle ROS sui substrati cellulari può essere tenuta sotto controllo dall'organismo per intervento di vari sistemi protettivi antiossidanti, enzimatici e non enzimatici (v. *RADICALI LIBERI, PATOLOGIA DA* [v.; v.*]). L'effetto terapeutico dell'ozono può nascere, perciò, da un equilibrio *dose-dipendente*, risultando nullo a dosi

inadeguate e superando per contro la soglia della tossicità a dosi eccessive. La quantità di ozono (concentrazione, dose singola, dose globale per seduta) non deve superare, infatti, la capacità di difesa dei sistemi antiossidanti, limite oltre il quale si manifesterebbero i danni legati all'azione citotossica delle ROS. Effetti indesiderati possono verificarsi anche per errori tecnici, fino all'intossicazione cronica con cefalea, vertigini, astenia e dispnea.

L'inalazione della miscela ozono-ossigeno è di per sé dannosa quando è in grado di superare la barriera mucosa bronchiale, con congestione e flogosi fino all'alterazione delle cellule ciliate, oltre alla possibilità di edema polmonare.

Preparazione e requisiti delle miscele ozono-ossigeno e regolamentazione del loro impiego

Per i limiti di maneggevolezza piuttosto ristretti, con il rischio di tossicità, si pone l'esigenza di mantenere la pratica dell'o.-o.t. peraltro considerata ancora «alternativa», entro i confini di protocolli ben definiti, in ambiente qualificato e controllato.

L'o.-o.t. è regolamentata dal Ministero della Sanità (decreto del 2-4-92 e Circolare del 30-12-92), che ne riconosce la possibilità di sperimentazione clinica *in presidi pubblici*, mentre ne vieta l'esercizio libero-professionale «erga omnes». In deroga, personale qualificato può condurre la sperimentazione anche in istituzioni private, purché attuando protocolli finalizzati, comunicati al Ministero, realizzati in stretta collaborazione e sotto la responsabilità delle strutture pubbliche (cfr. Sciaudone, 1996). Sono abilitati al trattamento i medici iscritti agli Ordini, è obbligatorio richiedere il consenso informato del paziente e sono autorizzati i controlli da parte dei NAS (Nuclei Anti-Sofisticazioni).

Oggi si sa che la miscela gassosa ha effetto «medicale» per concentrazioni di 30-40 µg di ozono per ml di ossigeno. Speciali apparecchi (*ozonizzatori*) producono l'ozono per scarica elettrica in un flusso d'ossigeno: la miscela di ossigeno-ozono viene convogliata a una valvola a due vie, l'una per l'operatore (utilizzazione del gas medicale) e l'altra per un distruttore catalitico (eliminazione dell'ozono in eccesso). L'apparecchio può essere di piccole dimensioni (portatile) o di maggiore potenza.

Vie e modalità di somministrazione

La cosiddetta *grande autoemotrasfusione* consiste nel raccogliere in una sacca eparinizzata 150-200 ml di sangue venoso del soggetto da trattare, sangue che viene mescolato e agitato con pari volume di ozono-ossigeno e poi, a miscela stabilizzata, reinfuso nello stesso soggetto. La *piccola autoemotrasfusione*, invece, si effettua raccogliendo, in una siringa da 20 ml, 10 ml di sangue venoso del soggetto e 10 ml di ozono-ossigeno e ritrasfondendo poi la miscela dopo qualche minuto.

Altre vie di somministrazione sono quelle per iniezione intramuscolare, sottocutanea e intrarticolare di volumi appropriati della miscela ozono-ossigeno. Per le teleangectasie (v. sotto) si praticano micromiezioni nelle piccole vene, mentre l'endovenosa diretta è sconsigliabile per la possibilità di fastidiosi effetti ipotensivi. Una campana di vetro, o un sacchetto di plastica a tenuta stagna (per piaghe da decubito), o un cilindro per l'arto da trattare, costituiscono le modalità di insufflazione diretta della miscela gassosa sulla superficie corporea (20-30 min al giorno). La *balneoterapia* consiste nel far gorgogliare aria ozonizzata nell'acqua di una vasca per un bagno medicale: lo strato corneo della pelle, in ambiente umido a 37 °C per 20-30 min, diviene permeabile alla miscela gassosa.

Indicazioni dell'ozono-ossigeno terapia

Non si può tacere il fatto che questa pratica terapeutica, non ancora affrancata dal suo primitivo carattere sperimentale a distanza di anni, soffre di una certa diffidenza da parte del mondo medico tradizionale, poggiando tuttora su ipotesi più che su certezze. L'entusiasmo dei suoi sosteni-

OZONO-OSSIGENO TERAPIA

tori — circa un migliaio in Italia — tende ad ampliarne le modalità tecniche di esecuzione e le indicazioni, come risulta dagli Atti del VI Congresso della Società Italiana di Ossigeno-Ozono Terapia, 1996.

Patologie da carente apporto di ossigeno

In condizioni di ridotto apporto di ossigeno si è descritto un favorevole effetto dell'α-o.t., attribuito principalmente alla perossidazione dei fosfolipidi di membrana degli eritrociti, che per il rilassamento della membrana stessa perdono la tendenza ad impilarsi (effetto *anti-sludge*), con conseguente riduzione della viscosità ematica e aumento del flusso nel microcircolo (effetto *reologico*) e con il risultato di una maggiore cessione di ossigeno ai tessuti (come si evince dalla ridotta tensione di ossigeno nel versante venoso). La sperimentazione è stata condotta nelle seguenti patologie.

Deficit arterioso (arteriopatie obliteranti degli arti inferiori in fase di *claudicatio*, con cianosi e turbe trofiche): l'α-o.t. è stata praticata per autoemotrasfusione o per impiego locale (insufflazione della miscela gassosa sulla superficie dell'arto ischemico, racchiuso in un apposito cilindro, o sotto campana o sacchetto di plastica a tenuta stagna sull'area ischemica), con risultati positivi dopo assidui trattamenti per molti mesi (Coppola, 1992); per le sindromi di Raynaud agli arti superiori, si può ricorrere alla balneoterapia.

Ulcere post-flebitiche o da decubito: in queste condizioni sono stati riferiti risultati favorevoli (effetto disinfettante e ricopulizzante) per applicazione locale dell'α-o.t. (campana o sacchetto), dopo aver inumidito l'area da trattare per favorire l'azione battericida; l'applicazione è da ripetere quotidianamente, fino a ricopulizzazione.

Teleangiectasie (con danno estetico ed eventuali subedemi): buoni risultati sono stati segnalati con microiniezioni di miscela di ozono-ossigeno ad alta concentrazione in ciascun vasellino interessato, per un totale di 5 ml a seduta, tamponando e poi fasciando la sede, fino a chiusura (post-flogistica) dei piccoli vasi; raramente si può avere un disturbo sistemico ipotensivo da passaggio in circolo di gas (dispnea, vertigini e senso di svenimento), disturbo peraltro regredibile in 30-60 min di riposo in posizione supina.

Ipodermite indurativa (cellulite): sono state praticate, secondo quanto riferito non senza giovamento, iniezioni sottocutanee della miscela gassosa per 10-20 sedute bisettimanali, seguite da sedute biensettimanali di rinforzo, per ottenere la scissione degli acidi grassi (che diventano idrofili) dei lobuli adiposi; a questo trattamento vanno associate una dieta e un'attività fisica adeguate (Franzini, 1993).

Rugadi, fistole anali, proctiti e sindromi emorroidarie: secondo quanto riferito, queste condizioni traggono vantaggio da iniezioni *in situ* o insufflazioni della miscela gassosa per l'attività antisetica ed emostatica dell'ozono (Knoch, 1990).

Cefalea a grappolo: è stata trattata con autoemotrasfusioni ozonizzate bisettimanali per un mese.

Patologie batteriche e virali

Oltre ad un'azione battericida e fungicida, è stata descritta un'attività virustatica dell'ozono per una sua azione di stimolo su linfociti e monociti a produrre interferone e interleuchine (Bocci, 1990-1994).

Herpes zoster ed Herpes simplex: autoemotrasfusioni o insufflazioni locali sono state trovate efficaci nelle prime 24-36 h dalla comparsa delle vescicole.

Estrazioni dentarie, periodontiti, stomatiti: sono praticabili collutori con acqua ozonizzata a scopo disinfettante ed emostatico su ulcere e piaghe orali.

Acne: sono stati riferiti risultati vantaggiosi con α-o.t. tramite coppette, microiniezioni locali, o anche a seguito di «piccola autoemotrasfusione» (in 12-15 sedute).

Patologie osteoarticolari

In questo tipo di patologie è stato riferito che l'α-o.t., in più sedute, è efficace per l'ossidazione dei mediatori algogeni (effetto antalgico e antinfiammatorio).

Artriti (ginocchio, anca e spalla) e sindrome del «tunnel carpal»: α-o.t. per iniezioni intrarticolari.

Osteoporosi: α-o.t. per autoemotrasfusioni (bisettimanali per 2 mesi).

Ernie e protrusioni discali («conflitto disco-radicolare»): 2-4 infiltrazioni paravertebrali della miscela ozono-ossigeno (60 ml *in toto*) per 6-8 sedute per ernie migrate; oppure 1-2 iniezioni intradiscali (2-4 ml a iniezione) per protrusioni «contenute» (Jucopilla, 1995). L'ossidazione dei mucopolisaccaridi del nucleo discale, con rottura ossidativa dei *crosslink* e conseguente perdita del contenuto acquoso, porterebbe alla riduzione dell'ernia fino a remissione definitiva dei sintomi e talora anche dell'*imaging* (Pietrogrande, 1995). Ovviamente, la procedura va praticata da mani esperte (ortopedico o neurochirurgo), a pena di errori tecnici inammissibili.

Altre condizioni sperimentali e cliniche

L'effetto immuno-stimolante dell'α-o.t. sulle citochine, con formazione di radicali liberi dell'ossigeno e innalzamento termico locale, è stato studiato, in associazione al 5-fluorouracile, su cellule neoplastiche umane e considerato come fattore «similtermoterapico», sensibilizzante alla chemioterapia (Zanker *et al.*, 1990). La «grande auto-emotrasfusione», in più sedute, è stata impiegata anche nelle cirrosi da epatovirus come stimolo alla produzione d'interferone endogeno (minimo costo rispetto al farmaco) per inattivare l'agente virale (Bocci, 1990). L'α-o.t. è stata inoltre praticata contro l'AIDS (Carpendale *et al.*, 1991; Carpendale *et al.*, 1993), l'infezione da *Cytomegalovirus*, la sindrome da stanchezza cronica. Altre indicazioni, in genere per autoterapia, sono state proposte ad es. nella maculopatia retinica degenerativa senile (Riva, 1990), nella psoriasi, etc. (cfr. Atti della SSIOT, 1996).

Bibliografia

- Atti della SSIOT. VI Congr., su *Acta Toxicol. Ther.*, 1996, 17, fasc. 2-3.
Bocci V., *Haematolog.*, 1990, 75, 510-515.
Bocci V., *Med. Hypotheses*, 1992, 39, 30-34.
Bocci V., *J. Int. Med. Res.*, 1994/2, 22, 131-144.
Bocci V. *et al.*, *Lymphok. Cytok. Res.*, 1993/1, 12, 121-126.
Bocci V. *et al.*, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 1993/2, 7, 133-138.
Bocci V. *et al.*, *Biotherapy*, 1994/1, 7, 83-90.
Bolton D. C. *et al.*, *Environ. Res.*, 1992, 27, 466-475.
Carpendale M. T. *et al.*, *Antivir. Res.*, 1991, 16, 281-292.
Carpendale M. T. *et al.*, *J. Clin. Gastroenterol.*, 1993, 17, 142.
Coppola L. *et al.*, *Thromb. Atheroscl.*, 1992, 3, 83-89.
Franzini M. *et al.*, *Acta Toxicol. Ther.*, 1993, 14, 272-288.
Gilmour M. I. *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1993, 147, 753-760.
Knoch H. G. *et al.*, 1990, *Medwelt.*, 41, 371-374.
Jucopilla N. *et al.*, I° Congr. Soc. Esp. Abordajes Percutaneos Vertebrales, Barcellona, 29-30 giugno 1995.
Paulesu I. *et al.*, *Lymphok. Cytok. Res.*, 1991, 10, 409-412.
Pietrogrande V., I° Congr. Soc. Esp. Abordajes Percutaneos Vertebrales, Barcellona, 29-30 giugno 1995.
Riva S. *et al.*, *Panmin. Med.*, 1990, 32, 77-84.
Seraudone G. *et al.*, *Acta Toxicol. Ther.*, 1996, 17, 281-286.
Vaughin J. M. *et al.*, *Can. J. Microbiol.*, 1990, 36, 557-560.
Zanker K. S. *et al.*, *Chemother.*, 1990, 36, 147-154.

FIILIPPO ASDLE

—



